

加齢に伴う免疫不全のメカニズム解析 ～サイトカイン分泌異常マウスをモデルとして～

[1] 組織

代表者：竹馬 俊介
(京都大学大学院医学系研究科)
対応者：小笠原 康悦
(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費72万9千円，旅費7万1千円

[2] 研究経過

加齢にともない、自己、非自己の認識の緩みによる自己反応性T細胞の出現や、免疫応答性の低下など種々の免疫異常が起こってくるのが知られている。慢性関節リウマチに代表される自己免疫疾患は、高齢者に多発し、胸腺でのT細胞選択能の低下による自己反応性T細胞の出現、および、**抹消でのT細胞異常**、と密接に関係している。

申請者はこれまで、加齢にともなって自己免疫疾患を自然発症するPD-1遺伝子欠損マウスの解析から、**抹消T細胞のIL-2産生が自己免疫疾患に深くかかわっている**ことを明らかにしてきた。生体内で、IL-2が過剰に発現すると、自己反応性T細胞の応答性が解かれ、自己免疫疾患の原因となり得る。逆に、IL-2の分泌不全は制御性T細胞の機能不全を起し、同じく自己免疫疾患の発症につながる事が示されている。そこで、加齢による自己免疫疾患にもIL-2の調節不全が関わっていると考えた。

一過性のIL-2発現には、T細胞レセプターによって活性化される生化学的カスケードが詳細に解析されているが、核内でIL-2の転写を長期にわたって調節する因子はよく分かっていない。代表者はこの点に着目し、今までのスクリーニング実験により、IL-2の発現制御因子として、核内タンパク質であるITAG-2分子を新規に同定した。当研究では、申請者が独自に作成した、**ITAG-2遺伝子欠損マウス**を用いて、**加齢変化に伴うT細胞異常をIL-2産生機構の観点から追究**することを目的とする。

昨年までの研究で、(T細胞におけるITAG-2の機能を解析するため、ITAG-2の機能エクソンを、

大腸菌由来Lox配列で挟み込んだマウス(ITAG-2Lox)を、リンパ球キナーゼプロモーターCREトランスジェニックマウス(Lck-CRE)に交配し、コンディショナルノックアウトマウスを作製、解析している。ITAG-2コンディショナルノックアウトマウス(以下ITAG-2マウス)を、6か月程度飼育することにより、これらマウスが、リンパ球数の増加にともなうリンパ組織の肥大といった自己免疫様の症状を示すことがわかった。この表現形が、当初考えていたIL-2不全のみで説明できるのか、または別の異常によるものなのか興味深く、引き続き個体数を増やして解析を行っている。

以下、本年度研究活動状況の概要を記す。本研究を遂行する上で研究打ち合わせを、平成24年2月28日に、加齢研にて行った。In vivoでの解析を主に行う代表者が加齢研へ出向し、対応者である小笠原康悦博士との間で、これまでの研究経過、およびプロジェクトの方向性について討論した。また、小笠原研究室のメンバーと、最新のデータについて討論した。結果、当研究の今後の方向性などについて提案を受けることができ、たいへん有意義な会合を持つことができた。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

- 1) SPF環境下で飼育したITAG-2マウスを、長期間(1~2年)観察することにより、これらのマウスが野生型コントロールに比較して、早期に死亡することがわかった。これまでの解析より、ITAG-2マウスに起こる自己免疫様症状が、早期死亡の原因であると仮定し、免疫学的な手法を用いて表現形解析を行った。まず、6か月齢のマウスより血清を採取し、同系マウスの臓器抽出液に対する反応性をウエスタンブロット法により調べた。結果、ITAG-2マウス由来の血清は、野生型に比べて多くの免疫グロブリンを含み、(高免疫グロブリン血症)、この血清はさまざまな臓器(肺、唾液腺、心臓、皮膚、膵臓、腸など)からの抽出液に反応した。このことにより、ITAG-2マウスは、体内の多くの抗原に対し、自己抗体を産生することがわかつ

た。また、ITAG-2 マウスの観察中、疲弊、体重減少、被毛粗剛など、全身状態が悪いと判断されたマウスを犠牲死させ、解剖、および病理組織検査を行った。その結果、これらのマウスには、Tリンパ球の増加を伴うリンパ節、脾臓の顕著な腫大、多臓器（唾液腺、腎臓、膵臓、肝臓、肺など）における単核球浸潤性の炎症像が観察された。あわせて、ITAG-2 マウスは、加齢に伴って多くの臓器に対し重篤な自己免疫症状を自然発症することが明らかになった。

- 2) 自己免疫様症状を自然発症する以前の、若いITAG-2 マウスに対し、脳抗原である、ミエリン塩基性タンパク由来ペプチドを免疫し、実験的脳脊髄炎（experimental autoimmune encephalitis; EAE）を誘導した。ITAG-2 マウスは、野生型コントロールマウスに比較して、重篤、かつ長期にわたる病状を示した。EAE誘導1カ月後のマウスから、CD4 陽性Tリンパ球を精製し、同系マウスの脾臓、および、EAE誘導に用いたペプチド抗原で、*in vitro* 再刺激を行ったところ、これらのリンパ球が、炎症性サイトカインであるIL-17を多く産生することがわかった。以上の結果より、ITAG-2 分子は、体内で、ナイーブT細胞から炎症性細胞の分化を抑制する、自己免疫抑制因子であることが示唆された。
- 3) ITAG-2 分子はクロマチンと会合し、ヒストン化学修飾を起こす機能分子であることが文献的に示唆されている。ITAG-2 による自己免疫抑制機構の一端を明らかにするため、マイクロアレイ解析により、ITAG-2 欠損Tリンパ球の発現遺伝子を、野生型のT細胞と比較した。その結果、ITAG-2 欠損Tリンパ球では、IL-2 遺

伝子の他に、TGF- β 遺伝子をはじめとする、多くのサイトカイン遺伝子の発現調節に異常をきたしていることがわかった。これら免疫関連サイトカインの調節不全が、全身性のサイトカインバランスを崩し、ITAG-2 マウスに見られる自己免疫様症状の発症に関わっていると考えられた。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究では当初、加齢にともなうIL-2 調節の観点からITAG-2 分子に注目したが、ITAG-2 がIL-2 以外にも多くの免疫関連遺伝子の調節に関わっていることがわかってきた。また、これまでの表現形解析より、ITAG-2 遺伝子が、自己免疫抑制遺伝子であることは明らかである。マイクロアレイから同定されたITAG-2 関連遺伝子には多くの免疫調節性サイトカイン、および新規分泌タンパクが含まれ、今後、これらの機能を明らかにすることによって、自己免疫発症機構を包括的に理解する研究へと発展する可能性がある。

[4] 成果資料

該当なし