

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461493

研究課題名(和文) T細胞アナジー関連遺伝子はいかにして制御性T細胞による自己抗体産生制御に関わるか

研究課題名(英文) Regulation of autoantibody production by regulatory T cells expressing anergy-associated genes

研究代表者

岡村 僚久 (Okamura, Tomohisa)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10528996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：T細胞アナジー関連遺伝子EGR2は自己抗体産生を特徴とする全身性エリテマトーデスの疾患感受性遺伝子であり、申請者らはEgr2を高発現するCD4陽性CD25陰性LAG3陽性 制御性T細胞(以下、LAG3 Treg)を報告している。本課題において、LAG3 TregがEgr2発現を介してTGF- $\beta$ 3産生を大量に産生し、B細胞のSyk, STAT6, NF- $\kappa$ Bを抑制することで液性免疫を制御すること、また、Egr2の機能はEgr3により補完されることなどを同定した。以上の知見より、T細胞アナジー関連遺伝子による詳細な自己抗体産生制御機構が明らかとなり、当初の目的を達成した。

研究成果の概要(英文)：Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by autoantibody production and associated with a wide range of clinical manifestations. Early growth response gene-2 (EGR2), a zinc-finger transcription factor, is known to affect susceptibility to SLE in human. We previously reported CD4+CD25-Foxp3-LAG3+ regulatory T cells (LAG3 Tregs) that characteristically express Egr2. In this study, we revealed that LAG3 Tregs, but not CD4+CD25+ Tregs, produce enormous amounts of TGF- $\beta$ 3 in an Egr2-dependent manner. TGF- $\beta$ 3 effectively suppressed autoantibody production from B cells through suppression of Syk, STAT6, and NF- $\kappa$ B pathways. Intriguingly, Egr3 was able to compensate the function of Egr2. These findings elucidated the mechanisms of T cell anergy-associated gene Egr2-mediated regulation of humoral immunity.

研究分野：医歯薬学

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 TGF-

#### 1. 研究開始当初の背景

当研究室は転写因子 Egr2 を特異的に発現する CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 制御性 T 細胞 (以下、LAG3 Treg) を同定し (PNAS. 106:13974,2009)、EGR2 は自己抗体産生を特徴とする代表的難治性自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス (SLE) の疾患感受性遺伝子であることを報告している (Hum.Mol.Genet.19:2313,2010)。このことは LAG3 Treg が自己抗体産生制御機構において重要な役割を果たしていることを示唆しており、その制御機構の解明は SLE を含む自己抗体産生機序を介した自己免疫疾患の新規治療法開発に繋がる可能性を内包している。

#### 2. 研究の目的

本課題では、当研究室で同定した転写因子 Egr2 を特異的に発現する CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 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。

#### 3. 研究の方法

(1) LAG3 Treg による B 細胞制御に関する新規抑制分子の同定

LAG3 Treg を含む各種 T 細胞サブセットを用いたマイクロアレイ解析による発現遺伝子の網羅的解析により、LAG3 Treg で発現する B 細胞制御分子の探索を行った。また、LAG3 Treg の細胞表面における PD-L1 発現の有無につき FACS を用いた評価を行った。

(2) LAG3 Treg の機能解析

Fas 欠損マウス B6/*lpr* マウスから回収した LAG3 Treg が産生する TGF- $\beta$ 3 を測定し、LAG3 Treg による TGF- $\beta$ 3 産生における Fas 遺伝子の役割を評価した。さらに、SLE モデル MRL/*lpr* マウスの病勢が、養子移入した MRL/+ マウス LAG3 Treg により TGF- $\beta$ 3 依存性に制御されるか否かにつき検討した。

(3) TGF- $\beta$ 3 を介した B 細胞制御誘導メカニズムの解明

*In vitro* において B 細胞を IgM もしくは、 $\alpha$  抗 CD40 抗体 + IL-4 刺激を recombinant TGF- $\beta$ 3 の存在下、非存在下において検討することで、TGF- $\beta$ 3 による B 細胞のアポトーシス誘導能、増殖抑制能、抗体産生抑制能につき評価を行った。また、PD-1 欠損 B 細胞を用いて TGF- $\beta$ 3 による B 細胞抑制機構における PD-1/PD-L1 相互作用の重要性につき検討を行った。また、MRL/*lpr* マウスに pCAGGS-Tgfb3 ベクターを経静脈投与することで *in vivo* における TGF- $\beta$ 3 の機能評価を行った。

(4) LAG3 Treg による B 細胞制御機構における Egr2 の機能解析

T 細胞特異的 Egr2 コンディショナルノック

アウト (CKO) マウス (Egr2<sup>fl/fl</sup> CD4-Cre<sup>+</sup>) へ野生型 (WT) LAG3 Treg を移入し、Egr2CKO マウスにおける濾胞 B 細胞、濾胞 T 細胞分化および過剰な抗体産生が抑制されるか否かにつき検討した。

(5) Egr2/Egr3 ダブル CKO (DKO) マウス (Egr2<sup>fl/fl</sup> Egr3<sup>fl/fl</sup> CD4-Cre<sup>+</sup>) の作製

Egr2 の機能は Egr family である Egr3 により補完されることが想定されているが、T 細胞における Egr2、Egr3 の協働作用に関しては不明なままであったため、Egr2/Egr3 DKO マウスを作製しその表現型を解析した。

#### 4. 研究成果

本課題において申請者らは、マイクロアレイ解析、ELISA および、上述の *in vitro* における機能解析にて、LAG3 Treg が TGF- $\beta$ 3 産生を介して B 細胞を制御することを同定し、初めて TGF- $\beta$ 3 による免疫抑制作用を明らかにした。また、機能性 Fas 遺伝子を欠損する SLE モデル MRL/*lpr* マウスに pCAGGS-Tgfb3 を投与し治療実験を行い、TGF- $\beta$ 3 が SLE 様病態を強力に改善することを示した。さらに、TGF- $\beta$ 3 による B 細胞抑制メカニズムについても詳細な検討を行い、TGF- $\beta$ 3 が B 細胞機能に重要な、Syk, STAT6, NF- $\kappa$ B を抑制することを明らかにした。LAG3 Treg は PD-1 リガンドである PD-L1 を高発現するが、B 細胞上の PD1 発現が TGF- $\beta$ 3 によるアポトーシス誘導に必要であったことより、LAG3 Treg は TGF- $\beta$ 3 産生および、PD1-PD-L1 相互作用を介して B 細胞を制御することが想定された。さらに、T 細胞特異的 Egr2CKO マウス、Egr2/Egr3DKO マウスの表現型解析を行った。Egr2/Egr3CKO マウスにおける濾胞 B 細胞、濾胞 T 細胞分化は Egr2 CKO マウスよりも著しく亢進しており、Egr2/Egr3DKO マウス LAG3 Treg から産生される TGF- $\beta$ 3 も Egr2CKO マウスのそれと比して著しく低下していた。これらの検討にて、T 細胞における Egr2 機能を Egr3 が補完することを証明した。以上の知見より、LAG3 Treg で発現する T 細胞アナーキー誘導因子 Egr2 を介した液性免疫制御メカニズムが明らかとなり、本課題における目的を達成した。LAG3 Treg による TGF- $\beta$ 3 を介した自己抗体産生制御機構に関するこれらの知見は論文として発表し (Nat Communications. 2015;6:6329) 同論文は Nature Japan において「注目の論文」に選出され、高く評価された。

#### 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 16 件)

1. Shoda H, Hanata N, Sumitomo S, Okamura

- T, Fujio K, Yamamoto K. Immune responses to Mycobacterial heat shock protein 70 accompany self-reactivity to human BiP in rheumatoid arthritis. *Sci Rep*. 2016 Mar 1;6:22486. doi: 10.1038/srep22486. 査読有
2. Fujio K, Okamura T, Sumitomo S, Yamamoto K. Therapeutic potential of regulatory cytokines that target B cells. *Int Immunol*. 2016 Apr;28(4):189-95. doi: 10.1093/intimm/dxv069. 査読有
  3. Okamura T, Morita K, Iwasaki Y, Inoue M, Komai T, Fujio K, Yamamoto K. Role of TGF- $\beta$ 3 in the regulation of immune responses. *Clin Exp Rheumatol*. 2015; 33 (Suppl. 92): S63-S69. 査読有 open
  4. Kumagai H, Ikeda Y, Motozawa Y, Fujishiro M, Okamura T, Fujio K, Okazaki H, Nomura S, Takeda N, Harada M, Toko H, Takimoto E, Akazawa H, Morita H, Suzuki J, Yamazaki T, Yamamoto K, Komuro I, Yanagisawa M. Quantitative Measurement of GPCR Endocytosis via Pulse-Chase Covalent Labeling. *PLoS One*. 2015 May 28;10(5), pp. 1 – 13. :e0129394. doi: 10.1371/journal.pone.0129394. 査読有
  5. 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; 45: 1643–1653 doi: 10.1002/eji.201444965. 査読有
  6. Shoda H, Fujio K, Sakurai K, Ishigaki K, Nagafuchi Y, Shibuya M, Sumitomo S, Okamura T, Yamamoto K. Autoantigen BiP-derived HLA-DR4 epitopes differentially recognized by effector and regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2015 May; 67(5):1171-81. doi: 10.1002/art.39054. 査読有
  7. Okamura T, Sumitomo S, Morita K, Iwasaki Y, Inoue M, Nakachi S, Komai T, Shoda H, Miyazaki J, Fujio K, Yamamoto K. TGF- $\beta$ 3-expressing CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells control humoral immune responses. *Nature Communications*, 2015; Feb 19;6:6329. pp. 1 – 14. doi: 10.1038/ncomms7329. 査読有
  8. Okamura T, Morita K, Fujio K, Yamamoto K. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. . *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 2015, ;38(1):69-77. doi: 10.2177/jsci.38.69. 査読無
  9. Iwasaki Y, Fujio K, Okamura T, Yamamoto K. Interleukin-27 in T cell immunity. *Int J Mol Sci*. 2015 Jan 27;16(2):2851-63. doi: 10.3390/ijms16022851. 査読無
  10. Fujio K, Okamura T, Sumitomo S, Yamamoto K. The functions of CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells and Egr2 in the regulation of autoimmunity. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 2014;37(2):69-73. 査読無 in Japanese ( PMID: 24835133 )
  11. 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- $\beta$ 1 expression and the regulatory activity of CD4-positive T cells in vivo. *J Immunol*. 2013 Sep 1;191(5):2351-9. doi: 10.4049/jimmunol.1202106. Epub 2013 Jul 31. 査読有 ( PMID: 23904169 )
  12. 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. in Japanese 査読無
  13. 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, pp. 1 – 3. 査読有 doi: 10.4161/jkst.23952. (PMID: 24058814)
  14. 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 Apr;43(4):1063-73. doi: 10.1002/eji.201242942. 査読有 (PMID: 23349024)
  15. 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. (PMID: 23253929)
  16. 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 S. Autoantibody against WD repeat domain 1 is a novel serological biomarker for screening of thyroid neoplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013 Jul;79(1):35-42. doi: 10.1111/cen.12121. Epub 2013 May 6. 査読有 (PMID: 23215816)

〔学会発表〕(計 9件)

1.

発表者名 岡村僚久

発表標題 B 細胞を制御する T 細胞

学会等名 第 43 回日本臨床免疫学会総会

発表年月日 2015 年 10 月 22 日

発表場所 神戸国際会議場(神戸市)

2.

発表者名 OKAMURA Tomohisa, MORITA Kaoru, INOUE Mariko, IWASAKI Yukiko, SUMITOMO Shuji, KOMAI Toshihiko, SHODA Hirofumi, FUJIO Keishi, & YAMAMOTO Kazuhiko

発表標題 Regulation of humoral immune responses by TGF- $\beta$ -producing CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells immunity (口頭発表)

学会等名 第 59 回日本リウマチ学会総会・学術集会

発表年月日 2015 年 4 月 23 日

発表場所 名古屋国際会議場(名古屋市)

「JCR 2015 International Workshop Award」受賞

3.

発表者名 岡村僚久

発表標題 CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 制御性 T 細胞による液性免疫制御機構

学会等名 第 1 回 T Cell Seminar

発表年月日 2015 年 2 月 10 日

発表場所 帝国ホテル(新宿区)

4.

発表者名 Tomohisa Okamura, Kaoru Morita, Mariko Inoue, Toshihiko Komai, Yukiko Iwasaki, Shuji Sumitomo, Shinichiro Nakachi, Hirofumi Shoda, Keishi Fujio, and Kazuhiko Yamamoto

発表標題 TGF- $\beta$  3-Producing CD4+CD25-LAG3+ Regulatory T Cells Control B Cell Responses (口頭発表)

学会等名 The First Symposium on Max Planck-The University of Tokyo Center for Integrative Inflammation

発表年月日 2014 年 12 月 18 日

発表場所 Harnack House, Berlin(ドイツ)

5.

発表者名 OKAMURA Tomohisa, MORITA Kaoru, INOUE Mariko, IWASAKI Yukiko, SUMITOMO Shuji, KOMAI Toshihiko, SHODA Hirofumi, FUJIO Keishi, & YAMAMOTO Kazuhiko

発表標題 TGF- $\beta$  3-producing CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells control humoral immunity (口頭発表)

学会等名 第 43 回日本免疫学会学術集会

発表年月日 2014 年 12 月 12 日

発表場所 国立京都国際会館(京都市)

6.

発表者名 岡村僚久、藤尾圭志、森田薫、井上眞璃子、駒井俊彦、岩崎由希子、住友秀次、渋谷美穂子、庄田宏文、山本一彦

発表標題 CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞による自己抗体産生制御機構 (ポスター)

学会等名 第 42 回日本臨床免疫学会総会

発表年月日 2014 年 9 月 26 日

発表場所 京王プラザホテル(新宿区)

7.

発表者名 Tomohisa Okamura, Keishi Fujio, Kaoru Morita, Yukiko Iwasaki, Mariko Inoue, Toshihiko Komai, Shuji Sumitomo, Mihoko Shibuya, Hirofumi Shoda, and Kazuhiko Yamamoto

発表標題 CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells controls excessive B cell responses (口頭発表)

学会等名 第 58 回日本リウマチ学会学術集会

発表年月日 2014 年 4 月 26 日

発表場所 グランドプリンスホテル新高輪(東京都)

8.

発表者名 岡村僚久

発表標題 「CD4 + CD25 - LAG3 + 制御性 T 細胞による免疫制御機構」

学会等名 聖路加国際病院 第 2 回 明石町リウマチ連携セミナー 講演

発表年月日 2014 年 2 月 5 日

発表場所 聖路加国際病院 トイスラー記念ホール(中央区)

9.

発表者名 Tomohisa Okamura, Keishi Fujio, Mihoko Shibuya, Shuji Sumitomo, Hirofumi Shoda, Yukiko Iwasaki, Kaoru Morita, Mariko Inoue, Kazuhiko Yamamoto

発表標題 “ CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cell controls excessive B cell antibody production and systemic autoimmunity ”

学会等名 日本免疫学会学術集会

発表年月日 2013 年 11 月 13 日

発表場所 幕張メッセ(千葉市)

〔図書〕(計 4件)

1.

著者名：岡村僚久

出版社名：先端医学社

書名：「分子リウマチ治療」vol.9 no.3 連載「疾患からみた細胞表面機能分子」

発行年：2016 年 8 月発行予定

総ページ数：未定

2 .

著者名：岡村僚久、藤尾圭志  
出版社名：先端医学社  
書名：「炎症と免疫」Vol. 24, no.1, 2016, 1  
月号 第 139 号「自己抗体産生のメカニズム」  
発行年：2016 年  
総ページ数：5 ページ

3 .

著者名：岡村僚久、藤尾圭志、山本一彦  
出版社名：医歯薬出版株式会社  
書名：医学のあゆみ 246(10): 865-869, 2013  
発行年：2013 年  
総ページ数：5 ページ

4 .

著者名：岡村僚久  
出版社名：メディカルレビュー社  
書名：「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」自己免疫  
疾患の最近の話題と展望 特集号 Volume 31.  
No.1 17-27, 2013  
発行年：2013 年  
総ページ数：11 ページ

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：B細胞活性化の抑制剤及び自己免疫疾  
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：同上

種類：PCT

番号：PCT/JP2015/065466

出願年月日：2014.11.28

国内外の別：国際

〔その他〕

ホームページ：

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

受賞歴

2014年9月26日 第42回日本臨床免疫学会  
優秀ポスター賞 受賞

標題：「CD4陽性 CD25陰性 LAG3陽性制御性 T  
細胞による自己抗体産生制御機構」

2015年4月23日 第59回日本リウマチ学  
会総会・学術集会

JCR 2015 International Workshop Award 受  
賞

標題：「Regulation of humoral immune  
responses by TGF- $\beta$ -producing  
CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells」

6 . 研究組織

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