

令和 3 年 4 月 23 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08385

研究課題名(和文) アンチエイジングで全身性血管炎における制御性T細胞の制御機能を回復する

研究課題名(英文) Anti-aging application for repairing regulatory T cell function in systemic vasculitis

研究代表者

下島 恭弘 (Shimajima, Yasuhiro)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：50436896

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)：ANCA関連血管炎(AAV)を対象として、制御性T細胞(Treg)の制御機能障害に関わる要因の解明と制御機能の回復を目的に研究を行った。AAV患者のTregでは、活性酸素(ROS)の産生亢進および長寿遺伝子であるSirt1の活性低下がmTORのリン酸化を促進して、Tregの制御機能障害に影響している事が示された。レスベラトロール(RVL)で刺激培養を施したTregでは、ROSの産生抑制およびSirt1の活性化とともにmTORのリン酸化は制御され、制御機能には回復が認められた。AAVのTregでは、RVLの抗酸化作用および抗免疫老化作用により機能回復に寄与する事が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、AAVをはじめリウマチ膠原病領域における治療戦略は進歩を続けているが、未だ完治は難しく再発再燃が多くの患者で経験される。本研究の成果は、本来私たちに備わった免疫制御機構の中心を担う制御性T細胞(Treg)に焦点を当てた研究であり、より生理的な手法でTregの機能回復を試みた結果であることから、将来の免疫調整療法の開発に寄与する可能性が期待される。またこの手法が治療薬の開発に結びつけば、併用によって副腎皮質ステロイドを含む従来の免疫抑制薬の減量効果に寄与できる可能性も考慮される。

研究成果の概要(英文)：We explored the etiological mechanism for impairing functional ability of regulatory T cells (Tregs), in order to improve Tregs function, in ANCA-associated vasculitis (AAV). The phosphorylation of mTOR was found to be induced ascribable to increase in reactive oxygen species (ROS) expression and decrease in the activity of Sirt1 in Tregs, leading to impairing their suppressive function in AAV. In Tregs treated with resveratrol (RVL), their functional recovery was demonstrated; and moreover, suppressed phosphorylation of mTOR, as well as reduced ROS expression and increased activation of Sirt1, was simultaneously shown in Tregs. This study suggests that antioxidative and anti-immune aging effects by RVL may contribute to improve suppressive ability of Tregs in AAV.

研究分野：膠原病・臨床免疫

キーワード：全身性血管炎 制御性T細胞 活性酸素 Sirt1 アンチエイジング 抗酸化作用 mTOR レスベラトロール

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 関連血管炎 (AAV) に代表される全身性血管炎は、難治性皮膚潰瘍や末梢神経障害による身体障害の原因となるほか、中枢神経や腎臓などの重要臓器に障害を呈して生命予後に影響する。病態や治療の研究が進んでいる一方で未だ完治は難しく、既存の免疫抑制療法を継続しても再燃することが多く経験される。完治に結びつく治療標的を解明する必要性が考慮される。近年、過剰な免疫応答を制御して免疫の恒常性を維持する制御性 T 細胞 (Treg) の働きが注目されている。関節リウマチや多発性硬化症など自己免疫疾患では、Treg の発現低下や制御機能の障害が報告されている。全身性血管炎の病態研究において、治療前の急性期のみならず、臨床的に寛解が得られた後でも Treg の制御機能が回復していないことを申請者は報告している。Treg の制御機能回復に乏しいことが、疾患の再発・再燃の原因になる背景を説明した結果であり、Treg の制御機構・制御因子を阻害している原因を解明する必要性が考慮された。予備研究において、患者の Treg では長寿遺伝子の活性が低下していることを導き出していた。免疫老化現象は、免疫システムを慢性炎症に傾かせることが特徴であり、Treg の可塑性を含めた炎症性要因の過剰な亢進を制御して Treg の機能回復を目指す研究計画の着想に至った。以上より、全身性血管炎において、長寿遺伝子の活性低下を介した免疫の老化現象が「Treg の制御機能を障害していること」および「Treg の制御機能を回復する標的因子であること」を証明する研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、免疫システムの老化現象が Treg の制御機能を障害している病態背景に着目し、長寿遺伝子を賦活化させて Treg の制御機能を回復させることを目的とした。全身性血管炎の患者を研究対象として研究を計画。Treg の正常な働きを回復させて自己の免疫寛容が改善できることを証明することで、全身性血管炎の根治療法研究に結びつく先駆け研究を目指した。

本研究の特色は「失われた Treg の制御機能を改善すること」「アンチエイジングによる Treg の制御機能回復」への取り組みである。アンチエイジング蛋白であるサーチュイン遺伝子 (Sirt1) をはじめ Treg における免疫老化現象 (慢性炎症) が機能障害の背景にあることを証明するとともに、Treg の制御機能に関わる各種因子の動態を調査。また、抗免疫老化作用を有するレスベラトロールを研究に用いて Sirt1 を賦活化し Treg の機能回復を結びつける研究とした。本研究は斬新かつ独創的な研究発想として発信できるものと確信している。

3. 研究の方法

AAV 患者と患者群と同齢の健常者 (HC) の末梢血を用いて以下の実験を行った。

実験 1 : Treg (CD4+CD25+FoxP3+細胞) の可塑性の評価 (細胞内発現エフェクターサイトカイン)、FoxP3、活性酸素 (ROS) および Sirt1 の発現、Treg の制御機能を AAV 患者群と HC 群で比較。

末梢血単核球 (PBMCs) を関連抗体で標識 (FACS で測定)

CD4+CD25+FoxP3+細胞の ROS および Sirt1 を測定

CD4+CD25+細胞のFoxP3を測定

CD4+CD25+FoxP3+細胞(オマイシとPMAで刺激)のIFN- γ , IL-17, IL-4, mTORを測定

PBMCsからTregを分離し、total RNAを抽出。qPCRで上記関連因子を測定。

Suppression assay

CFSE標識したCD4+CD25-細胞とTregを抗CD3/CD28抗体とともに96時間共培養。

FACSでCD4+CD25-細胞の分化増殖率を測定してTregの制御機能を評価。

実験2: レスベラトロール(RVL)でTregの培養刺激を行い、上記の各種因子およびTregの制御機能を評価。

AAV患者群のPBMCsをRVL含有培養液で24時間培養。

上記の後に実験1の実験を行い、RVL刺激のないものと比較。

上記の後に実験1の実験を行い、RVL刺激のないものと比較。

4. 研究成果

✓ Tregの発現と可塑性について

AAV患者群ではHC群に比して有意にTregの発現頻度は低く、CD4+CD25+のpopulationにおけるFoxP3の発現も有意に低いことが示された。Tregの細胞内に発現するIFN- γ 、IL-17およびIL-4はいずれもAAV患者群で有意に発現が亢進していた。

✓ Tregの酸化ストレスとSirt1活性について

TregにおけるROSの発現はAAV患者群で有意に亢進しており、Sirt1の発現は有意に低下していた。リン酸化mTORの細胞内発現はAAV患者群で有意に亢進していた。

✓ Tregの制御機能について

AAV患者群のTregではHC群に比して、CD4+CD25-細胞の分化増殖の抑制作用が有意に低下していた。

✓ RVLによる刺激培養後のTregの変化

RVLの刺激培養を行ったPBMCsから分離したTregでは、FoxP3の発現増加が有意に示された。ROSの発現は有意に抑制され、Sirt1の発現も有意に上昇が確認された。またリン酸化mTORの減少も認められた。Suppression assayでは、RVLの刺激培養を施されたTregとの共培養でCD4+CD25-細胞の分化増殖率の有意な低下が確認された。

FoxP3の発現回復はHC群に比して未だ有意低値ではあったが、Tregの機能回復におけるRVLの有用性が考慮された。また、ROSの過剰産生やSirt1の活性低下がmTORのリン酸化亢進に関与し、RVLによる抗酸化作用や抗免疫老化作用がmTORシグナルの制御を介してTregの機能を回復させる傾向に働くことが考察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shimajima Yasuhiro, Kishida Dai, Ueno Ken-ichi, Ushiyama Satoru, Ichikawa Takanori, Sekijima Yoshiki	4. 巻 46
2. 論文標題 Characteristics of Circulating Natural Killer Cells and Their Interferon- Production in Active Adult-onset Still Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1268 ~ 1276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3899/jrheum.181192	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sakaguchi Noriko, Shimajima Yasuhiro, Ushiyama Satoru, Ichikawa Takanori, Ikeda Junji, Ueno Ken-ichi, Kishida Dai, Sekijima Yoshiki	4. 巻 online first
2. 論文標題 Normal Pressure Hydrocephalus in Systemic Lupus Erythematosus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JCR: Journal of Clinical Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/RHU.0000000000001101	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kishida Dai, Yazaki Masahide, Nakamura Akinori, Tsuchiya-Suzuki Ayako, Shimajima Yasuhiro, Sekijima Yoshiki	4. 巻 online first
2. 論文標題 Late-onset familial Mediterranean fever in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2019.1621440	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ichikawa Takanori, Shimajima Yasuhiro, Otuki Toshiaki, Ueno Ken-ichi, Kishida Dai, Sekijima Yoshiki	4. 巻 58
2. 論文標題 Acquired Amegakaryocytic Thrombocytopenia in Adult-onset Still's Disease: Successful Combination Therapy with Tocilizumab and Cyclosporine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 3473 ~ 3478
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.2929-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 下島恭弘	4. 巻 91
2. 論文標題 全身性血管炎と末梢神経障害	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 脳神経内科	6. 最初と最後の頁 287-294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 下島恭弘	4. 巻 91
2. 論文標題 ANCA関連疾患と肥厚性硬膜炎	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 脳神経内科	6. 最初と最後の頁 352-360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 下島恭弘, 関島良樹	4. 巻 34
2. 論文標題 肥厚性硬膜炎	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 精神科治療学	6. 最初と最後の頁 286-288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimajima Yasuhiro, Kishida Dai, Ueno Ken-ichi, Ushiyama Satoru, Ichikawa Takanori, Sekijima Yoshiki	4. 巻 online first
2. 論文標題 Characteristics of circulating natural killer cells and their interferon- production in active adult-onset Still's disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Rheumatology	6. 最初と最後の頁 online first
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3899/jrheum.181192	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Rika, Shimojima Yasuhiro, Moteki Hideaki, Kishida Dai, Ueno Ken-ichi, Sekijima Yoshiki	4. 巻 57
2. 論文標題 Propylthiouracil-induced Otitis Media with Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-associated Vasculitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 3029 ~ 3033
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.0944-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kishida Dai, Yazaki Masahide, Nakamura Akinori, Nomura Fumio, Kondo Takeshi, Uehara Takanori, Ikusaka Masatomi, Ohya Akira, Watanabe Norihiko, Endo Ryuta, Kawai Satoshi, Shimojima Yasuhiro, Sekijima Yoshiki	4. 巻 38
2. 論文標題 One novel and two uncommon MEFV mutations in Japanese patients with familial Mediterranean fever: a clinicogenetic study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Rheumatology International	6. 最初と最後の頁 105 ~ 110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00296-017-3886-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 下島恭弘	4. 巻 24
2. 論文標題 各種難病の最新治療情報・膠原病の背景と現状～治療の進歩を含めて～	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 難病と在宅ケア	6. 最初と最後の頁 34 ~ 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimojima Yasuhiro, Kishida Dai, Nomura Shun, Sekijima Yoshiki	4. 巻 39
2. 論文標題 Cerebrospinal fluid levels of BAFF and APRIL as direct indicators of disease activity in anti-neutrophil cytoplasmic antibody?related hypertrophic pachymeningitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Rheumatology	6. 最初と最後の頁 3145 ~ 3148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10067-020-05270-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ushiyama Satoru, Shimojima Yasuhiro, Ueno Ken-ichi, Kishida Dai, Miyazaki Daigo, Sekijima Yoshiki	4. 巻 40
2. 論文標題 Clinical characteristics of patients with myalgia as the initial manifestation of small and medium-sized vasculitis: a retrospective study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Rheumatology International	6. 最初と最後の頁 1667 ~ 1674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00296-020-04652-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikeda Junji, Shimojima Yasuhiro, Usami Yoko, Ueno Ken-ichi, Kishida Dai, Sekijima Yoshiki	4. 巻 39
2. 論文標題 Cerebrospinal fluid biomarkers implicated in the pathogenesis of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-related hypertrophic pachymeningitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1803 ~ 1811
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10067-020-04971-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikeda Junji, Shimojima Yasuhiro, Yoshinaga Tsuneaki, Kodaira Minoru, Nishina Sayaka, Ito Kiyoshi, Sekijima Yoshiki	4. 巻 81
2. 論文標題 Alteration of BAFF and APRIL in the cerebrospinal fluid based on the therapeutic response in primary central nervous system B-cell lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 72 ~ 75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jocn.2020.09.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 下島恭弘
2. 発表標題 成人スチル病における末梢血NK細胞のインターフェロン 産生機能
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 下島恭弘
2. 発表標題 The pathogenic CSF biomarker in ANCA-related hypertrophic pachymeningitis
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 下島恭弘
2. 発表標題 成人スチル病における疾患活動性とインターフェロン 産生能の解析
3. 学会等名 第47回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Shimojima Y, Kishida D, Sekijima Y
2. 発表標題 Cerebrospinal fluid biomarker of disease activity: significance in ANCA-related hypertrophic pachymeningitis
3. 学会等名 2018ACR/ARHP Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 下島恭弘
2. 発表標題 ANCA関連肥厚性硬膜炎におけるBAFFおよびAPRILの病態関連研究
3. 学会等名 第62回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kishida D, Nakamura A, Yazaki M, Tsuchiya-Suzuki A, Shimojima Y, Sekijima Y
2. 発表標題 Clinical and genetic analysis of patients with symptoms mimicking familial Mediterranean fever
3. 学会等名 2018ACR/ARHP Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 下島恭弘、岸田大、日根野晃代、関島良樹
2. 発表標題 ANCA関連血管炎に合併する肥厚性硬膜炎の臨床的特徴
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 下島恭弘
2. 発表標題 皮膚筋炎・多発性筋炎における末梢血T細胞の細胞内シグナルと動態解析
3. 学会等名 Rheumatology Conference 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 下島恭弘、岸田大、関島良樹
2. 発表標題 ANCA関連肥厚性硬膜炎の髄液H ₂ O ₂ イオンチャンネル解析
3. 学会等名 第46回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 下島 恭弘、市川貴規、岸田大、関島良樹
2. 発表標題 成人スチル病における制御性T細胞の可塑性と制御機能
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuhiro Shimojima, Dai Kishida, Takanori Ichikawa, Yoshiki Sekijima
2. 発表標題 Relationship between interferon- γ -producing immunocompetent cells and disease activity in adult-onset Still's
3. 学会等名 diseaseEULAR2020 Annual European e-Congress of Rheumatology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 下島 恭弘、市川貴規、岸田大、関島良樹
2. 発表標題 成人スチル病における制御性T細胞の可塑性と疾患活動性の解析
3. 学会等名 第48回臨床免疫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 下島 恭弘、池田淳司、岸田大、上野賢一、関島良樹
2. 発表標題 ANCA関連肥厚性硬膜炎の髄液バイオマーカー解析
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

信州大学医学部内科学第三教室ホームページ
<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/chair/i-3nai/theme04.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------