

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：32661

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670240

研究課題名(和文)自己免疫疾患マウスのEAE不応答性機序解析

研究課題名(英文)Analysis of EAE insensitive autoimmune prone mice

研究代表者

近藤 元就 (KONDO, Motonari)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：20594344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：染色体オーガナイザーとしての機能を有する核タンパク、special AT-rich binding protein-1 (SATB1)を血球特異的に欠失したSATB1 conditional knockout (SATB1cKO)マウスは自己免疫疾患を発症する。しかしながら、多発性硬化症のモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎に対しては抵抗性であることがわかった。2D2トランスジェニックマウスを用いた自発的EAEもSATB1cKOマウスには発症しないこと、TCR刺激が減弱していることより、SATB1cKOマウスにおける自己免疫疾患発症には幼弱期のT細胞が重要な役割を担うことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Special AT-rich binding protein-1 (SATB1) is a chromosome organizer. Hematopoietic cell specific deletion of SATB1 in mice (SATB1cKO) leads to autoimmune manifestation; however, SATB1cKO mice were resistant against EAE. Spontaneous EAE with 2D2 transgenic TCR was not observed in SATB1cKO mice. Since TCR signal strength was weak in T cells from SATB1cKO mice, these results imply that T cells in SATB1cKO mice at childhood might play a role in pathogenesis of autoimmune diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞 SATB1 自己免疫疾患

1. 研究開始当初の背景

我々はT細胞特異的核内因子として同定されたSATB1のT細胞の分化と機能について解明する目的で、Cre/loxP系による条件付SATB1欠損マウスを作製した。具体的には、C57BL/6を遺伝背景とするSATB1 floxed (SATB1 fl/fl)マウスと、造血系細胞特異的にCre酵素を発現するVav-Creトランスジェニックマウスとを交配し、血球特異的SATB1欠損マウス(Vav-ΔSATB1マウス)を作製した。解析の過程で我々は、12週齢以降のVav-ΔSATB1マウスに、血清中の抗dsDNA抗体価の上昇、体毛の白斑、糸球体での免疫複合体沈着および唾液腺炎といった、自己免疫疾患の所見を見出した。これらの結果は、免疫寛容の成立もしくは維持にSATB1が深く関与することを示唆した(Kondo M., et al, J. Immunol. 196, 563-572, 2016)。SATB1の免疫寛容機構をより深く解析する目的で、臓器特異的自己免疫疾患の一つで中枢神経組織抗原(myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG)の免疫により再現良く誘導できるEAEをVav-ΔSATB1マウスに応用した。当初、autoimmune proneのこのマウスは野生型マウスに比べ、より激しいEAE症状を呈すると仮定した。ところが予想に反し、Vav-ΔSATB1マウスはEAEの所見を全く示さなかった(データ未公表)。Autoimmune proneであるVav-ΔSATB1マウスのEAE抵抗性を論理的に説明することは現時点では困難である。このような非常に矛盾した事象が起こった原因を追及するために本研究計画を立案した。

2. 研究の目的

本研究課題では、autoimmune proneであるspecial AT-rich binding protein 1 (SATB1) 遺伝子欠損マウスが実験的自己免疫性脳脊髄炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)抵抗性であることに着目し、免疫寛容の未知分子基盤の解明を目指した。自己免疫疾患は健常時に保たれている免疫寛容が破綻することで発症する。染色体構造調整因子の一つであるSATB1を造血系細胞特異的に欠損させたマウスは、12週齢以降に自己抗体価上昇を伴う全身性自己免疫疾患様症状を示す。しかしながら、このマウスはヒト多発性硬化症(Multiple sclerosis, MS)モデルであるEAEに抵抗性であることも判明した。これらの相反する事象は説明困難であると同時に、全身性と臓器特異性の自己免疫疾患は、それぞれ異なる免疫寛容系の破綻に起因する可能性を示唆する。本研究ではSATB1欠損マウスの特徴を活かし、この挑戦的な仮説の実証を試みた。

3. 研究の方法

予備的な検討では、T細胞受容体(T cell receptor, TCR)遺伝子に操作を加えていない通常のVav-ΔSATB1マウスは自発型自己

免疫疾患に感受性だが、Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)免疫によるEAE(実験的誘導型自己免疫疾患の一例)に耐性を示した。この矛盾点に自己免疫応答と免疫寛容の分子基盤が隠されている可能性に拘って解析を進めた。MOG特異的TCRトランスジェニックマウス(2D2)とSATB1^{fl/fl}マウス、さらにER-CreマウスあるいはVav-Creマウスとを交配し、造血系細胞特異的にSATB1を欠損する(2D2-Vav-ΔSATB1)、あるいはタモキシフェン投与により任意でSATB1欠損(2D2-ER-ΔSATB1)を誘導できる2D2マウスを作製した。(下表参照)2D2マウスはMOG免疫と百日咳菌毒素(pertussis toxin, PT)の静脈投与により誘導可能なEAE発症に加えて、自発的にEAEおよび眼神経炎(optic neuritis, ON)を発症する。つまり二つの様式で自己免疫疾患に至る。誘導型EAEと自発型EAE(ONも含めて)における免疫系エフェクター機能と制御性(寛容)機能とを解析した。

マウス	Vav-ΔSATB1 2D2-Vav-ΔSATB1	ER-ΔSATB1 2D2-ER-ΔSATB1
条件	発達段階でVavプロモーター制御下により、SATB1遺伝子が欠損	タモキシフェン投与により任意の時点でSATB1遺伝子が欠損
実験	個体をそのまま解析	RAG2KOマウスへ移入後
末梢で	胸腺でのSATB1機能を含む可能性はある	胸腺での機能と独立して解析することが可能

(1) EAEの誘導

8週齢マウスの副側部皮下に死滅結核菌を増量したフロイント完全アジュバントと混和したMOG₃₅₋₅₅部分ペプチドを免疫し、当日とその二日後に200 ngのPTを静注することでEAEを誘導した。麻痺症状は7週間観察した。症状のスコア毎に脊髄を採取し脱髄や炎症程度を解析した。また、免疫10日前後の所属リンパ節細胞を採取し、試験管内でMOGペプチドによる再刺激を行った後に未処置マウスへ養子移入することでトランスファーEAEの誘導を試みた。

(2) 自発型EAEおよびONに関する検討

2D2トランスジェニックマウスは通常飼育下でEAEやONを自然発症することが報告されている(J. Exp. Med. 197, 1073, 2003)。特にONは48週齢までに約40%の個体でONを呈する。先に示したとおり、Vav-ΔSATB1マウスでは、加齢に伴う血清中の抗dsDNA抗体価の上昇、免疫複合体の糸球体での沈着および腺組織の炎症の自然発症が認められた。その一方で、MOG/PT処置による誘導型EAEに抵抗性でもあった。すなわち、交配して得られた2D2-Vav-ΔSATB1マウスは、自発型EAEやONの好発化や重症化を示す可能性と、反対に低頻度で軽減した症状を示す可能性とが想定できた。そこで通常飼育条件群とMOG/PT処置群の2D2-Vav-ΔSATB1マウスおよびVav-

ΔSATB1 マウスの4群を48週齢まで観察し、重症化と軽症化のどちらの傾向となるかを調べた。EAEでは麻痺症状を観察し、ONでは一定週齢毎に採取した眼神経の炎症状況を解析することでそれぞれ判定した。同時に、リンパ節や脾臓中のTh細胞機能について解析した。

(3) SATB1機能とT細胞応答に関する検討

細胞内でSATB1は染色体の構造制御因子として機能していることから、我々の作製したΔSATB1マウスでは発現する遺伝子群(含miRNA)に変化が起きていることが考えられた。この変化の結果が血中抗dsDNA抗体価の上昇をはじめとする自然発症の自己免疫反応と、EAE誘導時のMOG/PT応答反応とのそれぞれに感受性変化をもたらしていることが示唆される。EAEの病原性に関与するサイトカインをはじめとする遺伝子群、免疫寛容に必須の遺伝子群、T細胞で発現する受容体(TCRやサイトカイン受容体)の下流で働く情報伝達分子の遺伝子群などに焦点をあてた解析を行った。

4. 研究成果

(1) EAEの誘導

野生型マウスまたは、Vav-ΔSATB1マウスにEAEを誘導したが、予備実験の結果どおり、Vav-ΔSATB1マウスはEAEの所見を全く示さなかった。次にEAEを発症した野生型マウス(MOGペプチド免疫後10日目)の所属リンパ節を採取し、培養液中でMOGペプチドの細刺激を行った後、野生型マウスまたはVav-ΔSATB1マウスに養子移入を行い、EAEの誘導を試みた。その結果、野生型マウスに比べて発症に1週間程度の遅れがあるものの、Vav-ΔSATB1マウスでもEAEは発症し、EAEスコアも野生型マウスと比べて有意差は認められなかった。この結果より、MOGペプチド特異的に反応するエフェクターT細胞が適量存在すれば、Vav-ΔSATB1マウスにおいてもEAEが発症することが明らかとなった。

(2) 自発型EAEおよびONに関する検討

Vav-ΔSATB1マウスでのEAE抵抗性は、胸腺内でのT細胞レパトア形成不全による可能性が考えられたため、MOG特異的T細胞レセプターを発現するT細胞存在下での、SATB1機能を解析するために2D2-Vav-ΔSATB1マウスを用いた解析を行った。野生型2D2マウスEAEまたは、ONを自然発症したが、2D2-Vav-ΔSATB1マウスは、EAE、ON共に発症せず、抵抗性であることが明らかとなった。タモキシフェン投与により、SATB1遺伝子発現を制御できる2D2-ER-ΔSATB1については、現在末梢CD4陽性T細胞をRAG2ノックアウトマウスに移入した後、タモキシフェン処理を行い経過観察中である。

(3) SATB1機能とT細胞応答に関する検討

これまでの検討から、Vav-ΔSATB1マウス

のT細胞ではTCRからのシグナル伝達が減弱している可能性が示唆される結果が得られていた。野生型マウスまたは、Vav-ΔSATB1マウス脾臓由来のナイーブCD4陽性T細胞を分離し、抗CD3抗体、抗CD28抗体により刺激した後、ZAP70、ERKについてそれぞれのリン酸化を調べた。その結果、野生型マウスに比べて、Vav-ΔSATB1マウスのナイーブCD4陽性T細胞では、ZAP70、ERKともにリン酸化が阻害されていた。サイトカイン受容体の下流で働くシグナル伝達分子については現在解析中である。

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 3件)

1. Kondo, M., Tanaka, Y., Kuwabara, T., Naito, T., Kohwi-Shigematsu, T., Watanabe, A. (2016). SATB1 plays a critical role in establishment of immune tolerance. *Journal of Immunology.*, 196, 563-572. (査読有り) DOI:10.4049/jimmunol.1600293
2. Hao, B., Nalk, A.K., Watanabe, A., Tanaka, H., Chen, L., Richards, H.W., Kondo, M., Taniuchi, I., Kohwi, Y., Kohwi-Shigematsu, T., and Krangel, M.S. (2015). An anti-silencer- and SATB1-dependent chromatin hub regulates Rag1 and Rag2 gene expression during thymocyte development. *J. Exp. Med.* 212, 809-24. (査読有り) DOI:10.1084/jem.20142207
3. Guo, X., Tanaka, Y., and Kondo, M. (2015). Thymic precursors of TCRab⁺CD8aa⁺ intraepithelial lymphocytes are negative for CD103. *Immunol. Lett.* 163, 40-48. (査読有り) DOI:10.1016/j.imlet.2014.11.007

[学会発表] (計 7件)

1. Nuclear protein SATB1 is required for development of experimental autoimmune encephalomyelitis. The annual meeting of the Japanese Society for Immunology 2015, oral presentation, November 19, 2015, Sapporo Convention Center (Hokkaido, Sapporo), Akiba Yasushi, Taku Kuwabara, Tanaka Yuriko, Naito Taku, Kondo Motonari
2. CD4⁺ effector T cells produce both IFN γ and IL-4. The annual meeting of the Japanese Society for Immunology 2015, poster presentation, November 18,

2015, Sapporo Convention Center (Hokkaido, Sapporo), Tanaka Yuriko, Inoue Akiko, **Kondo Motonari**

3. SATB1欠損マウスによる自己免疫疾患発症機序の解析 Kyoto T cell Conference 第25回学術集会 口頭発表、2015年5月15日、芝蘭会館（京都府京都市）、田中ゆり子、**桑原卓**、秋葉靖、Terumi Kohwi-Shigematsu、**近藤元就**
4. SATB1 is required for development of experimental autoimmune encephalomyelitis. The annual meeting of the Japanese Society for Immunology 2014, poster presentation, December 10, 2014, Kyoto International Conference Center (Kyoto, Kyoto), **Kuwabara, T.**, Akiba, Y., Tanaka, Y., Naito, T., **Kondo, M.**
5. The function of SATB1 in a mouse model for sjogren's syndrome. The annual meeting of the Japanese Society for Immunology 2014, oral presentation, December 10, 2014, Kyoto International Conference Center (Kyoto, Kyoto), Tanaka, Y., Sotome, T., **Kuwabara, T.**, Akiba, Y., **Kondo, M.**
6. 免疫寛容における分子制御機構の解析 Kyoto T cell Conference 第24回学術集会、口頭発表、2014年5月16日、京都平安ホテル（京都府京都市）、田中ゆり子、郭向華、向津隆規、早乙女壮彦、**桑原卓**、**近藤元就**
7. SATB1 遺伝子欠損マウスにおける自己免疫疾患の病態解析 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会、口頭発表、2014年5月9日、京都国際会館（京都府京都市）、早乙女壮彦、渡邊美砂、正田八州穂、小峰由美子、田中ゆり子、郭向華、**近藤元就**

〔その他〕

ホームページ等

http://www.med.toho-u.ac.jp/lab/lab_immunology.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 元就 (KONDO, Motonari)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：20594344

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

桑原 卓 (KUWABARA, Taku)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：40385563