

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860749

研究課題名(和文) C57BL/6背景のSKGマウスを用いたSLEの疾患モデルの構築

研究課題名(英文) Establishment of a lupus animal model by SKG mice on C57BL/6 background

研究代表者

橋本 求 (Hashimoto, Motomu)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60512845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：SKGマウス(BALB/c背景)は、関節リウマチのモデルマウスである。本研究では、遺伝的背景をBALB/c背景からC57BL/6背景に変えたC57BL/6 ZAP70^{skg/skg}マウス(B6 SKGマウス)が、種々のToll like receptor刺激後に、抗DNA抗体の産生や免疫複合体の沈着を伴うループス様腎炎を発症することを見出した。B6 SKGマウスでは、follicular helper T細胞(CXCR5⁺, PD-1^{high} Bcl6⁺)が自然に増大しており、そのためgerminal center B細胞(Fas⁺, GL-7⁺)が増大し自己抗体の産生に至ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：SKG mouse on BALB/c background is a murine model for rheumatoid arthritis. We backcrossed SKG mice into C57BL/6 background to generate SKG mice on C57BL/6 background (C57BL/6 ZAP70^{skg/skg} mice; B6 SKG mice). B6 SKG mice developed lupus like nephritis with immune complex deposition and anti-DNA antibody production after chronic stimulation with Toll like receptors agonists. In B6 SKG mice, follicular helper T cells (CXCR5⁺, PD-1^{high}, Bcl6⁺) were spontaneously expanded and helped forming the germinal center B cells (Fas⁺, GL-7⁺) to produce anti-DNA antibody.

研究分野：医歯薬学 内科系臨床医学 膠原病・アレルギー内科学

キーワード：全身性エリテマトーデス 動物モデル CD4 T細胞 T細胞レセプターシグナル Toll like receptor

1. 研究開始当初の背景

SKG マウス (BALB/c 背景) は関節リウマチのモデルマウスである。その原因は T 細胞刺激伝達系 (TCR) の主要分子である ZAP70 の点突然変異であり、この変異により、CD4T 細胞における TCR シグナル伝達刺激が伝わりにくくなることが知られている。TCR シグナル伝達の低下は、ヒトでは関節リウマチよりも SLE においてしばしば検出される遺伝子異常であることから、SKG マウスの遺伝的背景や環境因子を操作することにより、SLE のモデル動物が作成できるのではないかと考えた。その際、他の疾患モデルにおいて、BALB/c 背景よりも C57BL/6 背景のほうが SLE を発症しやすいことを考慮して、SKG マウスの遺伝的背景を C57BL/6 に変えることを試みた。また、SLE の発症に関与するとされる種々の Toll like receptor agonist の投与も試みた。また、SKG マウスは T 細胞 (TCR シグナル) に異常のあるマウスであるため、もし SLE を発症した場合は、T 細胞が自己抗体産生 B 細胞を誘導する場合に関与が指摘されている follicular helper T 細胞 (CXCR5 + PD1^{high} Bcl6+) の動態がどのように変化するかも観察することとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、関節リウマチの遺伝的背景を BALB/c 背景から C57BL/6 背景に変えることで、SLE のモデル動物を作成することである。

3. 研究の方法

- (1) BALB/c 背景の SKG マウスを、C57BL/6 マウスと掛け合わせることで、C57BL/6 背景の SKG マウス (C57BL/c ZAP70 skg/skg マウス) を作成する。
- (2) C57BL/6 背景の SKG マウスに、SLE の発症と関係するといわれている種々の自然免疫系の刺激 (Toll like receptor agonist)

を投与することで、SLE を発症するか観察する。

- (3) SLE の発症は、SLE に特異的な自己抗体である抗 DNA 抗体の産生と、腎組織における補体や免疫グロブリンの沈着により評価する。
- (4) もし SLE を発症した場合、自己抗体を産生する germinal center B 細胞 (Fas + , GL-7+) や、自己抗体の産生をヘルプする follicular helper T 細胞 (CXCR5+, PD-1^{high}, Bcl-6+) が増大しているかどうか、flow cytometry により評価する。

4. 研究成果

- (1) C57BL/6 背景の SKG マウスの種々の組織を調べたところ、SPF 環境で飼育し無刺激の状態であれば、病気を発症しない (wild type と変わらない) ことを見出した。
- (2) C57BL/6 背景の SKG マウスに、Toll like receptor (TLR) 3 の agonist である poly:I:C, TLR7 の agonist である loxorubin, TLR8 の agonist である CpG を、2週間から1か月の期間、持続的に投与した。その結果、投与を受けたマウスには、ループス様の腎炎が発症することを見出した。興味深いことに、複数回の総投与量と同等の量を、単回で投与したときにはループス様の腎炎は発症せず、慢性的な自然免疫の刺激が腎炎の発症に必要なことが分かった。TLR3、7、9 以外の TLR 刺激については、現在検討中であり、IFN- γ 産生の誘導能との関係は現在検討中である。なお、同様の刺激を wild type の C57BL/6 マウスや、BALB/c マウス、BALB/c 背景の SKG マウスに投与した際には、ほとんどループス様の腎炎の発症はみられなかった。
- (3) ループス様の腎炎を発症した C57BL/6 背景の SKG マウスにおいては、SLE に特異的な自己抗体である抗 DNA 抗体が血清中に

検出され、免疫組織学的染色により腎組織に補体 C3 や免疫グロブリン IgG が沈着しており、免疫複合体の沈着が認められると判断した。

(4) ループス様の腎炎を発症した C57BL/6 背景の SKG マウスの脾臓においては、自然と Germinal Center (PNA+ GL-7+ CD38-) が発達していることを、脾臓の免疫染色により確認し、それが、TLR agonist の投与により一層それが増大することを確認した。

(5) C57BL/6 背景の SKG マウスの脾臓では、flow cytometry により、Germinal Center B 細胞 (Fas+, GL-7+) や、CXCR5+, Follicular helper T 細胞 (PD-1high, Bcl-6+) が自然と増大しており、TLR agonist の持続投与のあとに、その population がさらに一層拡大することを見出した。

考察

SKG マウスにおける ZAP70 分子の点突然変異は、T 細胞刺激伝達を低下させる。BALB/c 背景の SKG マウスは関節リウマチのモデルマウスであるが、T 細胞刺激伝達系の低下は、ヒトでは SLE のリスク遺伝子であることから、遺伝的背景をかえた SKG マウスが SLE を発症しないかを本研究では研究した。C57BL/6 背景の SKG マウスが、TLR 刺激後にループス腎炎を発症したことにより、特定の遺伝的背景で、特定の環境因子が加われば、T 細胞刺激伝達系の低下している個体においては、SLE を発症するリスクがあることが示された。本研究結果は、T 細胞刺激伝達系の低下が、SLE の発症リスクになることを示す一つのモデルとなると考えられる。また、本研究では、follicular helper T 細胞や germinal center B 細胞の発達がループス腎炎の発病と密接にかかわっていることを明らかにしたが、これらはヒト SLE でも報告されており、本モデル

マウスが、ヒト SLE の病態を解明するための理想的なモデルとなりえることが示唆された。

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)

- (1) Ito Y, Hashimoto M, Sakaguchi S, et al. Detection of T cell responses to a ubiquitous cellular protein in autoimmune disease. *Science* 2014 17; 346: 363-8. doi:10.1126/science.1259077.
- (2) Hashimoto M, et al. Increase of hemoglobin levels by anti-IL-6 receptor antibody (tocilizumab) in rheumatoid arthritis. *PLoS One* 2014; 9: e98202.
- (3) Hashimoto M. et al. Periodontitis and *Porphyromonas gingivalis* in preclinical stage of arthritis patients. *PLoS One* 2015; 10(4): e0122121.
- (4) Iguchi-Hashimoto M, Hashimoto M. et al, The association between serious infection and disease outcome in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2016; 35(1): 213-8.

[学会発表] (計 3 件)

- (1) 松尾崇史、橋本求 Development of lupus like nephritis on C57BL/6 ZAP70^{skg/skg} mice. Japan Society of Rheumatology International Seminar 2015 長野・軽井沢
- (2) 森将人、橋本求ら、滑膜繊維芽細胞との細胞接触が CD4T 細胞のサイトカイン産生に与える影響 第 58 回日本リウマチ

学会総会・学術集会 2014 東京

(3)橋本求ら 歯周病菌 Red complex の存在
は、関節リウマチの治療抵抗性と関係する
第 58 回日本リウマチ学会総会・学術
集会 2014 東京

(2)研究分担者

(3)連携研究者

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

橋本 求 (HASHIMOTO, Motomu)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号： 6 0 5 1 2 8 4 5