

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25293069

研究課題名(和文) 抗原特異的免疫反応制御機構の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular mechanism of the regulation of antigen-specific immune reaction

研究代表者

清水 章 (Shimizu, Akira)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：00162694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：獲得免疫とは多様性に富んだ受容体を発現するリンパ球が担う反応であり、特異的受容体を介して抗原を認識することで免疫反応が開始される。このシステムは外来抗原を排除する上では非常に優れているが、自己に対する反応は有害である。この有害な反応を抑制するために、自己を攻撃しないシステム「自己免疫寛容」を確立している。生体防御に必要な免疫反応であっても、過剰な反応は有害であり、これを抑えるメカニズムとして抗原特異的な負の制御機構の存在が想定されるが、その実態は不明である。本研究では、どの細胞が抗原特異的な免疫抑制細胞として働くのか、その細胞がどのようにその機能を発揮するのかを検索し、一定の知見を得た。

研究成果の概要(英文)：The acquired immune response is mediated by lymphocytes, which express highly diverse receptors. After lymphocytes specifically recognize the antigen through their specific receptors, immune reactions started. Thus, immune responses of lymphocytes are specific for distinct antigens. This system provides big benefit when invaded by microbes or virus. On the other hand, immune reaction against self-antigens will be harmful. Such kind of immune reactions are called autoimmunity, which result in autoimmune disease. To prevent autoimmune disease, tolerance to self-antigens are established. During the normal course of immune reactions, excessive immune reactions will provide adverse effect. To minimize such kind of adverse effect, existence of antigen-specific immune suppression was proposed, but not clearly demonstrated yet. In this project, we examined what kinds of cells work as antigen-specific immune suppression cells, and how they exert their function.

研究分野：分子生物学

キーワード：自己免疫疾患 免疫抑制 獲得免疫

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗原特異的受容体を持つリンパ球は、自身の発現する抗原受容体によって自己・非自己を識別し、外来抗原に対しては免疫反応・自己抗原に対しては免疫寛容が誘導されることが知られている。さらに実際の免疫反応においては、生体防御に必要な免疫反応であっても、過剰な反応は有害であり、これを抑えるメカニズムとして、抗原特異的な負の制御機構の存在が想定されているが、その実態は不明である。最近、活性化 T 細胞特異的免疫抑制機能を持つ CD8T 細胞が見出され、「抗原特異的自己免疫疾患の原因となる T 細胞受容体を持った CD4T 細胞」を、特異的に抑制する CD8aaT 細胞の存在が示された。さらに私たちは、免疫反応に伴い『CD4T 細胞が CD8aaT 細胞に分化誘導されること』と、この細胞が『免疫抑制反応に関与』している事を見いだした。

2. 研究の目的

本研究では、免疫抑制作用を持つことの知られている様々な T 細胞や B 細胞の細胞数の変動に注目して研究を進める。具体的には、様々な自己免疫疾患モデルマウスを用いて、各種免疫抑制細胞の細胞数の変動を調べ、その細胞による免疫抑制機能を生体内で確認することから研究を開始する。さらに生体内で免疫抑制機能が確認された細胞による免疫抑制機構を明らかにすることを当初の目的とする。特に、免疫反応を全体的に抑える反応ではなく、抗原特異的な免疫反応を抗原特異的に抑制する反応を担っている細胞を同定し、その作用機序を明らかにすることを目指す。これら一連の研究によって獲得免疫応答の根幹となる、抗原認識に依存した反応性決定機構と、その制御機構の全体像を明らかにすることを研究の目的とする。

3. 研究の方法

免疫異常や自己免疫疾患発症の原因となり得る『抗原特異的免疫抑制に関わる可能性を持つ、候補細胞群』の細胞数を、それぞれのモデルマウスごとに測定することによって、各候補細胞の生体内免疫制御における意義を考えるための予備的データを得る。さらに、これらの細胞の分化機構・機能発現機構の詳細と、生体内での免疫学的恒常性維持における役割を明らかにする。

1.自己免疫疾患発症の原因となる可能性を持つ、抗原特異的免疫抑制候補細胞を同定する。

2.自己免疫疾患ごとに同定された、候補細胞を養子移植し、生体内での細胞機能を評価する。

3.上述の免疫抑制機構が、抗原受容体特異的であるか判定し、その作用機構を明らかにする。

4. 研究成果

様々な自己免疫疾患モデルマウス(高 IgE 血症マウス、シェーグレン症候群モデルマウス、自己免疫性腸炎マウス、EAE モデルマウス、SLE モデルマウス)を用いて、定常状態における各種免疫抑制細胞の数や免疫反応時におけるその動態を調べ、自己免疫疾患発症に関与している免疫抑制細胞の同定を試みた。その結果これらのマウスでは、CD4+Foxp3+の制御性 T 細胞に加えて、CD8aaT 細胞の細胞数の減少が認められたことから、これらの細胞が、自己免疫疾患を抑制する寛容性維持細胞として機能している可能性が考えられた。しかし、これらの細胞を養子移植することによって自己免疫疾患の発症を完全に抑えることはできなかった。この時 CD4 制御性 T 細胞の移植によってある程度の病状の改善が認められたが、CD8aaT 細胞を移植した場合には疾患の憎悪が認められることもあった。このことから、CD8aaT 細胞による免疫抑制は、抑制性サイトカインの分泌等による、免疫反応全体を抑制するタイプの反応ではないことが示唆された。もともと CD8T 細胞は、自身の発現する T 細胞受容体 (T cell receptor, TCR) で、標的細胞上に提示されたペプチドと MHC class I 複合体を認識し、その細胞を殺す作用を持っていることを考えると、標的となる抗原を認識する特異的な抗原受容体を発現している CD8T 細胞を用いない限り、目的の免疫抑制反応を見ることができない可能性が想定された。この可能性を検証する目的で、正常マウスに存在する CD8aaT 細胞を調整して疾患モデルマウスに移植することを試みたが、自己免疫疾患を抑制することはできなかった。正常マウスの脾臓やリンパ節に存在する数少ない CD8aaT 細胞が、「様々な自己免疫疾患の抑制に寄与している、様々な免疫異常を抑制する機能を持った疾患特異的抗原受容体を持った T 細胞」の全てが揃っている可能性は低いことから、この実験からでは、CD8aaT 細胞の持つ機能に関して総括的な結論を出すことは難しいと考えられた。そこで、MOG で免疫することによって EAE を誘導できる疾患モデルを用いて、免疫反応時に所属リンパ組織に現れる CD8aaT 細胞に注目した。この CD8aaT 細胞を移植することによって、MOG 免疫によって誘導される EAE を抑制できるか否かを検証した。この実験では、抑制できる場合と、増悪する場合があることが明らかになった。これらの実験結果は、ある種の抗原特異的 CD8aaT 細胞は免疫抑制反応に関与しているという作業仮説を部分的には支持するという事もできるが、

まだ確証のあるデータは得られていない。今後は、CD8aaT 細胞の TCR のレパトア解析と合わせて解析を進めていくことによって、実態をつかみたいと考えている。

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 28 件)

1. Loss of Stemness, EMT, and Supernumerary Tooth Formation in *Cebpb*^{-/-}*Runx2*^{+/-} Murine Incisors

Scientific Reports **8** 5169 (2018)

Doi: 10.1038/s41598-018-23515-y

Saito K., Takahashi K., Huang B., Asahara M., Kiso H., Togo Y., Tsukamoto H., Mishima S., Nagata M., Iida M., Tokita Y., Asai M., Shimizu A., Komori T., Harada H., MacDougall IM., Sugai M. and Kazuhisa B (査読あり)

2. Id2 Determines Intestinal Identity through Repression of the Foregut Transcription Factor *Irx5*

Mol Cell Biol **38**(9) e00250-17(2018)

Doi:10.1128/MCB.00250-17

Mori, K, Nakamura, H, Kurooka, H, Miyachi, H, Tamada, K, Sugai, M., Takumi, T, Yokota, Y (査読あり)

3. Patterns of clinical practice for sentinel lymph node biopsy in women with node-negative breast cancer: the results of a national survey in Japan.

Breast Cancer **24**, 341-344 (2017)

Doi: 10.1007/s12282-016-0720-5.

Ikeda, T., Sugie, T., Shimizu, A. and Toi, M. (査読あり)

4. Sentinel lymph node biopsy using indocyanine green fluorescence in early-stage breast cancer: a meta-analysis.

Internat. J. Clin. Oncology **22**, 11-17 (2017)

Doi: 10.1007/s10147-016-1064-z.

Sugie, T., Ikeda, T., Kawaguchi, A, Shimizu, A. and Toi, M. (査読あり)

5. Publication Preview Source Inflammatory responses induce an identity crisis of alveolar macrophages leading to pulmonary alveolar proteinosis

J. Biol. Chem. **292** (44): 18098-18112 (2017)

Doi: 10.1074/jbc.M117.808535.

Ebina-Shibuya R, Matsumoto M, Kuwahara M, Jang KJ, Sugai M, Ito Y, Funayama R, Nakayama K, Sato Y, Ishii N, Okamura Y, Kinoshita K, Kometani K, Kurosaki T, Muto A, Ichinose M, Yamashita M, Igarashi K. (査読あり)

6. Tubulointerstitial Nephritis with IgM-Positive Plasma Cells

J Am Soc Nephrol **12** 3688-3698 (2017)

Doi: 10.1681/ASN.2016101074.

Takahashi N, Saeki T, Komatsuda A, Munemura C, Fukui T, Imai N, Homma N, Hatta T, Samejima K, Fujimoto T, Omori H, Ito Y, Nishikawa Y, Kobayashi M, Morikawa Y, Fukushima S, Yokoi S, Mikami D, Kasuno K, Kimura H, Nemoto T, Nakamoto Y, Sada K, Sugai M, Naiki H, Yoshida H, Narita I, Saito Y, Iwano M. (査読あり)

7. Effects of *Usag-1* and *Bmp7* deficiencies on Murine Tooth Morphogenesis.

BMC Dev. Biol. **16**, 14 (2016)

Doi: 10.1186/s12861-016-0117-x

Saito, K., Takahashi, K., Asahara, M., Kiso, H., Togo, Y., Tsukamoto, H., Huang, B., Sugai, M., Shimizu, A., Motokawa, M., Slavkin, H. C. and Bessho, K. (査読あり)

8. Prognostic Impact of Salvage Treatment on Hearing Recovery in Patients with Sudden Sensorineural Hearing Loss Refractory to Systemic Corticosteroids: A retrospective Observational Study.

J. Auris Nasus Larynx **43**, 489-494

Doi: 10.1016/j.anl.2015.12.004 (2016).

Nakagawa, T., Yamamoto, M., Kumakawa, K., Usami, S., Hato, N., Tabuchi, K., Takahashi, M., Fujiwara, K., Sasaki, A., Komune, S., Yamamoto, N., Hiraumi, H., Sakamoto, T., Shimizu, A. and Ito, (査読あり)

9. Antagonistic functions of *USAG-1* and *RUNX2* during tooth development.

PLoS ONE **11**, e0161067 (2016)

Doi: 10.1371/journal.pone.0161067

Togo, Y. Takahashi, K, Saito, K., Kiso, H., Tsukamoto, H., Huang, B., Yanagita, M., Sugai, M., Harada, H., Komori, T., Shimizu, A., MacDougall, M. and Bessho, K. (査読あり)

10. A pilot study of regenerative therapy using controlled release of recombinant human fibroblast growth factor for patients with pre-collapse osteonecrosis of the femoral head.

Internat. Orthopaedics **40**, 1747-1754 (2016)

Doi: 10.1007/s00264-015-3083-1

Kuroda, Y., Asada, R., So, K., Yonezawa, A., Nankaku, M., Mukai, K., Ito-Ihara, T., Tada, H., Yamamoto, M., Murayama, T., Morita, S., Tabata, Y., Yokode, M., Shimizu, A., Matsuda, S., and Akiyama, H. (査読あり)

11. Heterogeneous fibroblasts underlie age-dependent tertiary lymphoid tissues in the kidney.

JCI Insight **1**, e87680 (2016)

Doi: 10.1172/jci.insight.87680

Sato, Y., Mii, A., Hamazaki, Y., Fujita, H., Nakata, H., Masuda, K., Nishiyama, S., Shibuya, S., Haga, H., Ogawa, O., Shimizu, A., Narumiya, S., Kaisho, T., Arita, M., Yanagisawa, M., Miyasaka, M., Sharma, K., Minato, N., Kawamoto, H. and Yanagita, M. (査読あり)

12. Mitochondrial function provides instructive signals for activation-induced B-cell fates.

Nature Comm. **6**, 6750 (2015)

Doi: 10.1038/ncomms7750

Jang, K.-J., Mano, H., Aoki, K., Hayashi, T., Muto, A., Nambu, Y., Takahashi, K., Itoh, K., Taketani, S., Nutt, S. L., Igarashi, K., Shimizu, A. and Sugai, M. (査読あり)

13. Safety and efficacy of sustained release of basic fibroblast growth factor using gelatin hydrogel in patients with critical limb ischemia.

Heart and Vessels **31**, 713-721 (2016)

Doi: 10.1007/s00380-015-0677-x

Kumagai, M., Marui, A., Tabata, Y., Takeda, T., Yamamoto, M., Yonezawa, A., Tanaka, S., Yanagi, S., Ito-Ihara, T., Ikeda, T., Murayama, T., Teramukai, S., Katsura, T., Matsubara, K., Kawakami, K., Yokode, M., Shimizu, A. and Sakata, R. (査読あり)

14. Safety and Antitumor Activity of Anti-PD-1 Antibody, Nivolumab, in Patients With Platinum-Resistant Ovarian Cancer.

J. Clin. Oncol. **33**, 4015-4022 (2015)

Doi: 10.1200/JCO.2015.62.3397

Hamanishi, J., Mandai, M., Ikeda, T., Minami, M., Kawaguchi, A., Murayama, T., Kanai, M., Mori, Y., Matsumoto, S., Chikuma, S., Matsumura, N., Abiko, K., Baba, T., Yamaguchi, K., Ueda, A., Hosoe, Y., Morita, S., Yokode, M., Shimizu, A., Honjo, T. and Konishi, I. (査読あり)

15. ANKH Polymorphisms and Clicking of the Temporomandibular Joint in Dental Residents.

J. Maxillofacial and Oral Surgery, **14**, 247-251(2015) Doi: 10.1007/s12663-014-0622-z

Huang, B., Takahashi, K., Goto, T., Kiso, H., Sugai, M., Shimizu, A., Kosugi, S. and Bessho, K. (査読あり)

16. Id2 deletion attenuates Apc-deficient ileal tumor formation.

Biol Open. **10**;4(8):993-1001. (2015)

Biyajima K., Kakizaki F., Shen X., Mori K., Sugai M., Taketo MM., Yokota Y. (査読あり)

17. Activation of B1a cells in peritoneal cavity by T cell-independent antigen expressed on polymeric micelle.

J. Pharm. Sci. **104**, 1389-1847 (2015)

Kim, C.J., Hara, E., Shimizu, A., Sugai, M. and Kimura, S.

(査読あり)

18. Functional evaluation of activation-dependent alterations in the sialoglycan composition of T cells.

J. Biol. Chem. **289**, 1564-1579 (2014)

Naito-Matsui, Y., Takada, S., Kano, Y., Iyoda, T., Sugai, M., Shimizu, A., Inaba, K., Nitschke, L., Tsubata, T., Oka, S., Kozutsumi, Y. and Takematsu, H. (査読あり)

19. Clinical effects of ghrelin on gastrointestinal involvement in patients with systemic sclerosis.

Endocrine J. **61**, 735-742 (2014)

Ariyasu, H., Iwakura, H., Yukawa, N., Murayama, T., Yokode, M., Tada, H., Yoshimura, K., Teramukai, S., Ito, T., Shimizu, A., Yonezawa, A., Kangawa, K., Mimori, T. and Akamizu, T. (査読あり)

20. Interactions between BMP-7 and USAG-1 (uterine sensitization-associated gene-1) regulate supernumerary organ formation.

PLoS ONE **9**, e96938 (2014).

Kiso, H., Takahashi, K., Saito, K., Togo, Y., Tsukamoto, H., Huang, B., Sugai, M., Shimizu, A., Tabata, Y., Economides, A. N., Slavkin, H. C. and Bessho, K. (査読あり)

21. Prospective signs of cleidocranial dysplasia in Cebp deficiency.

J. Biomed Sci **21**, 44 (2014)

Huang, B., Takahashi, K., Jennings, E. A., Puntang-on, P., Kiso, H., Togo, Y., Saito, K., Sugai, M., Akira S., Shimizu, A. and Bessho, K. (査読あり)

22. Preclinical validation of talaporfin sodium-mediated photodynamic therapy for esophageal squamous cell carcinoma.

PLoS ONE **9**, e103126 (2014)

Ohashi, S., Kikuchi, O., Tsurumaki, M., Nakai, Y., Kasai, H., Horimatsu, T., Miyamoto, S., Shimizu, A., Chiba, T. and Muto, M. (査読あり)

23. Phenotypes of CCAAT/enhancer-binding protein beta deficiency: Hyperdontia and elongated coronoid process.

Oral Diseases **19**, 144-150 (2013)

Huang, B., Takahashi, K., Sakata-Goto, T., Kiso, H., Togo, Y., Saito, K., Tsukamoto, H., Sugai, M., Akira, S., Shimizu, A. and Bessho, K. (査読あり)

24. An exploratory clinical study on the safety and efficacy of an autologous fibroblast-seeded

artificial skin cultured with animal product-free medium in patients with diabetic foot ulcers.

Internat. Wound Journal **11**, 183-189 (2014)

Morimoto, N., Ito, T., Takemoto, S., Katakami, M., Kanda, N., Tada, H., Tanaka, S., Teramukai, T., Kawai, K., Nakamura, Y., Kasai, Y., Yokode, M., Maekawa, T., Shimizu, A. and Suzuki, S. (査読あり)

25. Comparison of the indocyanine green fluorescence and blue dye methods in detection of sentinel lymph nodes in early-stage breast cancer.

Annal. Surg. Oncol. **20**, 2213-2218 (2013)

Sugie, T., Sawada, T., Tagaya, N., Kinoshita, T., Yamagami, K., Suwa, H., Ikeda, T., Yoshimura, K., Niimi, M., Shimizu, A. and Toi, M. (査読あり)

26. Analysis of new drugs whose clinical development and regulatory approval were hampered during their introduction in Japan.

J. Clin. Pharm. Therapeutics **38**, 309-313 (2013)

Asada, R., Shimizu, S., Ono, S., Ito, T., Shimizu, A. and Yamaguchi, T. (査読あり)

27. Evasion from accelerated blood clearance of nanocarrier named as "Lactosome" induced by excessive administration of Lactosome.

Biochem. Biophys. Acta-General Sub. **1830**, 4046-4052 (2013)

Hara, E., Makino, A., Kurihara, K., Sugai, M., Shimizu, A., Hara, I., Ozeki, E. and Kimura, S. (査読あり)

28. Novel collagen/gelatin scaffold with sustained release of basic fibroblast growth factor: clinical trial for chronic skin ulcers.

Tissue Enginer. Part A **19**, 1931-1940 (2013)

Morimoto, N., Yoshimura, K., Niimi, M., Ito, T., Aya, R., Fujitaka, J., Tada, H., Teramukai, S., Murayama, T., Toyooka, C., Miura, K., Takemoto, S., Kanda, N., Kawai, K., Yokode, M., Shimizu, A. and Suzuki, S. (査読あり)

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Mitochondrial function in cell fate determination of activated B cells

Symposia Consortium of Biological Sciences 2017 Session 4AS11 JBS/MBSJ (Enzymes, Redox and Bioenergetics) Dec. 9, 2017 Kobe, JAPAN (Oral presentation)

Sugai, M.

2. Transcription factor Sip1 functions to prevent autoimmunity in the BCR checkpoint of immature B cell stage 第89回日本生化学会大会 2016年9月26日、仙台国際センター(宮城県 仙台市) 林達成、南部由希子、眞野浩人、ジャン キョンジン、東雄二郎、クリ

スティン ヴァーシェーレン、ダニー ハイレポーエック、清水章、菅井学

3. Mitochondrial function provides instructive signals for activation-induced B-cell fates. 日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター(北海道 札幌) 2015年11月19日

Jang, K J., Mano, H., Aoki, K. Hayashi, T., Muto A., Nambu, Y., Takahashi, K., Itoh, K., Taketani, S., Nutt, S.L., Igarashi, K., Shimizu, A. and Sugai, M.

4. The role of transcription factor Sip1 for the repression of Rag genes and its synergistic effect with CD19 on autoimmunity 日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター(北海道 札幌) 2015年11月19日

Hayashi T., Nambu Y., Jang KJ., Mano H., Higashi Y., Verschueren K., Huylebroeck D., Shimizu A. and Sugai M.

5. 転写因子 Sip1 による IL-7 シグナルおよび免疫グロブリン遺伝子組換えの制御、BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会)神戸ポートアイランド 2015年12月2日

林達成、南部由希子、眞野浩人、ジャンキョンジン、東雄二郎、クリスティンヴァーシェーレン、ダニーハイレポーエック、清水章、菅井学

6. ミトコンドリア機能による活性化B細胞運命決定機構 第39回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会、特別講演 岡山コンベンションセンター(岡山県 岡山市) 2015年8月29日

菅井学

7. B cell-fate determination by mitochondrial ROS via inhibition of heme synthesis 第87回日本生化学会大会 シンポジウム、2014年10月16日 京都国際会議場(京都府 京都市)

Sugai M. Kyoung-Jin Jang

8. ミトコンドリアによる活性化B細胞運命決定機構の解析—ヘム合成制御による分化決定—第87回日本生化学会大会 シンポジウム、2014年10月17日 京都国際会議場(京都府 京都市)

蔣景真、眞野浩人、青木耕史、林達成、武藤哲彦、南部由希子、原恵里、高橋克、伊藤克彦、竹谷茂、五十嵐和彦、清水章、菅井学

9. Mitochondrial function regulates heme oxygenase-1 expression through modulating ability of heme synthesis

8th International Conference on Heme Oxygenases, BioIron & Oxidative Stress, Sydney,

Australia 9th Oct. 2014. (Oral presentation)
Sugai M., Kyoung-Jin Jang, Kazuhiko Igarashi
and Akira Shimizu

(4)研究協力者
()

10. Essential role of SIP1 and CD19 in B cell differentiation. 日本免疫学会学術集会、幕張メッセ (千葉県 幕張) 2013 年 12 月 11 日
Hayashi T, Nambu Y, Jang KJ, Mano H, Higashi Y, Kristin V, Danny H, Shimizu A., Sugai M.

〔図書〕 (計 1 件)

1. Roles of the Epithelial Autophagy in the Intestinal Mucosal Barrier
Chronic inflammation 603-616 (2016)
DOI:10.1007/978-4-431-56068-5_45
Aoki K. and Sugai M.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 1 件)

名称：T細胞の分化誘導方法、T細胞の製造方法、T細胞、医薬組成物、及び、スクリーニング方法
発明者：菅井学、清水章、南部由希子
権利者：京都大学
種類：PTC
番号：PTC/JP2013/056758
出願年月日：平成25年3月12日
国内外の別：国外

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 清水章
(Akira Shimizu)
京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号：00162694

(2)研究分担者 菅井学
(Manabu Sugai)
福井大学・学術研究院医学系部門・教授
研究者番号：90303891

(3)連携研究者