

令和 6 年 4 月 12 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19446

研究課題名（和文）アバタセプト抵抗性「しつこい」記憶T細胞を除去する方法の探索

研究課題名（英文）In vivo deletion of abatacept-resistant persistent autoreactive memory T cells

研究代表者

竹馬 俊介（Chikuma, Shunsuke）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・准教授

研究者番号：50437208

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：Th17依存性の皮膚炎モデルを樹立し、Th17にはエフェクター様、メモリー様の、2種の亜集団があることを明らかにした。エフェクター様細胞は、CD28阻害薬によってほぼ完全に抑制され、これに伴って自己免疫性皮膚炎は完全に抑制された。一方で、メモリー様細胞はCD28阻害に関係なく体内で生存し、新たなエフェクター様細胞へと分化する性質を示した。さらに、メモリー様細胞に特有のコレステロール代謝、エタノール代謝といった代謝経路を明らかにした。特に、メモリー様細胞に発現していたアルデヒド脱水素酵素に着目し、この阻害薬を用いると、前述の皮膚炎モデルにおいてメモリー様細胞の生存を阻害できることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人口の約5%が何らかの自己免疫疾患に罹患すると言われているが、自己免疫疾患の治療抵抗性、再発メカニズムは不明である。Th17は、自らを複製し長期生存する一方、炎症細胞を生み出す「ステムネス」を持つとされるがその実態は明らかではなかった。本研究では、Th17に少なくとも2つの亜集団が存在し、メモリー様細胞は免疫治療に抵抗して体内生存し、炎症細胞へ分化できることを明らかにした。また遺伝子発現解析から、メモリー様細胞に発現する独特の遺伝子群を見出し、この阻害によりメモリー様細胞の阻害が可能であることを示した。本研究成果は難治性免疫疾患の一端を明らかにした点で学術的意義、臨床的な意義を併せ持つ。

研究成果の概要（英文）：We established a Th17-dependent model of dermatitis and revealed the existence of two subsets of Th17 cells, effector-like and memory-like. Effector-like cells were almost completely inhibited by abatacept, a CD28 inhibitor, leading to complete suppression of autoimmune dermatitis. In contrast, memory-like cells showed resistance to abatacept and survived in vivo, demonstrating a propensity to differentiate into new effector-like cells. Furthermore, we elucidated specific metabolic pathways in memory-like cells, such as cholesterol and ethanol metabolism. In particular, focusing on aldehyde dehydrogenase expressed in memory-like cells, we found that inhibiting this enzyme could inhibit the survival of memory-like cells in the dermatitis model mentioned above.

研究分野：免疫学

キーワード：自己免疫疾患 ヘルパーT細胞 免疫治療 メモリーT細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

難治性免疫疾患の原因である、IL-17 産生性ヘルパーT 細胞 (Th17)は、生体内で長期間生存する「しつこさ (persistence)」を示し、これが免疫難病の治療抵抗性および治療後再発の主因と考えられる。予備検討で、T 細胞の副刺激阻害薬 (CD28 阻害薬)であるアバタセプトが、Th17 依存性自己免疫マウスモデルの発症を抑制するにもかかわらず、治療後のマウスには、抑制された Th17 が「しつこく生存」しており、この細胞が、治療終了後に分裂、活性化して再発の原因となると考えている。本研究では、治療後に残存した自己反応性メモリー T 細胞の生存機構を解析し、これをターゲットとする新規治療法を目指す。

2. 研究の目的

難治性免疫疾患の原因である IL-17 産生性ヘルパーT 細胞 (Th17)は、生体内で長期間生存する「しつこさ (persistence)」を示し、これが乾癬、クローン病、多発性硬化症といった免疫難病の治療抵抗性および治療後再発の主因と考えられる。私たちは、皮膚反応性 Th17 を健常マウスに移入して惹起する慢性皮膚炎モデル (Nishimoto et al. J. Immunol. 191: 3065-72, 2013) において、T 細胞の副刺激阻害薬 (CD28 阻害薬)であるアバタセプトが、乾癬様皮膚炎の発症を完全に抑制することを見出した。しかしながら、治療後のマウスには、分裂を抑制され、サイトカイン産生能を有しない Th17 が「しつこく生存」しており、この細胞が、治療終了後に分裂、活性化して再発の原因となると考えている。本研究では、アバタセプトに無反応な休眠 Th17 の生存機構を、その ATP 獲得経路に特化して明らかにする。これをターゲットとし、自己反応性 Th17 の体内からの除去を目指す。慢性自己免疫疾患のもとになる「しつこい悪玉細胞」を絶つことを目的とした。

3. 研究の方法

3 - 1 慢性皮膚炎モデル

皮膚の単一のタンパク (デスモグリン 3) に特異性を持つ H1 TCR Tg マウス (Takahashi et al. J. Clin. Invest. 121: 3677-88, 2011) から T 細胞を精製し、病原性 Th17 分化誘導法 (Muranski et al. Immunity 35: 972-85, 2011 より改良) を用いて生体内で長期間生存し、かつ高度に病原性を持つ Th17 へと分化させた。これを同系統である野生型 C57BL/6 マウス (CD45.2) に経静脈的に移入し、皮膚に乾癬様の病態を惹起した。

3 - 2 治療モデル

アバタセプト (BMS 社) あるいはコントロールとしてヒト IgG (Jackson Laboratory) 100 μ g を、Th17 細胞移入時、2 日目、5 日目の 3 回、腹腔内投与した。シアナミド水溶液 (2mg 相当) またはコントロールとして精製水を、細胞移入時から毎日経口投与した。

3 - 3 FACS 解析

無治療 (皮膚炎を発症) およびアバタセプト治療マウス (非発症) のリンパ節、脾臓、耳介皮膚より免疫細胞を分離し、常法により FACS 解析を行った。FACS CANTO II (BD) または CytoFlex S (ベックマン) を用いてデータを取得し、Flowjo ソフトウェア (BD) により解析した。

3 - 4 RNA-シーケンスおよびバイオインフォマティクス解析

無治療およびアバタセプト治療マウスより、ドナー由来 T 細胞 (CD45.1) を FACS でソーティングし、ここから RNA シークエンス解析を行った。また、無治療マウスにおいて、IL-7 レセプター陽性、陰性細胞を分取し、同様に RNA シークエンス解析に供した。得られたデータは HISAT2、samtools、FeatureCount、DESeq2 を用いて解析し、変動遺伝子を求めた。アバタセプト治療マウス由来や、IL-7 レセプター陽性の細胞には、Th17 の潜伏に必須な遺伝子が発現する事が予想されたため、IPA 解析 (Qiagen) により、細胞外からの栄養素取り込み (トランスポーター) 脂質分解経路、オートファジー経路など、ATP 獲得に関わると思われる遺伝子群に分類した。

4. 研究成果

これまでに、皮膚反応性の T 細胞を高度な病原性を持つ Th17 分化させ、野生型マウスに移入して慢性皮膚炎を起こすモデルを樹立していた (科研費研究課題 21H00439, 19K07488)。このモデルに、CD28 阻害薬であるアバタセプトを投与すると、皮膚炎の発症が完全に抑制された。CD28 は、ナイーブ T 細胞の活性化に重要であるが、病原性 Th17 における CD28 の意義は不明であった。そこで、T 細胞レセプター単独、あるいは T 細胞レセプター + CD28 で共刺激した Th17 における遺伝子発現を比較した。2 時間という短時間にも関わらず、CD28 共刺激を行った細胞には、IL-21, GM-CSF, TNF をはじめとする 16 種の炎症性サイトカインが誘導され、CD28 刺激が、Th17 による炎症に大きく貢献する事が考えられた。

次に、皮膚炎誘導マウスにおいて、無治療 (自己免疫性皮膚炎を発症) およびアバタセプト治

療マウス（CD28 阻害、皮膚炎を未発症）に由来する T 細胞を FACS 解析した。無治療マウスにおいてはインターフェロン 陽性のエフェクター T 細胞が観察されたが、アバタセプト治療群ではほとんど見られない事がわかった。このことから、生体内においても CD28 阻害（アバタセプト）によって炎症が抑制された事が考えられた。

アバタセプト治療群において、移入したドナー T 細胞を詳細に調べたところ、一部の Th17 が、治療の有無にかかわらず生存し、増殖していることがわかった。さらなる詳細な解析により、無治療マウスにおいては IL-7 R 陰性のエフェクター様 Th17 が観察されたが、治療群ではほとんど見られない事、一方、治療群では IL-7 レセプター（IL-7R）陽性、インターフェロン 陰性のメモリー様細胞が残存する事がわかった。この、メモリー様 Th17 を治療マウスから単離し、新たな野生型マウスに移植したところ、このレシピエントには新たにエフェクター様 Th17 が観察された。すなわち、アバタセプト抵抗性のメモリー様 Th17 は、エフェクター細胞への分化能を有する事が示された。

無治療群、治療群由来の T 細胞を RNA-シーケンス解析に供した。無治療マウス由来細胞は各種のサイトカイン遺伝子を発現する一方、治療マウス由来細胞はサイトカイン遺伝子をほとんど発現しなかった。以上の結果から、アバタセプトは Th17 による炎症は阻害するがその生存は阻害しないことがわかった。さらに、メモリー様、およびエフェクター様細胞の遺伝子発現比較を行ったところ、メモリー様 Th17 細胞はアルデヒド脱水素酵素（ALDH）遺伝子を特徴的に発現していることがわかった。無治療群、治療群由来の RNA-シーケンス比較においても、治療マウス由来細胞は ALDH を多く発現しており、メモリー様 Th17 細胞における特有の生存機構に ALDH 活性が関わる事が示唆された。先の慢性皮膚炎モデルマウスにおいて、ALDH2 阻害剤であるシアナミドを経口投与すると、IL-7 レセプター陽性、および陰性細胞の両者が有意に阻害され、この効果はアバタセプトとの併用治療で増強した。以上の結果から、Th17 にはアバタセプト治療に関係なく生存するメモリー様形質を示す「しつこい」亜集団が存在し、この集団に特有な生存機構や代謝経路が存在すること、これをターゲットとする新規治療法の可能性が示された。以上の結果を論文報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Miyamoto K, Hayabuchi H, Tokifuji Y, Ando M, Onishi N, Okamura T, Yoshimura A, *Chikuma S: A Protein Kinase D inhibitor suppresses AKT on T cells and antagonizes cancer immunotherapy by Anti-PD-1	4. 巻 34
2. 論文標題 A Protein Kinase D inhibitor suppresses AKT on T cells and antagonizes cancer immunotherapy by Anti-PD-1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 609-619
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxac035.	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 Nakamichi R, Hishikawa A, Chikuma S, Yoshimura A, Sasaki T, Hashiguchi A, Abe T, Tokuhara T, Yoshimoto N, Nishimura ES, Hama EY, Azegami T, Nakayama T, Hayashi K, Itoh H	4. 巻 42
2. 論文標題 DNA-damaged podocyte-CD8 T cell crosstalk exacerbates kidney injury by altering DNA methylation.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.112302.	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 Tokifuji Yukiko, Hayabuchi Hodaka, Sasaki Takashi, Hara-Chikuma Mariko, Hirota Keiji, Takahashi Hayato, Amagai Masayuki, Yoshimura Akihiko, Chikuma Shunsuke	4. 巻 27
2. 論文標題 Targeting abatacept-resistant T-helper-17 cells by aldehyde dehydrogenase inhibition	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 108646 ~ 108646
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.108646	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 Hayabuchi Hodaka, Tokifuji Yukiko, Takahashi Hayato, Amagai Masayuki, Yoshimura Akihiko, Chikuma Shunsuke	4. 巻 -
2. 論文標題 Disruption of Post-thymic tolerance in Skin-Reactive TCR Transgenic Mice through the Interaction of Lymphopenia and Intestinal Microbiota	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 dxae18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxae018	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 竹馬 俊介
2. 発表標題 内在性レトロウイルス抑制機構を標的とした免疫治療法を目指す
3. 学会等名 第19回日本免疫治療学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shunsuke Chikuma
2. 発表標題 A progressive loss of TRIM28 causes immune-aging
3. 学会等名 Northeastern Asian symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hodaka Hayabuchi, Shunsuke Chikuma
2. 発表標題 TRIM28 mediated Treg function underlies suppressive tumor immune environment.
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shunsuke Chikuma
2. 発表標題 A PKD inhibitor cancels the effect of PD-1 blockade in a murine model of cancer immunotherapy.
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shunsuke Chikuma
2. 発表標題 A PKD inhibitor Suppresses AKT on T cells and Antagonizes Cancer Immunotherapy by anti-PD-1
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術集会 横浜市 2022年9月29日～10月1日
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹馬 俊介
2. 発表標題 アパタセプト抵抗性「しつこい」メモリーT細胞を、アルデヒド脱水素酵素阻害剤で退治する
3. 学会等名 第32回京都T細胞会議
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹馬 俊介
2. 発表標題 CD28シグナルを必要としない「しつこい」メモリーT細胞を除去する方法
3. 学会等名 自己指向性免疫学 若手ワークショップ
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shunsuke Chikuma
2. 発表標題 Loss of TRIM28 Function on Immune Cells Recapitulate Immune aging
3. 学会等名 Janan-China-Korea Foresight Kickoff (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 竹馬 俊介
2. 発表標題 体内で長期間生存する「しつこい」T細胞を除去する方法
3. 学会等名 文部科学省 学術変革領域研究 学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォーム 成果発表会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	時藤 夕紀子 (Tokifuji Yukiko)		
研究協力者	宮本 和英 (Miyamoto Kazuhide)		
研究協力者	早瀬 帆高 (Hayabuchi Hodaka)		

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
---------	---------