

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791106

 研究課題名（和文）CD4陽性CD25陰性LAG3陽性制御性T細胞による
自己反応性B細胞制御機構解明

 研究課題名（英文）Elucidation of suppressive mechanisms of autoreactive B cells by
CD4⁺CD25⁻LAG3⁺ regulatory T cells

研究代表者

岡村 僚久（OKAMURA TOMOHISA）

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：10528996

研究成果の概要（和文）：本課題は、転写因子Egr2発現を特徴とするCD4⁺CD25⁻LAG3⁺ 制御性T細胞（以下、LAG3 Treg）による自己反応性B細胞制御機構の解明を目的とした。本課題において、全身性エリテマトーデス（SLE）モデルMRL/*Fas*^{lpr} マウスの病態が、コントロールMRL/+マウスより回収したLAG3 Tregの養子移入により著しく改善されることを確認した。LAG3 TregによるB細胞抗体産生抑制機序はEgr2発現に依存性であり、Fas/FasLおよび、PD-1/PD-L1相互作用を介していた。LAG3 Tregによる抑制メカニズムを明確にしたこれらの成果は、SLEを始めとする自己抗体産生を介した自己免疫性疾患の新規免疫抑制療法開発の一助となると考えられた。

研究成果の概要（英文）：The aim of this project is to elucidate the role of Egr2-expressing CD4⁺CD25⁻LAG3⁺ regulatory T cells (LAG3 Treg) in regulation of autoantibody production. Adoptive transfer of LAG3 Treg from control MRL/+ mice to MRL/*Fas*^{lpr} lupus prone mice significantly suppressed the progression of nephritis and autoantibody production. Interestingly, LAG3 Treg co-expressed Egr2 and PD-L1, and LAG3 Treg from T-cell-specific Egr2 conditional knockout or PD1 knockout mice failed to suppress B cell antibody production. These findings elucidate that LAG3 Treg play a crucial role in preventing the excessive B cell responses via Fas/FasL and PD-1/PD-L1 interactions. By exploiting the capacity of LAG3⁺ Tregs, they may provide a new therapeutic method in autoantibody-mediated autoimmune diseases, including SLE.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：制御性T細胞、自己抗体、全身性エリテマトーデス、LAG3、Egr2

1. 研究開始当初の背景

免疫寛容の破綻は、制御不能な自己反応性B細胞やT細胞を生じ、自己免疫性疾患の発症に直結する。これら自己反応性リンパ球の抑制において制御性T細胞(regulatory T cell: Treg)が中心的な役割を果たしており、臨床応用に向けた研究が世界的に行われている。Tregは概念上、胸腺で誘導される「内

因性 Treg: naturally-occurring Treg (nTreg)」と、抹消で誘導される「誘導性 Treg: induced Treg (iTreg)」に大別され、免疫学的恒常性はnTregとiTregが協調することで維持されている。

免疫寛容誘導に関して最も精力的に研究されているのが、CD4⁺CD25⁺ Tregである(Hori

S, 2003. *Science* 14, 1057-61)。CD4⁺CD25⁺ Tregは主に胸腺にて分化し、胸腺内で発現する自己抗原に対する免疫寛容を誘導するnTregである。CD4⁺CD25⁺ Tregの分化・誘導、抑制機能は転写因子Foxp3 に依存しており、Foxp3 がマスター制御遺伝子として知られている。

iTregに関しては、その特異的な細胞表面マーカーやマスター制御因子が明確となっておらず、研究発展の大きな障害となっていた。申請者は、抗原特異的抑制能を有するiTregとしてCD4⁺CD25⁺LAG3⁺ 制御性T細胞 (LAG3 Treg) を同定した(Okamura T, 2009, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:13974-9)。同報において、LAG3 Tregは、T細胞刺激時の不応答性(アナジー)誘導に必須である転写因子Egr2(early growth response gene-2)を高発現すること、また、Egr2 はナイーブT細胞にLAG3 Tregと同様の形質と、過敏型遅延反応における抗原特異的な免疫抑制能を付与することを報告している。

近年、T細胞特異的Egr2欠損マウスが自己抗体産生を特徴とする代表的膠原病である全身性エリテマトーデス(SLE)様の病態を呈すること(Zhu. B, 2008, *J Exp Med* 205:2295-307)、EGR2はSLE感受性遺伝子の一つであることが報告され(Myouzen K, 2010, *Hum Mol Genet* 19:2313-20)、SLEの発症機序におけるEgr2の関与が注目されてきている。

一方、ヒトFOXP3遺伝子の機能異常は、IPEX症候群という激しい全身性自己免疫疾患の発症につながり、多くは2歳前後で死亡するが(Notarangelo, L. 2006 *Adv Immunol* 89, 321-370)、SLEでは稀な難治性腸炎、I型糖尿病などを主徴とし、SLEで頻度の高い糸球体腎炎は稀である。このことは、SLEの病態形成にはCD4⁺CD25⁺ Treg以外のTregサブセットが関与していることを示唆しており、各種Tregサブセットの疾患発症起点における役割の解明が求められてきている。

2. 研究の目的

転写因子Egr2発現を特徴とするLAG3 Tregによる自己反応性B細胞制御機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) SLEモデルマウスにおけるLAG3 Tregの機能解析

SLEモデルマウスとして、アポトーシス関連Fas遺伝子の突然変異*lpr*遺伝子を有するMRL/*Fas^{lpr}*マウスが知られている。MRL/*Fas^{lpr}*マウスにおけるLAG3 Tregの機能を明らかに

するため、*lpr*遺伝子変異を有さないMRL/+マウスより回収したLAG3 Treg, CD4⁺CD25⁺ Treg, ナイーブT細胞をそれぞれMRL/*Fas^{lpr}*マウスへ養子移入し、蛋白尿、抗ds DNA抗体価、腎組織所見を比較検討した。

(2) LAG3 Tregによる抗体産生抑制能の検討

B細胞抗体産生を刺激するヘルパーT細胞(Th)サブセットの1つとして濾胞T細胞(follicular helper T cell:以下、Tfh)が知られている。B細胞による抗体産生を誘導するTh細胞として、ニワトリ卵白アルブミン(OVA)特異的T細胞受容体トランスジェニックマウスであるOT-IIマウスから回収したCD4⁺CD25⁺LAG3⁺ T細胞を用い、C57BL/6マウスより回収したB細胞と共にRag1ノックアウトマウスへ移入した。移入24時間後に、4-ヒドロキシ-3-ニトロフェニルアセチル(NP)ハプテンを結合したOVA(OVA-NP)により初回免疫を行い、その7日後に追加免疫を行った。細胞移入時には、LAG3 Tregを抑制細胞として共移入し、追加免疫7日後のBSA-NPに対する血清抗体価を指標として評価した。LAG3 Tregに関連した抑制因子を明確にするため、各種ノックアウトマウスから回収した細胞サブセットも使用した(詳細後述)。

(3) LAG3 Treg様細胞誘導条件の検討

C57BL/6マウスより回収したナイーブT細胞を、各種サイトカイン存在下にT細胞受容体刺激を行い、そのサイトカイン産生パターンおよび、Egr2発現を確認し、LAG3 Treg様細胞の誘導条件を検討した。

4. 研究成果

MRL/*Fas^{lpr}*マウスにおける治療効果は、CD4⁺CD25⁺ Treg、ナイーブT細胞では認められず、LAG3 Tregにおいてのみ認められた。LAG3 Tregの移入により、蛋白尿、抗ds DNA抗体価、腎組織所見は有意に改善した。

SLE backgroundを有さないマウスにおける*in vivo*の検討(「3. 研究の方法 (2)」)においても、LAG3 TregはB細胞による抗体産生を抑制した。同実験系において、C57BL/6/*Fas^{lpr}*マウスまたは、T細胞特異的Egr2欠損マウス(Egr2^{fl/fl}CD4Cre⁺ : Egr2 CKO)から回収したLAG3 Tregはその抗体産生抑制能が有意に減弱していた。また、PD-1欠損B細胞の抗体産生を抑制出来なかった。

さらには、各種サイトカインを用いた誘導実験において(「3. 研究の方法 (3)」)、IL-27によりナイーブT細胞からEgr2発現T細胞が誘導されることおよび、LAG3 Tregで高産生される抑制性サイトカインIL-10も産生さ

れることを確認した。IL-27によるIL-10産生はSTAT3依存性であり、また、Egr2 CKOマウスではIL-27によりIL-10は誘導されなかった (Iwasaki Y, 2013, *Eur J Immunol*. 43: Epub ahead of print)。

上述の如く本課題において、LAG3 Tregが自己抗体産生を抑制すること、B細胞制御機構には転写因子Egr2が中心的役割を果たしていること、また、その抑制メカニズムは、Fas/FasL、PD-1/PD-L1相互作用を介していることを明らかにした。さらに、LAG3 Tregの詳細な分化・誘導メカニズムにつき検討を加えた。以上の成果は、SLEを始めとする自己抗体産生を介した自己免疫性疾患の新規免疫抑制療法開発の一助となると考えられる。

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7件)

1. Iwasaki Y, Fujio K, Okamura T, Yanai A, Yamamoto K. Toward therapeutic application of IL-10-producing regulatory T cells *Jpn J Clin Immunol* 2013;36(1):40-6. 査読無
2. Shuji Sumitomo, Keishi Fujio, Tomohisa Okamura and Kazuhiko Yamamoto Egr2 and Egr3 are the unique regulators for systemic autoimmunity. *JAK-STAT* 2013; 2:2, eLocation ID: e23952 査読有
3. Iwasaki Y, Fujio K, Okamura T, Yanai A, Sumitomo S, Shoda H, Tamura T, Yoshida H, Charnay P, Yamamoto K. Egr-2 transcription factor is required for Blimp-1-mediated IL-10 production in IL-27-stimulated CD4(+) T cells. *Eur J Immunol*. 2013 43: 1–11 doi: 10.1002/eji.201242942 査読有
4. Fujio K, Okamura T, Sumitomo S, Yamamoto K. Regulatory cell subsets in the control of autoantibody production related to systemic autoimmunity. *Ann Rheum Dis*. 2013 Apr;72 Suppl 2:ii85-ii89. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-202341. 査読無
5. Izawa S, Okamura T, Matsuzawa K, Ohkura T, Ohkura H, Ishiguro K, Noh JY, Kamijo K, Yoshida A, Shigemasa C, Kato M, Yamamoto K, Taniguchi SI. *Clin Endocrinol (Oxf)*.

2012 Dec 6. doi: 10.1111/cen.12121. 査読有

6. Fujio K, Okamura T, Sumitomo S, Yamamoto K. Regulatory T cell-mediated control of autoantibody-induced inflammation. *Front Immunol*. 2012;3:28. Epub 2012 Feb 27. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-202341. 査読無
7. Okamura T, Fujio K, Sumitomo S, Yamamoto K. Roles of LAG3 and EGR2 in regulatory T cells. *Ann Rheum Dis*. 2012 Apr;71 Suppl 2:i96-100. doi: 10.1136/annrheumdis-2011-200588. 査読無

[学会発表] (計3件)

1. Tomohisa Okamura, “Fas-FasL dependent induction of autoantibody suppressive Egr2 expressing CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cell” The 56th Annual General Assembly and Scientific Meeting of the Japan College of Rheumatology, The 21th International Rheumatology Symposium April 26-28, (2012) Grand Prince Hotel New Takanawa, Tokyo
2. Tomohisa Okamura, “DEVELOPMENT OF AUTOANTIBODY SUPPRESSIVE EGR2 EXPRESSING CD4+CD25-LAG3+ REGULATORY T CELLS IS DEPENDENT ON FAS-FAS LIGAND INTERACTION”, 8th International Congress on Autoimmunity 2012 Congress, Granada, Spain on May 12th, 2012.
3. Tomohisa Okamura, “CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cell controls B cell activation via PD-1/PD-L1 and Fas/FasL interactions.”, The 5th Global COE Retreat (Global Center of Education and Research for Chemical Biology of the Disease), January 19 – 20, (2013) Oiso Grand Hotel, Kanagawa

[図書] (計1件)

岡村僚久(メディカルレビュー社)「自己免疫疾患のエフェクターT細胞と抑制性T細胞」: 「Pharma Medica」Vol.31 自己免疫疾患の最近の話題と展望 特集号 (2013年) 総ページ数 6ページ (p17–p22)

[その他]

ホームページ :

<http://plaza.umin.ac.jp/areriul8/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡村 僚久 (OKAMURA TOMOHISA)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号 : 10528996