

平成 27 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390252

研究課題名(和文)自己抗体産生を抑制するEgr2発現制御性T細胞のマウス, ヒト双方向性の解析

研究課題名(英文)Analysis of Egr2-expressing regulatory T cells in mice and human

研究代表者

藤尾 圭志(FUJIO, KEISHI)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70401114

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文):本研究において、申請者らが同定した新規制御性T細胞LAG3+Tregが、抑制性サイトカインTGF-beta3を産生することにより、B細胞応答を抑制しマウス全身性自己免疫疾患を抑制することを見出した。またTGF-beta3が複数のB細胞シグナルを抑制して、PD-1と協働して機能することも見出した。ヒトLAG3+Tregが自己免疫疾患患者で減少していることも明らかとなり、本研究は自己免疫疾患の新しい治療戦略の開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文):We previously described that CD4+CD25-LAG3+regulatory T cells(LAG3+ Treg) are regulated by Egr2, a zinc-finger transcription factor required for the induction of T-cell anergy.We herein demonstrate that LAG3+Treg produce high amounts of TGF-beta3 in an Egr2- and Fas-dependent manner. LAG3+Treg require TGF-beta3 to suppress B-cell responses in a murine model of lupus. Moreover, TGF-beta3- and LAG3+Treg-mediated suppression requires PD-1 expression on B cells. We also show that TGF-beta3-expressing human LAG3+Treg suppress antibody production and that SLE patients exhibit decreased frequencies of LAG3+Treg. These results clarify the mechanism of B-cell regulation and suggest therapeutic strategies.

研究分野：アレルギー・リウマチ学

キーワード：自己免疫疾患 制御性T細胞 TGF-beta

1. 研究開始当初の背景

免疫応答を抑制する制御性T細胞サブセットとしてCD4陽性CD25陽性Foxp3陽性制御性T細胞(CD25⁺Treg)が知られているが、このCD25⁺Tregは主にT細胞の免疫応答を抑制し、CD25⁺Tregを欠損すると1型糖尿病などの内分泌疾患や、腸炎、皮膚炎を呈するが、関節リウマチ(RA)、全身性エリテマトーデス(SLE)とは異なる表現型となる。このことはCD25陽性Treg以外の免疫寛容システムの異常がRAやSLEに関与している可能性を示唆している。研究代表者らは、CD4陽性CD25陰性LAG3陽性Egr2陽性の新規制御性T細胞(LAG3⁺Treg)をマウスにおいて発見し、このLAG3⁺TregがIL-10を産生するとともにFasとPD-L1依存性にB細胞の抗体産生を抑制し、その機能欠損により全身性自己免疫疾患を呈することを見出した。

2. 研究の目的

LAG3⁺TregはB細胞の免疫応答と局所の炎症を抑制する、CD25⁺Tregと相補的な免疫寛容機構であると考えられる。本研究ではLAG3⁺Tregの抑制能の分子的基盤の解明を目的とした。特にサイトカインは創薬のターゲットとしやすく、抑制性サイトカインの機能に着目して解析を行った。またヒトのLAG3⁺Tregについても同定及び、自己免疫疾患との関連の検討を試みた。

3. 研究の方法

マウスは野生型C57/B6マウス、T細胞特異的Egr2欠損(Egr2^{CKO})マウス、Egr2-GFPマウス、IL-10欠損マウス、MRL/lprマウス、B6/lprマウス、B6/gldマウス、PD-1欠損マウス、Prdm1欠損マウスを用いた。フローサイトメーターはFACSVantageを使い、LAG3⁺Tregなどの細胞集団を分取して解析した。遺伝子発現は定量PCR、サイトカイン産生はELISAで評価した。生体内の抗体産生実験ではRAG1欠損マウスにT細胞およびB細胞を移入し、NP-OVAで2回免疫後の抗NP抗体価をELISAで評価した。B細胞のシグナル伝達はウェスタンブロットによって解析した。

ヒト細胞は末梢血または扁桃腺から密度遠心により単核球を分離し、MACSまたはフローサイトメーターにより細胞を分取した。

(倫理面への配慮)

臨床検体を用いた研究計画については、東京大学医学部倫理審査委員会の承認を受けた。すべての研究は各施設の遺伝子倫理委員会の審査を受け、承認を受けた研究計画に則って実施された。

4. 研究成果

申請者らはLAG3⁺Tregの発現遺伝子解析により、IL-10は抑制能に関与しないものの、TGF-βファミリー分子の一つであるTGF-β3がLAG3⁺Tregの抑制機能を担っていることを突

き止めた。LAG3⁺TregはT細胞レセプター(TCR)刺激により、10ng/ml以上の大量のTGF-β3を産生する。TGF-β3はB細胞の分裂、CD40の発現およびIgG産生を強力に抑制しつつアポトーシスを誘導する。B細胞レセプター(BCR)およびIL-4下流のシグナルを検討したところ、TGF-β3はNF-κB65、Syk、STAT6のリン酸化を抑制し、抗アポトーシス分子Bcl-xLの発現を抑制して、B細胞活性化経路を広範に抑制することが判明した。LAG3⁺TregのRAG1欠損マウスへのT細胞・B細胞移入モデルにおける抗体産生抑制能や、MRL/lprマウスの治療効果は抗TGF-β3抗体により解除され、LAG3⁺Tregの機能はTGF-β3に依存していることが明らかとなった。TGF-1,2,3の作用について比較すると、B細胞に対する抑制能は同等だが、TGF-β1産生の主要なソースであるFoxP3⁺Tregが数百pg/mlの産生なのに対し、LAG3⁺TregによるTGF-β3産生は10ng/ml以上と非常に大量であった。興味深いことに、LAG3⁺Tregが発現するEgr2とSLEに関連する遺伝子であるFasがLAG3⁺TregによるTGF-β3の発現に必須であった。ChIPシーケンス解析で、Egr2がTGF-β3の遺伝子領域に結合することが明らかとなった。これらのことはLAG3⁺TregがCD4陽性T細胞におけるTGF-β3産生の重要なソースである可能性を示唆している。

B細胞に対してTGF-β3が抑制機能を発揮するためには、抑制性共刺激分子のPD-1の発現が必須であった。また研究代表者らは以前にIL-27がCD4陽性T細胞のEgr2とLAG3の発現を誘導するサイトカインであることを報告しているが、今回IL-27がTGF-β3の産生を誘導し、IL-27で刺激したCD4陽性T細胞が抗体産生抑制能を発揮することを確認した。

ヒトの末梢血にはCD4陽性CD25陰性LAG3陽性の集団が存在し、Egr2、IL-10、TGF-β3を発現して、試験管内の抗体産生を抑制する活性を示した。SLE患者の末梢血では、CD4陽性CD25陰性LAG3陽性の細胞が減少しており、病態との関連が考えられた。またRA患者では疾患活動性の高い患者でCD4陽性CD25陰性LAG3陽性の細胞が減少する一方で、アバセプトによる治療後には増加する傾向が認められた。

TGF-β3は従来は器官発生において作用すると考えられており、免疫系ではTGF-β1が主要なTGF-βアイソフォームでTGF-β3はあまり機能していないと考えられてきた(Rubtsov et al. Nat Rev Immunol 7:443, 2007)。その後、2012年にTGF-β3がTh17細胞から産生されること、TGF-β1よりもTGF-β3がより病原性の高いTh17を誘導することが報告され、TGF-β3が炎症惹起性のサイトカインであることが示唆された(Lee et al. Nat Immunol 13:991, 2012)。申請者らの知見はTGF-β3が免疫応答の抑制に関与することを初めて明確にしたものであり、今後の新規治

療法の開発につながることを期待される。
TGF-β3 を用いた分子の創薬への応用については特許出願中である。

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 10 件)

Shibuya M, Fujio K, Shoda H, Okamura T, Okamoto A, Sumitomo S, Yamamoto K. A new T-cell activation mode for suboptimal doses of antigen under the full activation of T cells with different specificity. *Eur J Immunol*. 2015 in press.

Okamura T, Sumitomo S, Morita K, Iwasaki Y, Inoue M, Nakachi S, Komai T, Shoda H, Miyazaki JI, Fujio K, Yamamoto K. TGF-beta3-expressing CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells control humoral immune responses. *Nat Communications*. 2015;6:6329..

Shoda H, Fujio K, Sakurai K, Ishigaki K, Nagafuchi Y, Shibuya M, Okamura T, Yamamoto K. Autoantigen BiP-derived HLA-DR4 epitopes differentially recognized by effector and regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology*. 2015 in press.

Sumitomo S, Fujio K, Okamura T, Morita K, Ishigaki K, Suzukawa K, Kanaya K, Kondo K, Yamasoba T, Furukawa A, Kitahara N, Shoda H, Shibuya M, Okamoto A, Yamamoto K. Transcription factor early growth response 3 is associated with the TGF-β1 expression and the regulatory activity of CD4-positive T cells in vivo. *J Immunol*. 2013;191:2351-9.

Sumitomo S, Fujio K, Okamura T, Yamamoto K. Egr2 and Egr3 are the unique regulators for systemic autoimmunity. *JAKSTAT*. 2013;2(2):e23952.

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;43:1063-73.

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:ii85-9.

Okamura T, Fujio K, Sumitomo S, Yamamoto K. Roles of LAG3 and EGR2 in regulatory T cells. *Ann Rheum Dis*. 71 Suppl 2:i96-100, 2012.

Fujio K, Okamura T, Sumitomo S, Yamamoto K. Regulatory T cell-mediated control of autoantibody-induced inflammation. *Front Immunol*. 3:28, 2012.

Okamoto A, Fujio K, Tsuno NH, Takahashi K, Yamamoto K. Kidney-infiltrating CD4+ T-cell clones promote nephritis in lupus-prone mice. *Kidney Int*. 82:969-79, 2012.

[学会発表](計 13 件)

Keishi Fujio. TGF-beta3-expressing CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells control humoral immune responses. 第43回日本免疫学会学術総会 国際シンポジウム 平成25年12月12日

藤尾圭志 TGF-beta3産生によるCD4陽性CD25陰性LAG3陽性制御性T細胞のB細胞機能抑制 第79回日本インターフェロンサイトカイン学会(札幌) シンポジウム 2014年6月19日

Keishi Fujio, Tomohisa Okamura, Kaoru Morita, Mariko Inoue, Yukiko Iwasaki, Shuji Sumitomo, Shinichiro Nakachi, Kazuhiko Yamamoto. CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells and systemic

autoimmunity. 第 58 回日本リウマチ学会(東京) 国際リウマチシンポジウム 2014 年 4 月 25 日

Keishi Fujio, Tomohisa Okamura, Shuji Sumitomo, Kaoru Morita, Mariko Inoue, Yukiko Iwasaki, Nakachi Shinichiro, Hirofumi Shoda, Kazuyoshi Ishigaki, Kazuhiko Yamamoto. The role of CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells in autoimmune diseases. 第 42 回日本免疫学会 学術総会 国際シンポジウム 平成 25 年 12 月 11 日

Keishi Fujio, Tomohisa Okamura, Shuji Sumitomo, Kaoru Morita, Mariko Inoue, Yukiko Iwasaki, Kazuhiko Yamamoto. The B cell control by Egr2-expressing CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells. 2013 アジア国際自己免疫学会 平成 25 年 11 月 21 日

Keishi Fujio, Tomohisa Okamura, Shuji Sumitomo, Yukiko Iwasaki, Kazuyoshi Ishigaki, Akiko Okamoto, Kazuhiko Yamamoto. Egr2-mediated control of autoimmunity. JSCIR-MMCB 2013 symposium 平成 25 年 5 月 21 日

Yukiko Iwasaki, Keishi Fujio, Tomohisa Okamura, Atsushi Yanai, Shuji Sumitomo, Hirofumi Shoda, Kazuhiko Yamamoto. Novel IL-10 induction pathway mediated by Egr2 in IL-27-stimulated T cells. 第 57 回日本リウマチ学会学術集会 ワークショップ 平成 25 年 4 月 20 日
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

藤尾圭志、岡村僚久、住友秀次、岩崎由紀子、岡本明子、山本一彦

全身性エリテマトーデスと免疫制御細胞 第 57 回日本リウマチ学会学術集会 シンポジウム 平成 25 年 4 月 19 日

岡本明子、藤尾圭志、松本巧、岡村僚久、住友秀次、岩崎由希子、澁谷美穂子、庄田宏文、山本一彦

Tofacitinib は生体内で CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞を誘導し、試験管内で CD4 陽性 T 細胞の Egr2 発現の誘導する 第 56 回日本リウマチ学会学術総会 ワークショップ 平成 24 年 4 月 26 日

藤尾圭志、岡村僚久、住友秀次、岩崎由希子、岡本明子、松本巧、山本一彦 制御性 T 細胞と自己免疫 第 40 回日本臨床免疫学会総会 シンポジウム 平成 24 年 9 月 27 日

岡本明子、藤尾圭志、松本巧、住友秀次、岡村僚久、山本一彦 Jak 阻害薬は生体内で CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞を誘導し、試験管内で CD4 陽性 T 細胞の Egr2 発現の誘導する 第 40 回日本臨床免疫学会総会 ポスター発表 平成 24 年 9 月 28 日

Okamoto Akiko, Fujio Keishi, Ishigaki Kazuyoshi, Okamura Tomohisa, Yamamoto Kazuhiko. Tofacitinib induces CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells in vivo and the expression of Egr2 in CD4+ T cells in vitro. 第 41 回日本免疫学会学術総会 平成 24 年 12 月 6 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 1 件)

名称：B 細胞活性化の抑制剤および自己免疫疾患の治療剤
発明者：藤尾圭志、岡村僚久、山本一彦、森田薫、駒井俊彦
権利者：東京大学
種類：用法特許
番号：C1-X1410
出願年月日：平成 26 年 11 月 28 日

国内外の別： 国内

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://plaza.umin.ac.jp/areri18/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤尾圭志 (FUJIO KEISHI)
東京大学医学部附属病院・講師

研究者番号：70401114

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：