

令和元年6月7日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09555

研究課題名(和文) 自己免疫寛容の誘導を目的としたmTOR阻害剤によるTregワクチン療法の開発

研究課題名(英文) IL2cx induced Trig and immune tolerance

研究代表者

前田 伸治 (Maeda, Shinji)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：80381854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：mTOR阻害剤(エベロリムス)と、T細胞表面のCD25抗原を特異的に刺激するIL-2/IL-2抗体複合体(以下、IL-2cx)を併用することで、炎症性関節炎モデルマウスにおいて、免疫寛容を誘導するTregの増加は認められたが、関節炎は改善しなかった。ヒト化NOGマウスのx-GVHD病態にIL-2cxを投与すると、むしろx-GVHDは増悪した。IL-2cxによって活性化し、Treg抵抗性の炎症性細胞が存在すると仮説を立て、解析したところ、コントロールと比較し、IL-cx投与のヒト化NOGマウスで、Th1/17の著明な増加を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウス研究で免疫制御治療として期待されている、IL-2/IL-2 antibody complexes治療が、我々のヒト化マウスを用いた研究により、x-GVHDを増悪させることを確認し、そのヒト免疫細胞における潜在的リスクを示した。ヒト化NOGマウスに、IL-2/IL-2 antibody complexes投与する本モデルは、以下の3点(1)ヒト免疫細胞モデル、(2)制御性T細胞の増加、(3)炎症病態(x-GVHD)の増悪させる)により、制御性T細胞に抵抗性のヒト炎症モデルとして有用である。制御性T細胞に抵抗性の炎症細胞の探索や、ヒト自己免疫疾患のさらなる病態解明が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Combination of mTOR inhibitor (everolimus) and IL-2 / IL-2 antibody complex (IL-2cx) therapy induced Treg cells in arthritis model mice. However, arthritis did not improve. Administration of IL-2cx to x-GVHD disease in humanized NOG mice rather exacerbated x-GVHD. It was hypothesized that Treg-resistant inflammatory cells activated by IL-2cx were present. We analyzed effector T cells in recipient humanized NOG mice. In IL-2cx-administered humanized NOG mice, Th1 / 17 was markedly increased.

研究分野：膠原病

キーワード：関節炎 Treg Th1/17

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチの治療は、TNF 阻害剤やIL - 6 阻害剤、CTLA4 - Ig 治療、JAK 阻害剤など薬剤の進展により、炎症を強力に抑制可能となった。しかし、いったん破綻した自己免疫寛容を是正する方法は未解明である。この方法が確立すれば、関節リウマチの活動性を長期にわたって寛解を維持し、薬剤フリーの状態を維持でき、疾患の完全寛解が期待できる。

2. 研究の目的

申請者の提唱する、関節炎炎症部位に集積した T 細胞 (= 自己抗原反応性 T 細胞を多く含む) を抑制性の T 細胞 (制御性 T 細胞) にコンバージョンし、その抑制機能を増強 (Treg の活性化、および増幅) する「mTOR 阻害剤による Treg ワクチン療法」は、破綻した自己免疫寛容を是正する。炎症局所に標的指向性リポソームが集積する Drug delivery system と、Treg 誘導のための mTOR 阻害 (Everolimus) および Treg の維持、増殖のための IL-2 治療 (IL-2/mAb complex) の組み合わせ治療により、関節炎局所に優位に Treg を誘導・増殖し、さらに安定させて、炎症局所の免疫寛容を能動的に誘導する全く新しい治療法の開発が本研究の目的である。

3. 研究の方法

関節炎モデルマウス (SKG マウス) において、関節炎発症後、mTOR 阻害剤 (エベロリムス) IL-2/IL-2Ab complex を投与することで、関節炎の経過、関節所属リンパ節の Treg、Th17 の解析、また滑膜部位のリンパ球 Treg を採取し、Treg の自己反応性を確認する。プロトコール (SKG マウスでは Zymosan 投与で関節炎を惹起し、day35 に mTOR 阻害剤投与開始、1 週間後に IL-2/IL-2Ab complex を投与)。

(1) 関節炎の評価

上記のプロトコールにしたがって、関節炎発症マウスに処置をしたあと、関節炎の経過を観察するため、無処置 (エベロリムスなし、IL-2/IL-2Ab complex なし) マウスと比較し、関節炎スコアを計測する。

(2) リンパ球の解析

一部のマウスは、Day25 あたりを目安に、解剖し、所属リンパ節、および炎症性滑膜を採取する。炎症性滑膜は、リベラーゼプレんザイム (Roche) で処置し、滑膜浸潤リンパ球を採取する。それぞれ採取したリンパ球の CD4T 細胞、Treg 細胞を、フローサイトメトリーを用いて解析する。(CD4 抗体、CD25 抗体 細胞膜透過処理後の細胞内染色で Foxp3 抗体)

本研究のもっとも重要な点は、Treg ワクチン (SLX-Lipo(Eve) + IL-2/IL-2Ab complex) の処置により、関節炎惹起性 T 細胞を Treg にコンバージョンできるか否かである。最新の知見から、SKG マウスにおいて、関節炎惹起性 T 細胞が認識する抗原が、RPL23A、(60S ribosomal protein L23a) であることが解明されている。(Ito, Yoshinaga, et al. Science 346.6207 (2014): 363-368.)

(3) Treg ワクチンにより関節炎が改善した場合、その数週後に再度 Zymosan (SKG マウス) を投与し、関節炎を再惹起させる。Treg ワクチン効果による関節炎再発抑制があるかどうかを確認する。

(4) ヒト化マウスにおける IL-2/IL-2Ab complex による Treg の増加と、GVHD 発症抑制の有無の検討

ヒトにおいて、JES6-1 と同様の作用のある抗 IL-2 抗体として、Clone(5344)がある。これとヒト IL-2 サイトカインとの複合体 (human IL-2/IL-2Ab complex) による vivo での検討は国際的にもされていない。将来の Treg ワクチン療法のヒト臨床への応用を視野に、ヒト T 細胞における Everolimus human IL-2/IL-2Ab complex の効果の確認が必要である。ヒト化マウスで利用される NOG マウス (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Sug/Jic, Ito, M

.et al. Humanized Mice. Springer Berlin Heidelberg, 2008. 53-76.) に、ヒトナイーブ T 細胞 (CD4+CD45RA+) T 細胞を養子移入 (1×10^6 cells/匹) すると GVHD を発症する (3 週間くらいで)。本研究においては、Treg の増加を確認するため、末梢血単球 (PBMC) を 1×10^7 細胞投与することとした。

これに無処置群と、IL-2/IL-2Ab complex(i.v.)を行う群に分け、Treg が増加するかを、脾臓細胞の多色フローサイトメトリーで解析する。

(5) 投与後 5 日後くらいを目安に、それぞれの群から 3 匹ずつ解剖し、脾臓、リンパ節などの細胞数や Treg の割合を解析する。

(6) さらに、体重を週 2 回計測し、ヒト T 細胞移入によりおこる GVHD の発症 (皮膚炎、下痢、GVHD の病勢と体重減少が相関) を処置群と無処置群で比較する。

4. 研究成果

関節炎モデルマウスを用いた研究において、SLX-Lipo(Eve) IL-2/IL-2Ab complex を投与する

ことで、制御性 T 細胞の増加は確認されるが、関節炎はコントロールと比較して改善しなかった（関節炎スコア、足踵関節腫脹部位の径）

全身の炎症制御が必要と考え、SLX-Lipo(Eve)を全身 Everolimus 投与 (ip) としたが、制御性 T 細胞の増加は確認されるものの、同様に関節炎は改善しなかった。

そこで、関節炎モデルマウスの炎症を阻害する薬剤を事前に投与し、同様に Everolimus IL-2/IL-2Ab complex 投与を行い、関節炎をある程度抑制することでの効果を確認することとした。

以下の抗炎症作用のある薬剤を 5-7 日事前に投与し、Everolimus IL-2/IL-2Ab complex 投与を行い、制御性 T 細胞の増加による関節炎抑制維持がみられるかを確認した。

- (1) TNF 抗体
- (2) CTLA4-Ig
- (3) IL-6 受容体抗体

(1)-(3)において、十分な関節炎抑制効果を認めなかった。

以上の結果から、mTOR 阻害剤 IL-2/IL-2Ab complex 投与により、Treg の増加は確認されるが、十分な関節炎病態の抑制はみられなかった。全身の炎症病態を抑制する処置を行っても、関節炎自体の改善はみられなかった。

次に、ヒト化マウスを用いた研究を行なった。NOG マウスに、末梢血単球 (PBMC) を 1×10^7 細胞を移入し、x-GVHD を発症させる系を利用して、そこに、h-IL-2/IL-2Ab(clone 5344) complex 3 $\mu\text{g}/30 \mu\text{g}$ を投与した。レシピエント (ヒト化 NOG マウス) において、投与後 day3 をピークに、 $\text{CD4}^+ \text{CD25}^{\text{high}} \text{Foxp3}^+ \text{Treg}$ が有意に増加することを確認した。また、その Treg は、CTLA-4 を発現し、抑制性と考えられたが、ヒト化 NOG マウスから採取できる Treg の数に限界があり、Treg の抑制機能の評価はできなかった。

h-IL-2/IL-2Ab(clone 5344) complex 投与後、x-GVHD が Treg 増加により改善するかを、生存率、体重減少、の 2 つの指標により確認した。すると予想に反して、h-IL-2/IL-2Ab(clone 5344) complex 投与群が、無処置群 (コントロール) に比べて、有意に生存率が低下し、体重減少もより早期におこることを観察した。

当初、mTOR 阻害剤と IL-2/IL-2Ab complex の併用により、Treg を増加し、炎症病態 (マウス ; 関節炎、ヒト化 NOG マウス ; x-GMHD) を改善させることを目標としたが、関節炎モデルマウスでは改善がみられず、ヒト化 NOG マウスでは IL-2/IL-2Ab complex 投与でむしろ増悪するという結果となった。いずれの群でも Treg が増加することを確認できており、また関節炎モデルマウスにおいては、抗サイトカイン抗体を併用しても改善しなかったため、慢性炎症病態において、Treg に抵抗性の炎症細胞が存在し、IL-2/IL-2Ab complex の効果を減弱、もしくは、IL-2/IL-2Ab complex 投与によりこれらの炎症細胞が増強している可能性を考えた。

そこで、Treg 以外の炎症性 T 細胞の解析をおこなうこととした。ヒト化 NOG マウスにおいて h-IL-2/IL-2Ab(clone 5344) complex 投与群において、 $\text{CD4}^+ \text{T}$ 細胞中の Th1 (IFN γ +)、Th2 (IL-4+)、Th17 (IL-17A+)、そして Th1/17 (IFN γ +IL-17+) の割合、および細胞数を、コントロール群と比較した。すると、割合、細胞数ともに、Th1/17 (IFN γ +IL-17+) が h-IL-2/IL-2Ab(clone 5344) complex 投与群において著明に増加することがわかった。

これらの結果をもとに、ヒトの炎症病態において、Th1/17 細胞が、h-IL-2/IL-2Ab(clone 5344) complex 治療の抵抗因子となる可能性、さらに、内在する制御性 T 細胞への抵抗因子である可能性が考えられた。さらに、病理像を解析すると、肺 (間質性肺炎) 肝炎、腸炎を主体とした炎症病態をコントロールと比較して強く発症していた。この結果から、ヒト化 NOG マウスに h-IL-2/IL-2Ab(clone 5344) complex 投与することで得られるモデルは、1) 制御性 T 細胞が増加しつつ 2) x-GVHD の disease がより進行する、という点から、制御性 T 細胞抵抗性の炎症病態の 1 モデルと考えた。

このモデルは、ヒト自己免疫疾患や GVHD において、炎症性 T 細胞がなぜ制御性 T 細胞に抵抗して disease を悪化させるかについて詳細を解析するための良いモデルとなると考えられる。本研究で得られた知見をベースとして、新たに、制御性 T 細胞抵抗性の T 細胞の探索研究へとつなげている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 13 件)

- (1) 前田 伸治, 爲近 真也, 前田 智代, 難波 大夫
Extinguish-Th17 と関節リウマチ疾患活動性の相関
第 63 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2019 年 4 月 京都 (国立京都国際会館)
- (2) 前田 伸治 大佐賀 智 前田智代 難波大夫
Sparse analysis of rheumatoid arthritis clinical background and peripheral blood Treg phenotype. 第 47 回日本免疫学会総会. 2018 年 12 月 福岡(福岡国際会議場)
- (3) 爲近 真也 前田 伸治 上原 幸治 前田 智代 新実 彰男
プリスタン誘発ループモデルに対する選択的 CD25 刺激の影響
第 46 回日本臨床免疫学会総会. 2018 年 11 月 長野(軽井沢プリンスホテルウエスト)
- (4) 前田 伸治
シンポジウム 1 高齢者 RA 患者のマネージメント 1 免疫病態について
第 30 回中部リウマチ学会 2018 年 8 月 名古屋
- (5) 前田 伸治, 爲近 真也, 前田 智代, 難波 大夫
ABA 中止時点によるリウマチ患者 Th サブセットと再燃予測の可能性
第 62 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2018 年 4 月 東京 (東京国際フォーラム)
- (6) Shinji Maeda, Satoshi Osaga, Tomoyo Maeda, Taio Naniwa
Exploratory study of T cell biomarkers predicting Abatacept treatment response in RA patients using background adjustment by IPW method. 第 46 回日本免疫学会学術集会 2017 年 12 月 仙台市
- (7) 爲近 真也 前田 伸治 和田 洵一 大村 晋一郎 岩垣津 志穂 前田 智代 難波 大夫 新実 彰男.
マクロファージ活性化症候群を合併した全身性エリテマトーデス患者血清における多項目サイトカイン解析
第 45 回日本臨床免疫学会総会. 2017 年 9 月 東京 (京王プラザホテル)
- (8) 前田 伸治
シンポジウム 関節リウマチ治療と呼吸器感染症
第 29 回中部リウマチ学会 2017 年 9 月 金沢
- (9) 前田 伸治, 前田 智代, 爲近 真也, 大村 晋一郎, 岩垣津 志穂, 難波 大夫, 新実 彰男
CTLA4-Ig(Abatacept)によるリウマチ患者 CD4+T cell subset の細胞増殖 (Ki67 発現) へおよび効果の検討. 第 61 回日本リウマチ学会総会. 2017 年 4 月 福岡(福岡国際会議場).
- (10) Shinya Tamechika, Shinji Maeda, Tomoyo Maeda, Taio Naniwa, Akio Niimi
IL-2/anti-IL-2 antibody complexes adversely affect human immune cells despite the proliferation of regulatory T cells in vivo .
第 61 回日本リウマチ学会総会・学術集会 .International Concurrent Workshop. 2017 年 4 月 福岡 (福岡国際会議場).
- (11) 爲近 真也 前田 伸治 前田 智代 難波 大夫 新実 彰男
hIL-2/anti-hIL-2 Antibody complexes (hIL-2cxCD25)によるヒト化マウス xenogeneic GVHD への影響 .
第 44 回日本臨床免疫学会総会. 2016 年 9 月 東京 (京王プラザホテル)
- (12) 前田 伸治, 前田 智代, 爲近 真也, 大村 晋一郎, 難波 大夫, 新実 彰男.
リウマチ患者末梢血 CXCR3 陽性 Th17 細胞 (Th17.1) と Abatacept の治療効果. 第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2016 年 4 月 横浜(パシフィコ横浜)
- (13) 前田 智代 前田 伸治 難波 大夫 爲近 真也
IL2 サイトカインと mTOR 阻害による Treg 増加と自己免疫性関節炎の抑制. 第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2014 年 4 月 東京都 (グランドプリンスホテル新高輪)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：前田 智代， 為近 真也
ローマ字氏名： MAEDA tomoyo, TAMECHIKA shin-ya

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、研究者個人に帰属されます。