

研究報告書

「イオンバランス破綻による自己免疫疾患の重症化機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年4月～平成26年3月

研究者: 大洞 将嗣

1. 研究のねらい

カルシウムやマグネシウムなどのイオンは、生体の機能や個体の正常な発生・分化に非常に重要である。生体内におけるイオン濃度は、様々なイオンチャネルやその制御分子によって厳密に制御されており、制御機構の破綻は自己免疫疾患など様々な重症疾患を惹起する。特に自己免疫疾患は、全身あるいは局所的な慢性炎症による組織破壊を伴う難治性疾患である。本研究課題は、細胞内シグナル伝達においてセカンドメッセンジャーとしても機能し、末梢免疫寛容の成立に重要な役割を果たすことが知られているカルシウムイオンに焦点を当てた。

様々なカルシウム流入機構のうち、ストア作動性カルシウム流入は、リンパ球などの免疫細胞、平滑筋や骨格筋などで機能しており、チャネル ORAI1 と制御分子 STIM1 と STIM2 によって制御されている。先天的あるいは後天的にストア作動性カルシウム流入の機能が欠損する患者は、自己免疫疾患や筋形成不全などを発症する。一方、ストア作動性カルシウム流入の亢進が認められる例として、慢性炎症疾患である喘息における気道平滑筋の増殖を伴う気道リモデリングがある。しかしながら、ストア作動性カルシウム流入機構の異常が疾患を発症・重症化する詳細なメカニズムは未知な部分が多く残されている。そこで本研究課題は、特にストア作動性カルシウム流入機構の障害によって惹起される自己免疫疾患を疾患モデルとして用い、カルシウムイオンの制御を喪失した場合における自己免疫疾患の発症・重症化メカニズムを明らかにすることを目的とした。

2. 研究成果

(1) 概要

- スストア作動性カルシウム流入の欠損による自己免疫疾患発症メカニズムの解明

STIM1 と STIM2 を T 細胞特異的あるいは全免疫細胞で欠損するマウスを樹立し、T 細胞分化の解析を行った。その結果、自己を攻撃する有害な T 細胞を除去する「負の選択」には部分的な障害が認められた。さらに、免疫反応を抑制する Foxp3 陽性の制御性 T 細胞、iNKT 細胞、CD8 α 陽性 TCR α β 陽性の腸管上皮間リンパ球といった「アゴニスト選択」を受ける T 細胞分化の選択的な障害されていることを見いだした(発表論文1)。したがって、ストア作動性カルシウム流入の欠損では、免疫反応を抑制する T 細胞の喪失、自己反応性 T 細胞の不完全な除去が原因となり、自己免疫疾患を発症することが明らかとなった。

- シェーグレン症候群におけるストア作動性カルシウム流入の役割

本マウスはシェーグレン症候群を発症することを発見し、さらにシェーグレン症候群患者の末梢血においても、疾患の重症度が進行するにつれて、STIM1 や STIM2 の発現が低下することを明らかにした(発表論文2)。

- IL-4 産生細胞の同定とその制御機構および胚中心形成の分子機構の解明

IL-4 による自己免疫疾患が重症化する過程の解析を行った。まず、カルシウム流入欠損による自己免疫疾患マウスにおいて IL-4 をさらに欠損したマウスは、血清中の IgE 濃度の上昇や各組織における炎症が全て著しく軽減された。IL-4 レポーターマウスの解析から、このマウスでは全身性に IL-4 産生が亢進しているわけではなく、一部の免疫細胞（濾胞ヘルパー T 細胞と好塩基球）が IL-4 の産生を担っていることが判明した。この濾胞ヘルパー T 細胞の分化を障害することによって、やはり自己免疫疾患の病態がかなり軽減されることも明らかにした。

以上のことから、ストア作動性カルシウム流入の欠損による自己免疫疾患モデルでは、免疫反応を抑制する T 細胞の喪失と自己反応性 T 細胞の不完全な除去の2つの原因によって自己免疫疾患を発症し、IL-4 を産生する濾胞ヘルパー T 細胞への分化亢進を招くことによって、自己免疫疾患が進行・重症化することが明らかとなった。

(2) 詳細

● スストア作動性カルシウム流入の欠損による自己免疫疾患発症メカニズムの解明
ストア作動性カルシウム流入は、リンパ球などの免疫細胞における最大のカルシウム流入機構であり、チャネル ORAI1 と制御分子 STIM1 と STIM2 によって制御されている。先天的にストア作動性カルシウム流入を欠損する患者は、免疫不全症や自己免疫疾患を発症するが、その発症機序や病態の進行メカニズムは不明である。そこで、本項目では、モデル生物であるマウスを用いて、制御分子 STIM1 と STIM2 を欠損するマウスを樹立し、自己免疫疾患の発症メカニズムを解析した。HY 抗原特異的な T 細胞受容体 (TCR) を発現するマウスの解析から、機能的な T 細胞を選別する「正の選択」には全く影響が認められなかった。この結果はヒトの末梢血で成熟 T 細胞が認められることと一致した。一方、HY-TCR マウスやスーパー抗原に対する反応性を解析した結果、自己を攻撃する有害な T 細胞を除去する「負の選択」には部分的な障害が認められた。驚くべきことに、免疫反応を抑制する Foxp3 陽性の制御性 T 細胞、iNKT 細胞、CD8 α 陽性 TCR $\alpha\beta$ 陽性の腸管上皮間リンパ球といった「アゴニスト選択」を受ける T 細胞分化が全て障害されていることを見いだした。この分化障害メカニズムの詳細な解析を行ったところ、アゴニスト選択を受けた直後の前駆細胞までの分化は正常に行われているが、選択後の増殖や分化が完全に障害されていた。この障害は、カルシウム依存性の転写因子 NFAT の標的分子 CD25、Foxp3、CTLA-4、Egr2、さらに Egr2 の標的分子である CD122 や PLZF の発現が十分に行われないうえであることを明らかにした(図1)(発表論文1)。これらの分子は、マスター転写因子であったり、選択後の増殖や機能に関与する分子である。したがって、ストア作動性カルシウム流入はこれらの発現を維持することによって、アゴニスト選択性 T 細胞の分化を制御していると考えられる。

以上の結果から、ストア作動性カルシウム流入の欠損によって、抑制性 T 細胞の全喪失と自己反応性 T 細胞の不完全な除去の2つの原因によって自己免疫疾患を発症すると考えられた。

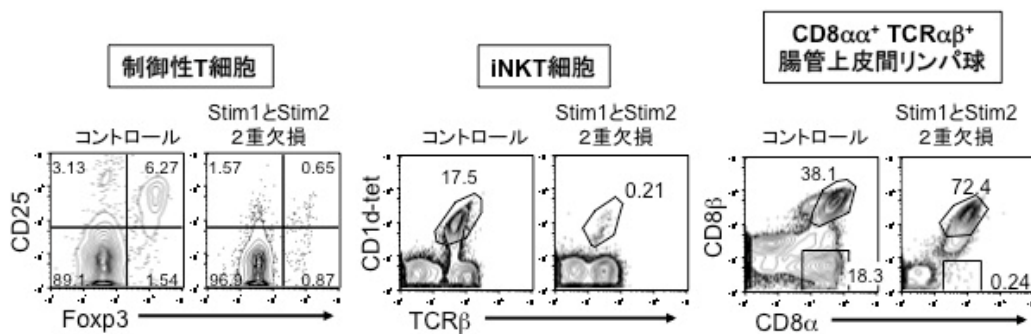


図1 アゴニスト選択性T細胞の消失

● シェーグレン症候群におけるストア作動性カルシウム流入の役割

米国 NIH の共同研究者とともに、STIM1 と STIM2 を欠損するマウスが、シェーグレン症候群様の表現系を示すことを見いだした。マウスの血清中において、シェーグレン症候群のマーカーである抗 SSA や抗 SSB を認め、顎下腺への異常なリンパ球浸潤による組織破壊と唾液の分泌低下を認めた。さらに、米国の原発性シェーグレン症候群患者の末梢血リンパ球では、疾患の進行・重症度に応じて STIM1 と STIM2 の発現レベルが低下し、重症患者では、STIM1 と STIM2 はほとんど発現していないことを明らかにした(発表論文2)。

● IL-4 産生細胞の同定とその制御機構および胚中心形成の分子機構の解明

STIM1 と STIM2 を欠損するマウスは、強い T_H2 型の炎症を伴って自己免疫疾患を発症する。そこで、この病態に IL-4 がどの程度関与しているのかを検討するために、IL-4 遺伝子座を GFP 遺伝子に置換したノックインマウス(G4)を用いて解析を行った。このマウスを使用する利点は、ヘテロではレポーターマウス、ホモマウスは IL-4 欠損マウスとして使用できる点である。STIM1 と STIM2、さらに IL-4 を欠損した3重欠損マウスでは、炎症や組織破壊がほとんど認められなかった。したがって、IL-4 が本病態において中心的な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに G4 ヘテロマウスの解析から、IL-4 を産生している細胞は、濾胞ヘルパーT(T_{FH})細胞と好塩基球であることが明らかとなった。このストア作動性カルシウム流入の欠損による病態モデルでは、IL-4 産生 T_{FH} 細胞の分化は NFAT2 で制御されていることが明らかとなった。現時点で、 T_{FH} 細胞の分化に必須のリプレッサー分子 Bcl6 の発現が著明に減少することだけは判明しているが、NFAT2 による T_{FH} 細胞の詳細な分化メカニズムは不明であり、解析を継続中である。

以上の3項目の結果から、ストア作動性カルシウム流入の欠損による自己免疫疾患モデルでは、免疫反応を抑制するT細胞の喪失と自己反応性T細胞の不完全な除去の2つの原因によって自己免疫疾患を発症し、IL-4 を産生する濾胞ヘルパーT 細胞への分化亢進を惹起することによって、自己免疫疾患が進行・重症化すると考えられた(図2)。

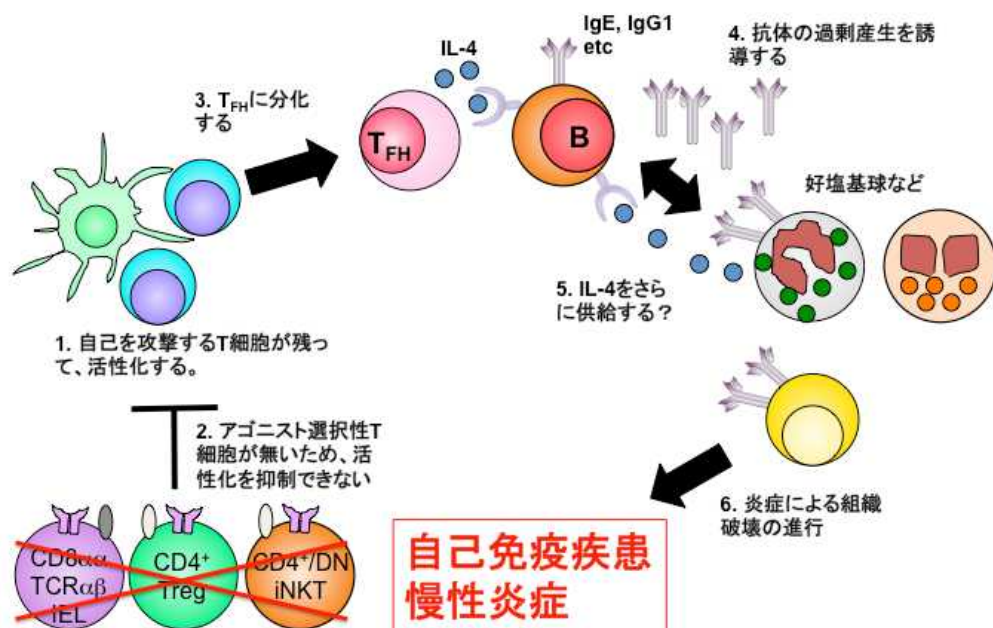


図2 本研究の成果から考えられるモデル

3. 今後の展開

本研究により、ストア作動性カルシウム流入の欠損によって自己免疫疾患を発症するメカニズムと進行・重症化するメカニズムを明らかにできた。特に、制御性T細胞をはじめ全ての抑制系T細胞の分化だけではなく、その抑制機能の獲得にも重要であることを示したことは、ヒト疾患における新規のマーカーあるいは治療法の開発につながると考えられる。実際に、共同研究によって、シェーグレン症候群患者の末梢血リンパ球におけるストア作動性カルシウム流入の機能不全が、疾患の重症度と共に認められることを明らかにできた成果は、今後の疾患マーカーへの応用を考える上で非常に有益な成果であった。

今後、STIM1、STIM2、ORAI1の発現制御機構を解明し、がんや自己免疫疾患など、疾患ごとにカルシウムイオンの恒常性の破綻が惹起する疾患のメカニズムを明らかにし、治療標的分子としての可能性を追求したいと考えている。

4. 評価

(1) 自己評価

生体イオンのうち、カルシウム流入機構の破綻による自己免疫疾患の発症とその重症化機構の解明を目指した本研究課題は、概ね当初の計画通りに進んだ。特に、マウスモデルを用いて、「カルシウム流入の欠損が抑制機能を持つT細胞の分化や機能を一時的に制御する」という成果は、カルシウム流入の新たな機能を明らかにした点で注目に値する。しかし、シェーグレン症候群患者において、疾患の進行と共にSTIM1やSTIM2の発現が減少することを発見

することができた一方で、そのメカニズムを明らかにすることができなかった点は反省すべき点である。今後、転写領域の解析や適切な疾患モデルの選択によって、炎症がカルシウムイオンなどの恒常性を破綻させるメカニズムを解明に取り組む予定である。

(2) 研究総括評価(公開項目)

チャネル ORAI1 と制御分子 STIM1 と STIM2 によって制御されるストア作動性カルシウム流入が、胸腺において「アゴニスト選択」を受ける一連の免疫抑制性の T 細胞 (Foxp3 陽性の制御性 T 細胞、iNKT 細胞、CD8 α 陽性 TCR α β 陽性の腸管上皮間リンパ球) の発生時における選択後の増殖や分化に必須であることをマウスで発見するとともに、その分子メカニズムを明らかにした。ストア作動性カルシウム流入の欠損は、抑制性 T 細胞の全喪失と自己反応性 T 細胞の不完全な除去を引き起こし、その結果 IL-4 を産生する濾胞ヘルパー T 細胞への分化亢進を惹起することによって自己免疫疾患を発症し、さらに IL-4 を産生する濾胞ヘルパー T 細胞への分化を亢進することで病態が進行・重症化することを示した。また、シェーグレン症候群患者の末梢血においても、疾患の重症化に伴い、STIM1 や STIM2 の発現が低下することを明らかにするなど、質の高い論文成果につなげたことは大いに評価できる。今後は、シェーグレン症候群などの自己免疫性の難治性疾患におけるストア作動性カルシウム流入を制御する分子の発現状況が疾患の発症や重症度のマーカーとなり得るのかを明確化すること、さらには疾患の予防や治療の標的分子を同定することが期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Oh-hora, M., Komatsu, N., Pishyraeh, M., Feske, S., Hori, S., Taniguchi, M., Rao, A. and Takayanagi, H. Agonist-selected T cell development requires strong T-cell receptor signaling and store-operated calcium entry. *Immunity* 38, 881-895 (2013)
2. Cheng, KT., Alevizos, I., Liu, X., Swaim, WD., Yin, H., Feske, S., Oh-hora, M. and Ambudkar, IS. STIM1 and STIM2 deficiency in T lymphocytes underlies development of exocrine gland autoimmune disease, Sjögren's Syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 14544-14549 (2012)
3. Li, T., Finch, EA., Graham, V., Zhang, ZS., Ding, JD., Burch, J., Oh-hora, M. and Rosenberg, P. STIM1-Ca²⁺ signaling is required for the hypertrophic growth of skeletal muscle in mice. *Mol Cell Biol* 32, 3009-3017 (2012)
4. Nakashima, T., Hayashi, M., Fukunaga, T., Kurata, K., Oh-hora, M., Feng, JQ., Bonewald, LF., Kodama, T., Wutz, A., Wagner, EF., Penninger, JM. and Takayanagi, H. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med* 17, 1231-1234 (2011)
5. Zeiger, W., Ito, D., Swetlik, C., Oh-hora, M., Villereal, ML. and Thinakaran, G. Stanninocalcin 2 is a negative modulator of store-operated calcium entry. *Mol Cell Biol* 31, 3710-3722 (2011)

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(A)学会発表

1. Oh-hora, M., Komatsu, N., Rao, A. and Takayanagi, H. Store-operated calcium entry is crucial for the development of agonist-selected T cells. The 23rd Hot Spring Harbor International Symposium, Fukuoka, Japan (2013/11/5)
2. Oh-hora, M., Komatsu, N., Rao, A. and Takayanagi, H. Store-operated calcium entry is crucial for the development of agonist-selected T cells. FASEB scientific research conference, Nassau, The Bahamas (2013/6/10)
3. 大洞将嗣、小松紀子、Anjana Rao、高柳広、T細胞分化とストア作動性カルシウム流入 第22回東京免疫フォーラム(東京)(2013年3月14日)
4. Oh-hora, M., Komatsu, N., Feske, S., Hori, S., Rao, A. and Takayanagi, H. Strong TCR/calcium signaling specifically controls the development of regulatory T cell subsets. Frontiers in Immunology and Inflammation, Tokyo, Japan (2013/2/12)
5. Oh-hora, M., Komatsu, N., Feske, S., Hori, S., Rao, A. and Takayanagi, H. Strong Agonist-selected T cell development requires strong TCR/calcium signaling. 41st Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Kobe, Japan (2012/12/5)
6. 大洞将嗣、小胞体カルシウムセンサーSTIMによるT細胞の分化制御 第8回骨免疫ワークショップ(東京)(2012年11月2日)
7. 大洞将嗣、STIM依存性カルシウム流入によるT細胞の分化制御 第122回小児血液腫瘍懇話会(東京)(2012年11月2日)
8. 大洞将嗣、小松紀子、Anjana Rao、高柳広、Agonist-selected T cell development requires strong TCR/calcium signaling. 第22回 Kyoto T cell Conference(京都)(2012年7月6日)
9. 大洞将嗣、Lineage-specific requirement of store-operated calcium entry in T cell lineage development. 第21回 Kyoto T cell Conference(京都)(2011年6月10日)
10. 大洞将嗣、小松紀子、Anjana Rao、高柳広、STIM依存性カルシウム流入によるT系列細胞の分化制御、第7回 TRP チャンネル研究会(岡崎)(2011年6月2日)

(B)受賞

なし

(C)著作物

1. 大洞将嗣、高柳広、カルシウムシグナリング、シグナル伝達キーワード事典、87-89 (2012)
2. 大洞将嗣、黒崎知博、免疫(2)獲得免疫、シグナル伝達キーワード事典、239-249 (2012)

(D)プレスリリース

1. 大洞将嗣, 過剰な免疫反応にブレーキをかける T 細胞が作られる共通の仕組みを解明, JST と東京医科歯科大学による共同発表, <http://www.jst.go.jp/pr/announce/20130315/index.html> (2013)