

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24791134

研究課題名(和文) ROR γ t 発現が CD4+ T 細胞の誘導に及ぼす影響の研究研究課題名(英文) Influence of ROR γ t expression in CD4+ T cell induction

研究代表者

藤澤 康弘 (Fujisawa, Yasuhiro)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：70550193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000 円

研究成果の概要(和文)：インターロイキン17産生T細胞(Th17)の制御転写因子であるROR γ tを発現させた血球系幹細胞を移植したマウスにおいて、接触皮膚炎の減弱が見られた。その減弱には制御性T細胞(Treg)の関与が考えられ、実際に骨髄移植マウスでTregの数が上昇した。しかし、このマウスを長期間飼育すると自己免疫疾患である白斑、脱毛および脱肛が生じた。これは接触皮膚炎で見られた免疫能の抑制とは全く逆の結果であった。そこでTregの活性との関連を検討すべく、Neuropilin-1分子をCD4+T細胞に発現するトランスジェニックマウスの作成を試みたが、目的の遺伝子が挿入されたlitterを得ることが出来なかった。

研究成果の概要(英文)：Mice transplanted with bone marrow stem cells transduced with ROR γ t which controls interleukin-17 producing T cells (Th17) showed reduced contact hypersensitivity reaction. Regulatory T cells (treg) might have some role in this phenotype and indeed, the number of Treg was increased in these mice. On the other hand, these mice developed vitiligo, alopecia, and rectal prolapse after long-term breeding. These phenotypes are considered to be an autoimmune disease and conflict to the result of contact hypersensitivity. Thus, next we attempted to make neuropilin-1 transgenic mice to investigate correlation between Treg activity and these phenotypes. However, we could not get litter mate.

研究分野：皮膚科

キーワード：Th17細胞 ROR γ t 接触皮膚炎

1. 研究開始当初の背景

CD4 陽性細胞 (CD4+) のエフェクターとしては細胞性免疫にかかわる Th1, 液性免疫に関与する Th2, そして免疫調整に関与する制御性 T 細胞 (Treg) の 3 つが既知のサブセットであった。その後, インターロイキン 17 (IL-17) を産生する Th17 と呼ばれるサブセットが新たに同定された。Th17 は IL-17 産生による細胞外病原体の排除, 炎症部位への好中球の誘導, そして細胞性免疫の関与することが明らかとなってきたが, 皮膚の免疫系に与える影響 (接触皮膚炎など) との関連について検討した研究は調べ得た限りなかった。そこで Th17 を誘導する転写因子 ROR γ t を導入した血球幹細胞を移植することで誘導される Th17 が皮膚免疫に与える影響についての検討を行うこととした。

2. 研究の目的

Th17 を誘導する転写因子 ROR γ t を発現する血球細胞が皮膚の免疫系に及ぼす影響について明らかにすることを目的とする。ROR γ t 遺伝子を導入した血球幹細胞移植マウスモデルを作成したところ, Th17 の誘導はみられたが, 予想とは逆に接触皮膚炎反応が減弱することを見出した。これまでの解析で, このマウスでは Th1 の誘導は減弱し, 制御性 T (Treg) の誘導は増強することがわかった。この実験結果は ROR γ t の働きがこれまでに知られている Th17 の誘導にとどまらないことを示しており, その詳しい分子生物学的なメカニズムについて明らかにすることで, これまでに知られていない Treg の誘導メカニズムを用いた新たな炎症性疾患や自己免疫性疾患の治療アプローチを見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

Th17 過剰発現モデルとして血液幹細胞に Th17 の制御因子である ROR γ t の cDNA を導入したものを放射線照射マウスに骨髄移植する。ROR γ t の cDNA はマウス胸腺から逆転写した cDNA ライブラリより PCR 法により増幅し, 得た amplicon を TA クローニングしたものを大腸菌に導入, 得られたコロニーを制限酵素処理で目的の cDNA を選別する。最終候補を Sequence して変異が無い事を確認したものを使用する。

レトロウイルスベクター GCDNsam / IRES-NGFR に ROR γ t 遺伝子を挿入したプラスミドを導入したパッケージング細胞 293gpg より得たレトロウイルスを用いて血球系幹細胞 (Lineage negative, c-kit positive cells: KL cell) に遺伝子導入したのちに, 450cGy \times 2 照射したレシピエントマウスに尾静脈より投与する。投与後 4~6 週間で骨髄の再構築が終了するのでここから実験を

開始する。

1) 接触皮膚炎モデル

Th1, Th17, Treg のサブセット解析, 各サブセット毎に分離して移植, これによりどのサブセットの移植で現象が移植できるかを検討。これにより接触皮膚炎と各サブセットとの関連を明らかにする。発症マウスにおけるサブセットの割合を検討した上でそれを参考にサブセット間での組み合わせた移植も行う。

2) 白斑モデル

8 週後以降に発症するため, 解析はそれ以降に行う。

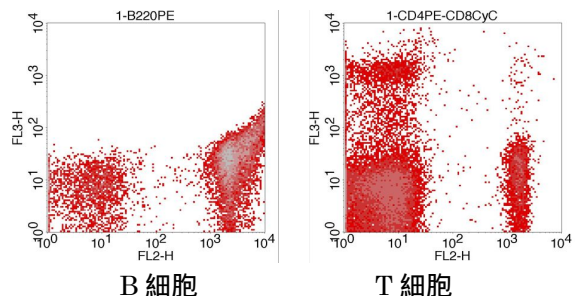
皮膚移植: 発症マウスの移植片には病態の発症や維持に関与する細胞が存在すると考えられることから未発症マウスの健常皮膚に同様の病態を発生させようかを検討する。

T 細胞をサブセットごとに分離し移植: ドナーマウスの脾臓より採取した細胞を表面抗原ごとに分離しワイルドタイプマウスに移植。ROR γ t 発現細胞のみをタグの NGFR で分離し移植が可能である。T 細胞サブセットごとや各サブセットとの組み合わせで病態が再現できるかを検討する。

同定された病因となるサブセットの抑制: 疾患の治療の可能性を検討する。中和抗体の使用や, 自殺遺伝子 HSV-tk をレトロウイルスベクターで導入し目的とするタイミングで作動させる。

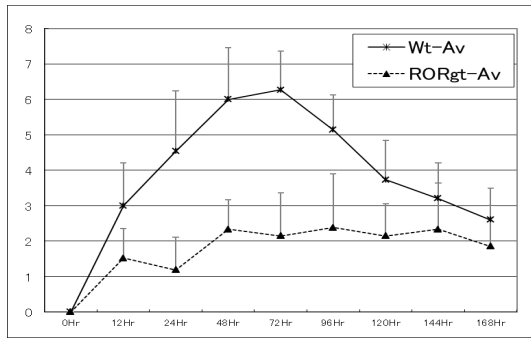
4. 研究成果

移植モデルについて, ROR γ t の cDNA を導入した血球系幹細胞 (KL cells) を移植し, 末梢血における血球の再構築をまず検討した。その結果, T 細胞系/B 細胞系/顆粒球系いずれもワイルドタイプと同等のレベルに達したことを確認した。

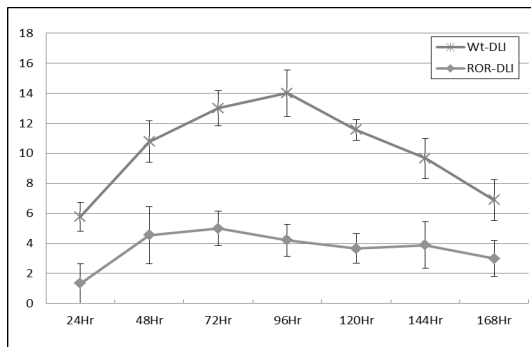


1) DNFB による接触皮膚炎

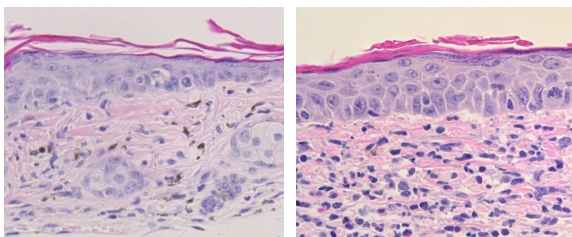
コントロールと比較して骨髄移植マウスでは接触皮膚炎の程度が軽度であった。



この骨髄移植したマウスから T細胞を採取してワイルドタイプに輸注すると、その減弱効果が再現されたことから、この減弱効果は T細胞によるものと考えた。



耳介からの病理標本を検討したところ、ワイルドタイプマウスの炎症惹起耳介では表皮直下には超密な炎症細胞浸潤が見られたのに対して、骨髄移植したマウスでは炎暑細胞の浸潤が著明に低下していた。

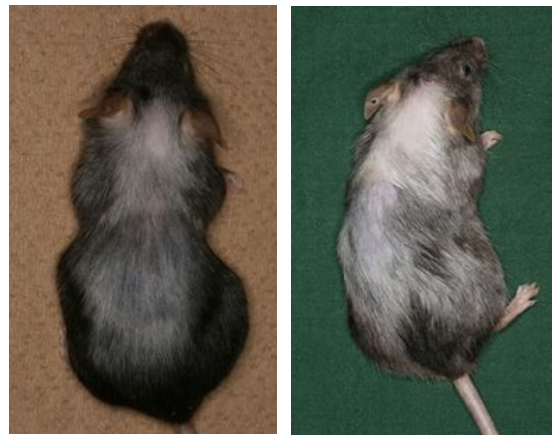


骨髄移植マウス ワイルドタイプ

免疫調整に重要な役割がある制御性 T細胞サブセット (Treg) についても検討したところ、骨髄移植マウスで Treg の割合が上昇していた。

2) 白斑

移植後 8 週間後から白斑が発現し、20 週になるとその範囲は全体に広がった。



12 週

20 週

白斑部の病理組織を検討したが、すでに免疫反応は収束しており免疫細胞の有意な集積はみられなかった。したがって、差を見るためには白斑が生じた直後ないしはそれより更に前である必要性が考えられた。

3) 脱肛

今回の観察していくなかで、骨髄移植を受けたマウスの中に脱肛を起こす個体が出現した。



脱肛マウス 1

脱肛マウス 2

脱肛は主に大腸の炎症を反映して居ることから、何らかの免疫反応が腸管で起きていることが考えられた。

以上の実験結果を総合すると、RORγt を導入した血球系幹細胞を移植することで起きてくるこれらの現象は、接触皮膚炎モデルでは炎症を抑制する方向に、白斑や脱肛は逆に炎症を促進する方向に働いていることがわかる。つまり、炎症反応の部位ないしはその原因によって炎症が促進されるか抑制されるかが別れていることから、単に RORγt の発現による Th17 の増加だけでは説明が出来ない。脱肛は腸管に多いとされる Treg の減少でも起きることから、Treg の機能異常または局在の異常により起きていることが示唆された。

RORyt の遺伝子導入に使用していたレトロウイルスベクター GCDNsam/RORyt/IRES-NGFR を産生するパッケージング細胞 293gpg について、初代の株は東日本震災時にフリーザーの電源が切れたことで失ってしまったことから、ストックしていたウイルスを確認実験で使用して在庫が切れた段階で改めてパッケージング細胞から作成する作業を行った。しかしそこで得られたウイルスベクターの感染効率が低く、実験に不向きであった。その後数回にわたり改めて作成し直したが当初の感染効率が得られず、骨髄移植実験の計画が大幅に遅れることとなった。

そこで、今回の現象に Treg が関与していることは明らかであったことから、Treg の誘導に関与する Neuropilin-1 分子に着目し、Neuropilin-1 を CD4T 細胞だけに発現させるトランスジェニックマウスを作成して Treg の挙動についての検討を併せて行うことと、脱肛はインターロイキン 10 (IL-10) ノックアウトマウスでも見られることから、近年注目されている IL-10 産生 B 細胞サブセット (B10) についてもその発現の検討も追加で行う事とした。

CD4 プロモータの下流に Neuropilin-1 遺伝子を挿入した発現カセットを作成し、受精卵にマイクロインジェクションした卵子を子宮に戻す手法でトランスジェニックマウスの作成を試みた。しかし、100 を超える候補マウスのスクリーニングを行ったが、マーカーとなる GFP の発現を CD4T 細胞で確認することが出来なかった。体細胞 DNA を PCR により挿入遺伝子の有無も確認したが、いずれの個体からも挿入遺伝子は見つからなかった。発現カセットのシーケンスも行い配列にも問題が無かったことから、手技の問題以外に発現個体の胎生致死の可能性も考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤澤 康弘 (FUJISAWA Yasuhiro)
筑波大学医学医療系・講師

研究者番号：70550193

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：