

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 7 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461473

研究課題名(和文) 全身性エリテマトーデスにおけるMAIT細胞減少の病因的意義の解明

研究課題名(英文) Activation mechanisms of lupus MAIT cells and their roles in lupus pathology.

研究代表者

千葉 麻子 (CHIBA, Asako)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：40532726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：全身性エリテマトーデス(SLE)患者におけるMucosal-associated invariant T (MAIT)細胞の減少には活性化誘導死が関わっており、その活性化の理由として単球のMAIT細胞活性化能が亢進していること、血清で増加しているIL-18やIFN γ などのサイトカインがMAIT細胞の活性化に関与していることを示した。MAIT細胞はSLE病態の悪化に作用するのかループスマウスモデルを用いて検証を行った。MAIT細胞が存在しないマウスでは自己抗体産生の減少、生存率の改善、腎炎の軽症化傾向が見られた。一方で、ループス皮膚炎に対しMAIT細胞は病態抑制的に作用することが明らかとなった。

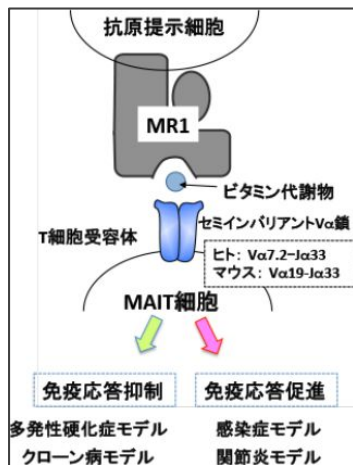
研究成果の概要(英文)：Previously we found that the frequency of Mucosal-associated invariant T (MAIT) cells is reduced partially due to activation-induced cell death in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). In this study, we elucidated two possible mechanisms of MAIT cell activation in SLE. We revealed that monocytes from lupus patients exhibited an increased ability to induce MAIT cell activation. We also found MAIT cells were activated by cytokines including IL-18 and IFN α , important key players in lupus pathology. Next, we investigated the role of MAIT cells in Fc γ RIIb $^{-/-}$ Yaa lupus model mice. The lack of MR1 improved survival rate and reduced serum levels of anti-dsDNA antibody. There was a trend of reduced glomerulonephritis and glomerular IgG deposits in MR1 $^{-/-}$ Fc γ RIIb $^{-/-}$ Yaa mice. On the contrary, MR1 $^{-/-}$ Fc γ RIIb $^{-/-}$ Yaa mice developed exacerbated dermatitis. Further studies are required to reveal mechanisms by which MAIT cells are involved in lupus pathology.

研究分野：自己免疫

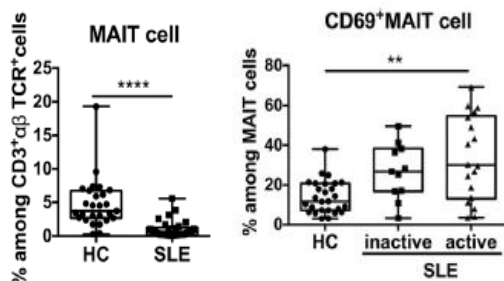
キーワード：全身性エリテマトーデス 自然リンパ球 MAIT細胞 ループスマウスモデル

1. 研究開始当初の背景

Mucosal-Associated Invariant T細胞(MAIT細胞)は腸管粘有層やパイエル板に多く存在するためその名が冠せられた自然リンパ球である。MAIT細胞はMHC Class Ib分子に属するMajor histocompatibility molecule related 1 (MR1)分子に拘束され、T細胞受容体(TCR)に可変性のない鎖(マウス V19-J33、ヒト V7.2-J33)を発現していることから自然リンパ球の一種と考えられる。近年、MAIT細胞はヒトの末梢血T細胞の5%を占めることが明らかとなり免疫応答に重要な生理的役割を担うことが示唆されている。MAIT細胞は多発性硬化症やクローン病のマウスモデルで病態抑制に働くことが知られている。一方我々は、MAIT細胞が欠損したマウスではコラーゲン誘導関節炎や抗体誘導関節炎が軽症化することを見出し、MAIT細胞は関節炎モデルにおいては病態悪化に作用することを明らかにした。



我々は全身性エリテマトーデス(SLE)患者において、末梢血中のMAIT細胞が健常者の10-20%と著しく低下していることを見出した。SLE患者MAIT細胞は活性化マーカーであるCD69の発現が亢進していたことから、生体内で活性化状態にあり活性化誘導細胞死が細胞数減少の一因であることを示し、MAIT細胞がSLE病態に深く関わっている可能性を明らかにした。



以上のことから、SLEにおけるMAIT細胞の活性化メカニズムの解明やSLEの動物モデルにおけるMAIT細胞の役割を解析する

ことは重要な課題である。

2. 研究の目的

SLEにおけるMAIT細胞減少の病因的意義を顕在化させ、全身性自己免疫疾患の病態解明および新規治療法開発の基盤を確立することを目的とする。

- (1) SLE患者におけるMAIT細胞の活性化および減少の原因を解明する。
- (2) マウスモデルを用いMAIT細胞はループス(SLE)病態の抑制に働くのか、増悪に作用するのかを明らかにする。MAIT細胞をターゲットとした自己免疫治療の可能性を探る。

3. 研究の方法

- (1) SLE患者におけるMAIT細胞の活性化および減少の原因解明

SLE患者の血清中のサイトカイン濃度をBioplex法やELISA法により測定し、MAIT細胞の活性化や細胞死に關与する可能性のあるサイトカインを探索する。具体的にはIL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IL-23, GM-CSF, G-CSF, IFNα, IFNγ, TNFαを測定する。MAIT細胞については頻度と活性化マーカーであるCD69をフローサイトメトリー法により解析する。それぞれのサイトカインレベルとMAIT細胞の頻度および活性化マーカーの關連を解析する。

の結果で關連のみられたサイトカインについて、MAIT細胞の活性化に対する影響を検証する。健常者由来の末梢血単核球をサイトカイン存在下で培養し、18時間後のMAIT細胞上の活性化マーカーCD69の発現をフローサイトメトリー法により解析を行う。同時に細胞死に対する影響も確認する。

SLE患者MAIT細胞の活性化における抗原提示細胞の關与の有無を明らかにする。患者の末梢血よりB細胞や単球などの抗原提示細胞を磁気ビーズにより分離する。健常者末梢血単核球よりソーターを用いてMAIT細胞を単離する。健常者および患者の抗原提示細胞をそれぞれMAIT細胞とMR1抗原存在下で共培養を行い、18時間後にMAIT細胞上の活性化マーカーCD69をフローサイトメトリー法により解析する。培養上清中のサイトカイン濃度をBioplex法により測定する。

- (2) ループスモデルにおけるMAIT細胞の役割の解明

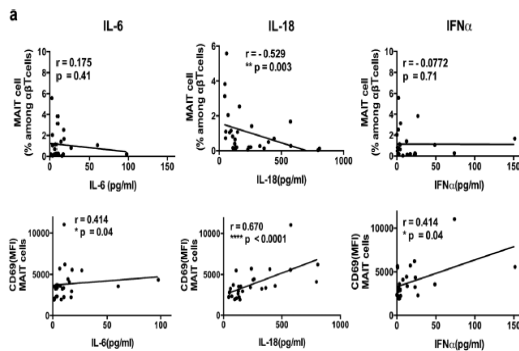
MAIT細胞はループス病態の抑制に作用するのか、それとも悪化に働くのかをマウスモデルを用いて明らかにする。MAIT細胞を欠損するMR1欠損(MR1^{-/-})マウスおよびMAIT細胞を

過剰発現する V 19iTCR トランスジェニック (V 19iTg) マウスをループス自然発症系 Fc RIIB^{-/-}/Yaa マウスと交配し以下の項目について MAIT 細胞の影響を調べる。生存率、関節炎所見、腎炎所見、血清自己抗体価 皮膚炎所見などについて ELISA や組織染色により解析を行う。

4. 研究成果

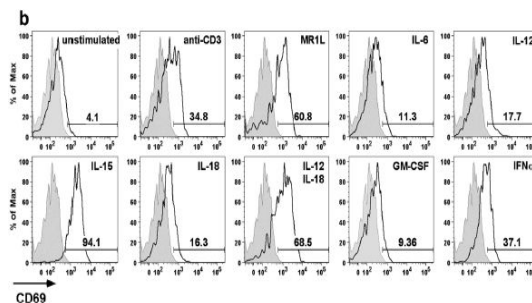
(1) SLE 患者 MAIT 細胞の活性化におけるサイトカインと抗原提示細胞の役割

SLE 患者の血清サイトカインレベルと MAIT 細胞の頻度・活性化状態の関連性の検証を行った。SLE 患者の血清サイトカイン濃度を測定し、末梢血中の MAIT 細胞の頻度と活性化マーカーである CD69 の発現レベルについて関連性の解析を行った。MAIT 細胞の CD69 の発現と IL-6、IL-18、IFN α 濃度に正の相関を認めた。MAIT 細胞の頻度については、IL-18 の濃度と負の相関を認めた。



以上の結果から、MAIT 細胞の活性化には IL-6、IL-18、IFN α などの関与の可能性が示唆された。一方、細胞の頻度については IL-18 が高いほど低下していることが明らかとなった。

の結果より、MAIT 細胞の活性化状態と関連のあったサイトカインについて、MAIT 細胞を活性化させる能力を有するか *in vitro* の系で検証を行った。これまでの報告通り、IL-12 と IL-18 により MAIT 細胞は活性化した。IL-6 では MAIT 細胞の CD69 の発現に変化はみられなかったが、IFN α の添加により MAIT 細胞は活性化し CD69 の発現が増加した。

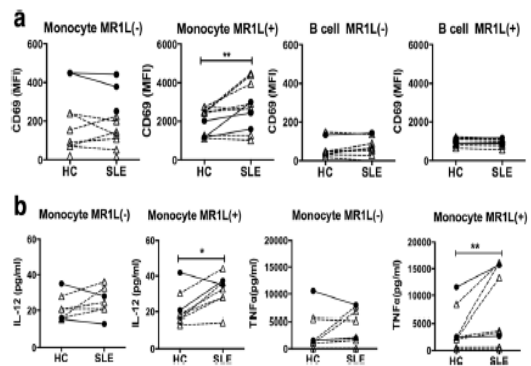


そのため、SLE 患者で増加していたサイトカインのうち IL-18 や IFN α が MAIT 細胞の活性

化に関わると考えられた。

患者血清 IL-18 濃度と MAIT 細胞の頻度に負の相関を認めたが、IL-18 により MAIT 細胞の細胞死が誘導されることはなかった。IL-18 は MAIT 細胞の VLA-4 の発現を亢進させる働きがあるため、細胞死ではなく炎症局所などへの MAIT 細胞の遊走に關与する可能性が考えられた。

B 細胞や単球による MAIT 細胞の活性化能を健常者と SLE 患者で比較を行った。磁気ビーズを用いて単離した B 細胞もしくは単球を MAIT 細胞と共培養し、同時に MR1 抗原を添加して抗原刺激を行い MAIT 細胞の活性化状態を CD69 の発現を指標にフローサイトメーターで評価した。B 細胞については健常者と患者で MAIT 細胞活性化能に違いは見られなかったが、SLE 患者由来の単球は MAIT 細胞の活性化能が高かった。SLE 患者の単球による MAIT 細胞活性化能亢進の機序を解明するため培養上清のサイトカインを測定した。IL-12 濃度が患者単球との共培養で上昇しており、MAIT 細胞活性化能亢進のメカニズムの一つとして考えられた。



(2) ループスモデルにおける MAIT 細胞の役割の解明

ループス自然発症モデルである Fc RIIB^{-/-}/Yaa マウスと MR1^{-/-}マウスを交配し、MAIT 細胞がループス病態へ及ぼす影響を検証した。Fc RIIB^{-/-}/Yaa マウスは生後 10 週を過ぎたころから血清の自己抗体が陽性になり、その後ループス腎炎や皮膚炎の所見が出現する。MR1^{-/-}/Fc RIIB^{-/-}/Yaa マウスでは同腹の MR1^{+/+} Fc RIIB^{-/-}/Yaa マウスに比較し生存率の改善を認めた。血清中の抗 dsDNA 抗体価を評価したところ MR1^{-/-} Fc RIIB^{-/-}/Yaa マウスで減少傾向を認めた。腎炎については尿中アルブミン濃度、糸球体 IgG 沈着で病態の評価を行った。MR1^{-/-} Fc RIIB^{-/-}/Yaa マウスで尿中アルブミン濃度および糸球体 IgG 沈着の減少傾向を認めた。一方で皮膚炎については、肉眼的な皮膚炎病変の数が MR1^{-/-} Fc RIIB^{-/-}/Yaa マウスで増加しており、また病理組織学的な解析でも、MR1^{-/-} Fc RIIB^{-/-}/Yaa マウスでは皮膚の肥厚、過角化、液状変性所

見が増悪することが明らかとなった。
以上の結果より、MAIT細胞は自己抗体産生や腎炎病態の増悪に働き、皮膚炎については病態抑制的に作用すると考えられた。ヒトのSLE病態においても抗dsDNA抗体価と腎炎の活動性は関連するが、臓器障害の重症度と皮膚症状とは必ずしも関連しないことが知られている。そのため、それぞれのループス病態におけるMAIT細胞の関わりを調べることが重要と考えられた。現在V19iTgを用いて、MAIT細胞が過剰に存在する条件におけるループス病態について解析を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Ishimori A, Harada N, Chiba A, et al. Circulating activated innate lymphoid cells and mucosal-associated invariant T cells are associated with airflow limitation in patients with asthma. *Allergol Int.* 2017;66:302-309 doi: 10.1016/j.alit.2016.07.005. 査読有

Chiba A, Tamura N, Yoshikiyo K, et al. Activation status of mucosal-associated invariant T cells reflects disease activity and pathology of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2017;19(1):58. doi: 10.1186/s13075-017-1257-5. 査読有

Hayashi E, Chiba A, Tada K, et al. Involvement of mucosal-associated invariant T cells in ankylosing spondylitis. *The Journal of Rheumatology.* 2016;43:1695-703 doi: 10.3899/jrheum.151133. 査読有

Haga K, Chiba A, Shibuya T, et al. MAIT cells are activated and accumulated in the inflamed mucosa of ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2016; 31: 965-72. doi: 10.1111/jgh.13242. 査読有

[学会発表](計20件)

Murayama G, Chiba A, Yamaji K, Tamura N, Takasaki Y, Miyake S. Role of mucosal-associated invariant T (MAIT) cells in a murine model of lupus. The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2016年12月5日、沖縄コンベンションセンター、沖縄県宜野湾市

村山 豪、千葉麻子、山路健、田村直人、三宅幸子.ループスモデルにおけるMAIT細胞に関する解析.第44回日本臨床免疫学会総会、2016年9月8日、京王プラザホテル、東京都新宿区

千葉麻子、田村直人、村山豪、北垣内みえ、山路健、高崎 芳成、三宅幸子.MAIT細胞の活性化状態は全身性エリテマトーデスの疾患活動性と病態を反映している.第60回日本リウマチ学会総会・学術集会、2016年4月21日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

Chiba A, Tamura N, Yoshikiyo K, Murayama G, Kitagaichi M, Yamaji K, Takasaki Y, Miyake S. Activation status of mucosal-associated invariant T cells reflects disease activity of systemic lupus erythematosus. FOCiS 2016 BOSTON, 2016年6月22日、Seaport World Trade Center, Boston (USA)

Chiba A, Murayama G, Tamura N, Yamaji K, Takasaki Y, Miyake S. Activation Status of Mucosal-associated Invariant T cells Sensitive Reflects Disease Activity of Systemic Lupus Erythematosus. ACR/ARHP Annual Meeting, 2016年11月15日、Walter E. Washington Convention Center, Washington DC (USA)

[図書](計3件)

千葉麻子、先端医学社、炎症と免疫、*Human Immunology:基礎から臨床まで* MAIT細胞、2016 24(6)、482-487

千葉麻子、医歯薬出版株式会社、医学のあゆみ、自己免疫におけるMAIT細胞の役割、2014 251(6)、490-493

千葉麻子、科学評論社、リウマチ科、NKT細胞による自己免疫疾患の制御、2014、52(4)、439-413

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/meneki/home.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

千葉 麻子(CHIBA, Asako)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号:40532726

(2)研究分担者:なし

(3)連携研究者:なし

(4)研究協力者:

村山 豪(MURAYAMA, Goh)

順天堂大学大学院・医学研究科・大学院生
北垣内 みえ(KITAGAICHI, Mie)

順天堂大学大学院・医学研究科・大学院生