

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20599001

研究課題名(和文) 制御性 T 細胞による樹状細胞の機能抑制における責任遺伝子の同定と臨床応用

研究課題名(英文) Identification of gene responsible for suppression of dendritic cells by regulatory T cells and their application to clinical immunotherapy

研究代表者

大西 康 (ONISHI YASUSHI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：10509574

研究成果の概要(和文)：免疫反応を抑制する制御性 T 細胞は CTLA-4 を高発現し、この分子が樹状細胞を抑制することで正常な免疫システムが保たれている。マウスでは CTLA-4 が樹状細胞の FoxO3a という転写因子を介して免疫反応を負に制御することが知られる。しかし、ヒトの樹状細胞において FoxO3a の発現を低下させたところ T 細胞増殖が減少した。FoxO3a はヒト樹状細胞において免疫反応を増強している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Regulatory T cells, lymphocytes suppressing immune reaction, highly express CTLA-4. CTLA-4 suppresses dendritic cells (DC), which maintains immune system in normal condition. It is known that FoxO3a is an essential molecule for DC suppression by CTLA-4 in a mouse model. However, Foxo3a knockdown in human DC resulted in the reduction of T cell proliferation. It is suggested that FoxO3a may augment immune reaction in human DC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：樹状細胞 / 制御性 T 細胞 / FoxO3a / Foxp3 / CTLA-4

1. 研究開始当初の背景

化学療法や放射線治療に抵抗性を示す白血病や悪性リンパ腫に対しては移植片対腫瘍効果を期待して同種造血幹細胞移植が施行される。しかし、移植片対宿主病の予防および治療で免疫寛容が誘導されると移植片対腫瘍効果が消失し、移植後再発をきたすケースがある。免疫寛容をもたらすリンパ球と

して、Foxp3 をマスターコントロール遺伝子とする CD4⁺CD25⁺ 制御性 T 細胞(Treg)の重要性が明らかとなった。その後、Treg の中心的な抑制対象が樹状細胞(dendritic cells, DC)であり、Treg 上に高発現する CTLA-4 が DC を負に制御することが示された。しかし、CTLA-4 がどのような機序で DC の機能を修飾するかは不明であった。臨床現場では有効

性の高い免疫療法の開発が望まれており、そのためには免疫応答で中心的役割を果たす DC の機能調節と Treg による免疫抑制のメカニズムの解明が必要であった。

2. 研究の目的

Treg が DC と接着した後、どのようなメカニズムで DC の活性化を抑制するのかを明らかにする。その作用機序から、Treg の存在下でも DC の機能を増強できる方法を見つけ、新たな免疫療法の開発につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Treg および DC における microRNA(miRNA) 発現の検討

臍帯血単核球から MACS ビーズを用いて CD4⁺CD25⁺ Treg および CD4⁺CD25⁻ ナイーブ T 細胞 (Tn) を分離し、免疫細胞との関連が報告されている miR16, miR146a, miR146b, miR150, miR155, および CD80/CD86 の 3' UTR 領域に相補性のある miRNA を選択し、定量 RT-PCR 法を用いて発現量を測定した。miRNA の内因性コントロールには U6 を用いた。次に CD14⁺ 単球を分離し、GM-CSF と IL-4 を用いて DC を調整した。DC に対する LPS の影響や Treg, Tn と共培養した後の miRNA 発現量を測定した。

(2) DC における FoxO3a 発現

CD14⁺ 単球から GM-CSF と IL-4 で DC を調整し、ウエスタンブロッティング法、および定量 RT-PCR 法でヒト DC の FoxO3a の発現を検討した。さらに LPS, TGF β , FLT3L, CTLA-4-Ig の各刺激で FoxO3a および Phospho-FoxO3a の発現が変化するかを検討した。

(3) DC における FoxO3a ノックダウン

成人末梢血および臍帯血から上記と同様に DC を調整し、electroporation 法を用いた siRNA の導入により FoxO3a をノックダウンした。その後、CFSE ラベリングを行った T 細胞と共培養し、FoxO3a をノックダウンした DC による T 細胞刺激能の変化を測定した。

4. 研究成果

(1) Treg, Tn, DC における miR146a 発現

miR16, miR146a, miR146b, miR150, miR155 はいずれも Treg, Tn で発現を認めたが、Treg でより高い発現がみられたのは miR146a のみであった(図 1)。次に DC を Treg または Tn 細胞と培養後、両者を分離して上記の発現を検討した。Treg と培養した DC は Tn と培養した DC よりも miRNA146a の発現が高い結果であった(図 2)。また、Tn との共培養時に TGF β を添加した DC は TGF β を添加しない時と比較して miRNA146a の発現が上昇した。

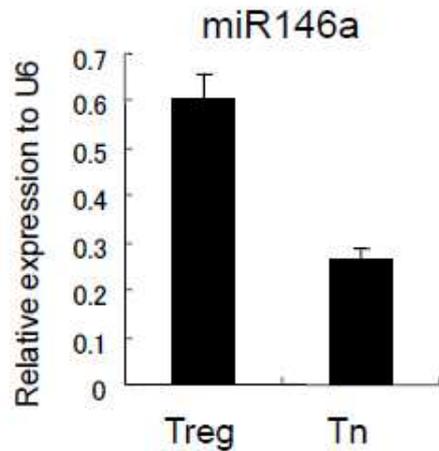


図 1. Treg, Tn の miR146a 発現

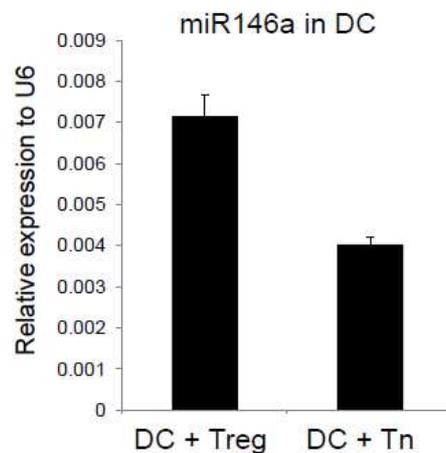


図 2. 共培養後の DC における miR146a 発現

次に、CD80 または CD86 の 3' UTR 領域に相補性のある miRNA として miR409, miR496, miR553, miR595, miR601, let-7g-2 を選択し、DC における発現の有無を検討した。let-7g-2 のみ発現を認め、TGF β の添加でわずかな発現の上昇がみられたが、Treg との関連は明らかでなかった。これらの結果から、機序は不明であるが miR146a が Treg による DC の機能抑制に関与している可能性が示唆された。

(2) DC の FoxO3a 発現と LPS 刺激

マウスにおいて DC が CTLA-4 刺激を受け、抑制される際に FoxO3a が必須であることが示されたため、ヒト DC において FoxO3a 発現を検討した。陽性コントロールには FoxO3a の発現が確認されている Jurkat を用いた。タンパクおよび mRNA レベルでヒト DC が FoxO3a を発現していることを確認した。LPS を添加して培養したところ、1.5hr, 4hr, 8hr と経時的に FoxO3a の発現量が増加することを確認した(図 3)。TGF β , Flt3L, CTLA-4-Ig の添加では LPS ほどの明らかな変化を認めな

かった。また、CTLA-4-Ig の添加では Phospho-FoxO3a が低下することはなかった。以上の結果から、LPS 刺激による DC の活性化に FoxO3a が何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

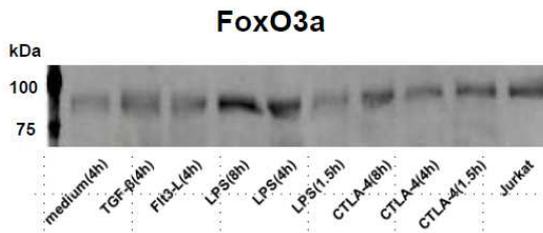


図 3. ヒト DC における FoxO3a 発現

(3) DC における FoxO3a 発現と T 細胞刺激能

DC に FoxO3a を標的とした siRNA を導入し、FoxO3a 発現が低下することを確認した。その後、CFSE ラベルした T 細胞と共培養し、T 細胞の分裂割合をコントロール siRNA を導入した DC の群と比較した。その結果、FoxO3a をノックダウンした DC はコントロールの DC と比較し、共培養した T 細胞の分裂割合が低下した(図 4)。この結果から、FoxO3a は DC による T 細胞刺激に必要な分子であると考えられた。一方で、FoxO3a をノックダウンすることで培養後の DC の生存割合が低下することではなく、FoxO3a は DC の活性化自体に関与している可能性が示唆された。FoxO3a の発現量やリン酸化が DC の抗原提示能や生存に関し、どのような機能を有するかを詳細に解析することで、新しい免疫療法の開発につながると考えられた。

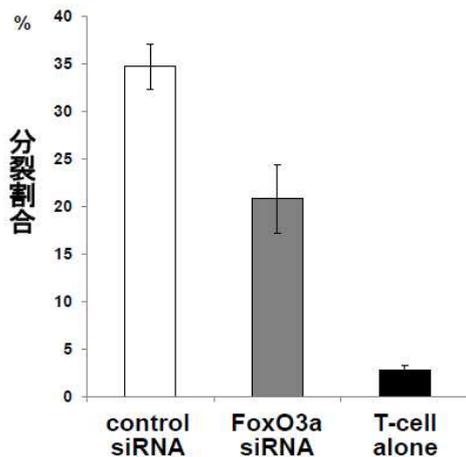


図 4. DC における FoxO3a ノックダウンが T 細胞増殖に与える影響

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 11 件)

(全て査読有)

1. Onishi Y, Sasaki O, Ichikawa S, Inokura K, Katsuoka Y, Ohba RO, Okitsu Y, Kohata K, Ohguchi H, Fukuhara N, Yokoyama H, Yamada MF, Yamamoto J, Ishizawa K, Kameoka J, Harigae H. Favorable Outcome of Unrelated Cord Blood Transplantation for Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. Biol Blood Marrow Transplant. 2011 in press.

2. Ohguchi H, Ohba R, Onishi Y, Fukuhara N, Okitsu Y, Yamamoto J, Ishizawa K, Ichinohasama R, Harigae H. Successful treatment with bortezomib and thalidomide for POEMS syndrome. Ann Hematol. 2011 in press.

3. Ichikawa S, Fukuhara N, Yamamoto J, Suzuki M, Nakajima S, Okitsu Y, Kohata K, Onishi Y, Ishizawa K, Kameoka J, Harigae H. Successful allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for aggressive NK cell leukemia. Intern Med. 49:1907-1910, 2010.

4. Watanabe R, Shirai T, Tajima Y, Ohguchi H, Onishi Y, Fujii H, Takasawa N, Ishii T, Harigae H. Pregnancy-associated thrombotic thrombocytopenic purpura with anti-centromere antibody-positive Raynaud's syndrome. Intern Med. 49:1229-1232, 2010.

5. Yokoyama H, Yamamoto J, Tohmiya Y, Yamada MF, Ohguchi H, Onishi Y, Okitsu Y, Fukuhara N, Ohba-Ohtsuka R, Kohata K, Ishizawa K, Kameoka J, Harigae H. Allogeneic hematopoietic stem cell transplant following chemotherapy containing l-asparaginase as a promising treatment for patients with relapsed or refractory extranodal natural killer/T cell lymphoma, nasal type. Leuk Lymphoma. 51:1509-1512, 2010.

6. Abe M, Yokoyama H, Tohmiya Y, Okitsu Y, Ohguchi H, Kohata K, Yamamoto J, Onishi Y, Ishizawa K, Kameoka J, Harigae H. Plasma cell leukemia maintaining complete remission by syngeneic stem cell transplantation combined with low-dose thalidomide maintenance therapy. Intern

Med. 48:1833-1835, 2009.

7. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? Int Immunol. 21:1105-1111, 2009.

8. Ichikawa S, Kohata K, Okitsu Y, Suzuki M, Nakajima S, Yamada MF, Onishi Y, Yamamoto J, Suzuki S, Ishizawa K, Kameoka J, Harigae H. Acquired hemophilia A with sigmoid colon cancer: successful treatment with rituximab followed by sigmoidectomy. Int J Hematol. 90:33-36, 2009.

9. Ohguchi H, Sugawara T, Ishikawa I, Okuda M, Tomiya Y, Yamamoto J, Onishi Y, Fujiwara Yamada M, Ishizawa K, Kameoka J, Harigae H. A retrospective analysis of bortezomib therapy for Japanese patients with relapsed or refractory multiple myeloma: beta2-microglobulin associated with time to progression. Int J Hematol. 89:342-347, 2009.

10. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura T, Sakaguchi S. CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. Science 322: 271-275, 2008.

11. Onishi Y, Fehervari Z, Yamaguchi T, Sakaguchi S. Foxp3⁺ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. Proc Natl Acad Sci USA. 105: 10113-10118, 2008.

[学会発表] (計 36 件)

1. 大西康、大場理恵、猪倉恭子、勝岡優奈、沖津庸子、木幡桂、福原規子、大口裕人、山本讓司、石澤賢一、張替秀郎
フルダラビン+大量エンドキサン+TBI 4Gy を前処置に用いた臍帯血移植の検討
第 33 回日本造血細胞移植学会総会
2011/3/10 松山

2. Yasushi Onishi, Osamu Sasaki, Yuna Katsuoka, Masahiro Kobayashi, Mayumi Kamata, Rie Ohba, Yoko Okitsu, Katsura Kohata, Hiroto Ohguchi, Noriko Fukuhara, Hisayuki Yokoyama, Joji Yamamoto, Kenichi Ishizawa, Hideo Harigae.
Allogeneic HSCT following imatinib/dasatinib for patients with CML in

accelerated and blastic phase.

第 72 回日本血液学会学術集会
2010/9/25 横浜

3. 横山寿行, 山本讓司, 大口裕人, 遠宮靖雄, 大西康, 鎌田真弓, 渡辺龍, 小林匡洋, 沖津庸子, 木幡桂, 大場理恵, 福原規子, 山田実名美, 石澤賢一, 亀岡淳一, 目黒邦昭, 張替秀郎

進行期 Extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type に対する同種造血幹細胞移植の有用性

第 32 回日本造血細胞移植学会総会
2010/2/20 浜松

4. Yasushi Onishi, Satoshi Ichikawa, Shinji Nakajima, Makiko Suzuki, Yoko Okitsu, Katsura Kohata, Hiroto Oguchi, Noriko Fukuhara, Hisayuki Yokoyama, Joji Yamamoto, Kenichi Ishizawa, Hideo Harigae
Prophylactic use of entecavir in a HBsAg-positive patient with MDS receiving unrelated BMT

第 71 回日本血液学会学術集会
2009/10/23-25 京都

5. 大西康、鈴木真紀子、市川聡、中寫真治、高橋太郎、沖津庸子、木幡桂、山本讓司、山田実名美、石澤賢一、亀岡淳一、張替秀郎
自家末梢血幹細胞移植後再燃ホジキンリンパ腫に対して Reduced-intensity Conditioning を用いて非血縁者間臍帯血移植を施行した一例

第 31 回日本造血幹細胞移植学会総会
2009/2/5 札幌

6. 市川聡、中寫真治、鈴木真紀子、高橋太郎、井上あい、沖津庸子、木幡桂、藤原亨、福原規子、大西康、山本讓司、山田実名美、石澤賢一、佐々木治、遠宮靖雄、原崎頼子、奥田光崇、亀岡淳一、張替秀郎

東北大学グループで施行した寛解期 Philadelphia 染色体陽性急性リンパ性白血病に対する同種臍帯血移植成績—非血縁者間同種骨髄移植との比較

第 31 回日本造血幹細胞移植学会総会
2009/2/5 札幌

7. 鈴木真紀子、大西康、市川聡、中寫真治、高橋太郎、沖津庸子、木幡桂、山本讓司、山田実名美、石澤賢一、亀岡淳一、張替秀郎
Reduced-intensity Conditioning を用いて拒絶方向 HLA 血清学的二座不一致ドナーから末梢血幹細胞移植を施行した骨髄異形成症候群の一例

第 31 回日本造血幹細胞移植学会総会
2009/2/5 札幌

8. 大口裕人, 井根省二, 阿部正理, 大西康, 石川泉, 木幡桂, 山本讓司, 山田実名美, 石澤賢一, 遠宮靖雄, 奥田光崇, 菅原智広, 亀岡淳一, 張替秀郎
再発・難治性多発性骨髄腫に対する Bortezomib 療法の後方視的検討
第 70 回日本血液学会総会
2008/10/11 京都

9. 高橋太郎, 沖津庸子, 大西康, 鈴木真紀子, 山本讓司, 山田実名美, 馬淵洋, 松崎有未, 亀岡淳一, 張替秀郎
同種末梢血幹細胞移植施行 7 年後にドナー由来の再生不良性貧血を発症した 1 例
第 70 回日本血液学会総会
2008/10/10 京都

〔図書〕 (計 1 件)

1. 大西康, 坂口志文, 羊土社, 実験医学増刊
樹状細胞による免疫制御と免疫制御と臨床応用, 2008 年, 3197-3203,

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大西 康 (ONISHI YASUSHI)

東北大学・病院・助教

研究者番号 : 10509574

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :