

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461499

研究課題名(和文) 病因抗原が未知の自己免疫疾患に対する組織抗原特異的免疫抑制療法の開発

研究課題名(英文) The development of immunosuppressive treatment to organ-specific autoantigens in autoimmune diseases induced by unknown autoantigens

研究代表者

平田 真哉 (HIRATA, Shinya)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60418829

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)：自己免疫疾患において、抗原特異的に免疫を制御する治療法の開発が強く求められている。今回、我々はマウスの自己免疫疾患モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)において、ミエリン抗原のMOGとTRAILを高発現するES細胞由来の樹状細胞(ES-DC-TRAIL/MOG)により、異なるミエリン抗原のMBPで誘導したEAEの発症を抑制することを観察した。また、この免疫抑制には制御性T(Treg)細胞が関与していることが示唆された。以上より、TRAILと組織抗原を高発現するES-DCによりTreg細胞を介して病因抗原が未知の自己免疫疾患においても組織抗原特異的な免疫抑制療法を出来る可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：It is desirable to develop a therapeutic means to down-modulate immune responses in an antigen-specific manner without causing systemic immune suppression. In the present study, we found that the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) induced by myelin autoantigen, myelin basic protein (MBP), was also decreased after treatment with genetically modified embryonic stem cell-derived dendritic cells (ES-DC) presenting another myelin autoantigen, myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) peptide, and simultaneously expressing TRAIL (ES-DC-TRAIL/MOG). This preventive effect was related to regulatory T cells (Treg). For the treatment of organ-specific autoimmune diseases, induction of Treg reactive to the organ-specific autoantigens by the transfer of DC-presenting antigens and simultaneously overexpressing TRAIL therefore appears to be a promising strategy.

研究分野：臨床免疫

キーワード：自己免疫疾患 組織抗原特異的免疫抑制 樹状細胞 制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患や臓器移植における拒絶反応の治療において、個体の免疫応答を全身的な抑制状態に陥らせることなく、抗原特異的に抑制する手法の開発が強く求められている。その中でも、免疫抑制性分子の遺伝子を導入した樹状細胞 (DC) にタンパク質やペプチド抗原をパルスして、これをモデル動物に投与することにより、抗原特異的免疫抑制を誘導する手法が盛んに報告されている。しかし、その一方で、多くの自己免疫疾患において、病原性リンパ球が認識する抗原は、いまだに明らかにされていない。また、自己免疫疾患では、その経過中に、炎症が起きている組織に発現する別の自己抗原がリンパ球の新たな標的として認識され、次第に様々な組織特異的な自己抗原を認識するリンパ球が出現する“epitope spreading”現象が知られている。このため、上記の DC 療法で、ひとつの自己抗原に対する病原性リンパ球を抗原特異的に抑制しても、自己免疫疾患をコントロールできない可能性が高く、臨床応用の問題点である。近年、制御性 T (Treg) 細胞が発見され解析がすすむと、T 細胞受容体が認識する抗原特異的に活性化されて、細胞接触あるいは微小環境を介して T 細胞を抑制できることがわかってきて、臨床応用が待たれている。

2. 研究の目的

そこで、自己免疫疾患の炎症が起きている組織に特異的に発現する自己抗原を同定して、これを認識する Treg 細胞を誘導することができれば、この Treg 細胞がその特定の組織で病原性リンパ球を抑制して、疾患を抑えることが出来るのではないかと考えた。組織に特異的な抗原を選定し、この抗原遺伝子と TRAIL や IL-10、TGF- β などの Treg 細胞や抑制性 T 細胞の誘導に関与すると考えられる遺伝子を導入した ES 細胞由来の樹状細胞 (ES-DC) を作製して、組織抗原特異的な Treg 細胞などの免疫抑制性 T 細胞を *in vitro* あるいは *in vivo* で誘導するシステムを確立し、組織特異的な免疫抑制により自己免疫疾患動物モデルに対する予防・治療効果を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

マイクロアレイのデータをもとに、脳脊髄や筋組織に特異的に高発現する遺伝子を選定する。これらの組織特異的な抗原の遺伝子と抑制性 T 細胞を誘導・増殖することが知られている TRAIL や IL-10 の遺伝子をマウスの ES 細胞に電気穿孔法で遺伝子導入する。この ES 細胞を *in vitro* で ES-DC に分化誘導し、組織特異的な抗原と TRAIL あるいは IL-10 を発現する DC を作製する。この ES-DC を、CD4+T 細胞が主たる病因 T 細胞である実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE)

と CTL が主たる病因 T 細胞であるマウス筋炎モデルの C 蛋白質誘導性筋炎 (CIM) に投与してその効果を評価する。さらに、*in vitro* でこの ES-DC と Treg 細胞を共培養して、組織抗原特異的な Treg 細胞株を樹立し、EAE や CIM のマウスモデルにおける効果を評価・検討する。

4. 研究成果

今回、EAE については脳脊髄・神経組織において、CIM については骨格筋組織において発現量が高く、そのほかの組織に比較的発現量が少ない遺伝子をマウスの正常組織のマイクロアレイのデータをもとに選定した。この遺伝子のメッセンジャー RNA、タンパク質の発現を確認したが、脂質が多く核酸やタンパク質の精製が困難で安定した評価を行うことが出来なかった。また、骨格筋組織については血液の混入が多く本研究で重要な組織特異性の担保が難しく、この同定は困難と判断した。以上のことから、既報が多く、また、ミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白質 (MOG) 以外で EAE に安定して用いられることが知られている、ミエリン塩基性蛋白質 (MBP) やプロテオリピド蛋白質ペプチドで EAE を誘導したところ、どちらも誘導可能であったが、MBP の方が誘導率・重症度ともに安定していた。

免疫抑制性分子である TRAIL や IL-10 の遺伝子を Neomycin (Neo) や Puromycin (Puro) の薬剤耐性遺伝子とつなげた発現ベクターを作製して、電気穿孔法でマウスの ES 細胞に遺伝子導入した。これを高濃度の Neo や Puro で選別し、その後、半定量 RT-PCR、FACS や ELISA などで RNA やタンパク質の発現量の高いものをクローニングした。これらの免疫抑制性分子を高発現する ES 細胞を *in vitro* で ES-DC に分化誘導した。TRAIL を遺伝子導入した ES 細胞は ES-DC に分化誘導できたが、IL-10 を遺伝子導入したものは細胞増殖、ES-DC への分化が不良であり、マウスに投与するに十分な細胞数を確保することが出来なかった。

このため、TRAIL を遺伝子導入した ES 細胞に MOG ペプチドを遺伝子導入して、TRAIL と MOG ペプチドを発現する ES-DC (ES-DC-TRAIL/MOG) を作製した。これをマウスに前投与して、MOG ペプチドで EAE を誘導したところ、MOG ペプチドで誘導した EAE の発症を抑制することができた。また、治療実験として、MOG ペプチドで EAE を誘導したマウスに ES-DC-TRAIL/MOG を投与したところ、EAE の発症を抑制することが出来た。なお、発症した後に ES-DC-TRAIL/MOG を投与しても改善は得られなかった。これはすでに神経損傷を起こしたためと考えられた。また、MOG 以外の無関係な抗原である OVA と TRAIL を遺伝子導入した

ES-DC-TRAIL/OVA は予防実験・治療実験のいずれにおいても EAE の発症を抑制することが出来なかった。

次に、ES-DC-TRAIL/MOG をマウスに先行投与して、MOG 以外の抗原である MBP で EAE を誘導した。その結果、この TRAIL と MOG を発現する ES-DC は MBP 誘導性の EAE も抑制することが出来た。このメカニズムを解析するために、近年報告されている Treg 細胞の関与を調べた。

まず、抗 CD25 抗体を投与して Treg 細胞を除去したマウスにおいて、同様の ES-DC-TRAIL/MOG による MBP 誘導性 EAE の発症抑制実験を行った。その結果、抗 CD25 抗体投与で Treg 細胞が除かれたマウスにおいては、ES-DC-TRAIL/MOG を投与しても MBP 誘導性の EAE の発症を抑制することが出来なかった。

そこで、ES-DC-TRAIL/MOG を投与したマウスの脾臓から CD4+CD25+Treg 細胞を磁気ビーズで分離して、同系の別のマウスに移植し、MBP で EAE を誘導したところ、EAE の発症が抑制された。以上のことから、TRAIL と脳脊髄・神経組織抗原の MOG を発現する ES-DC は、in vivo で (おそらく) MOG 抗原を認識する Treg 細胞を誘導して、神経組織に発現するほかのミエリン抗原である MBP 抗原を認識する病的 Th 細胞を抑えることで EAE の発症を抑制できたことが考えられた。

次に、in vitro で MOG 抗原特異的な Treg 細胞株を作製して、これを移入することで MBP 誘導性の EAE を予防・治療することが出来ないか検討をした。これにより、ES 細胞療法による過剰増殖や癌化の議論をさけて、より安全に組織抗原特異的に自己免疫疾患の治療に応用できる可能性がある。

まず、naïve マウスの脾臓から磁気ビーズで分離した CD4+CD25+Treg 細胞を TRAIL を遺伝子導入した ES-DC と抗 CD3 ϵ 抗体の存在下で共培養したところ、TRAIL を遺伝子導入していない ES-DC と培養した場合に比較して、[3H]-thymidine 取り込み法において、Treg 細胞の増殖反応が強かった。

そこで、ES-DC-TRAIL/MOG を、naïve あるいは MOG で EAE を誘導したマウスの脾臓から磁気ビーズで分離した Treg 細胞と共培養して、MOG 特異的な Treg 細胞株の作製を試みた。しかし、Treg の増殖や維持が困難で、サイトカインなどの調整を行うも前述の実験に用いたほどの十分な細胞数を得るに至らなかった。本件は今後の課題である。

なお、Treg 細胞の増殖における TRAIL の関与を解析するために TRAIL ノックアウト (KO) マウスを用いた研究を行った。その結果、野生型 (WT) と TRAIL-KO マウスの骨髄由来樹状細胞 (BM-DC) と WT あるいは KO マウスの Treg 細胞を in vitro で抗 CD3 抗体と共培養したところ、

TRAIL-KO マウス由来の BM-DC のほうが Treg 細胞の増殖が弱いことが観察された。しかし、Th 細胞については反対に TRAIL-KO マウス由来の BM-DC により強い増殖反応がみられた。すなわち、TRAIL は Th 細胞においては既報の通りに抑制性あるいは細胞死に働くが、Treg 細胞においては増殖促進に働く可能性が示唆され、これまでの現象を説明しうる結果であった。

今後は抗原特異的な Treg 細胞を簡便に in vitro あるいは in vivo で誘導する手法を開発して、組織抗原特異的な免疫制御療法の実現を目指していきたい。

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 11 件)

1. Endo, S., Amano, M., Nishimura, N., Ueno, N., Ueno, S., Yuki, H., Fujiwara, S., Wada, N., Hirata, S., Hata, H., Mitsuya, H. and Okuno, Y. Immunomodulatory drugs act as inhibitors of DNA methyltransferases and induce PU.1 up-regulation in myeloma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 469(2):236-42, 2016, 査読有, DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.11.116.
2. Hirano, T., Higuchi, Y., Yuki, H., Hirata, S., Nosaka, K., Ishii, N., Hashimoto, T., Mitsuya, H. and Okuno, Y. Rituximab Monotherapy and Rituximab-Containing Chemotherapy Were Effective for Paraneoplastic Pemphigus Accompanying Follicular Lymphoma, but not for Subsequent Bronchiolitis Obliterans. *J Clin Exp Hematop.* 55(2):83-8, 2015, 査読有, DOI: 10.3960/jslrt.55.83.
3. Kimura, N., Hirata, S., Miyasaka, N., Kawahata, K. and Kohsaka, H. Injury and subsequent regeneration of muscles activate local innate immunity to facilitate development and relapse of autoimmune myositis. *Arthritis Rheumatol.* 67(4) :1107-16, 2015, 査読有, DOI: 10.1002/art.39017.
4. Okiyama, N., Hasegawa, H., Oida, T., Hirata, S., Yokozeki, H., Fujimoto, M., Miyasaka, N. and Kohsaka, H. Experimental myositis inducible with transfer of dendritic cells presenting a skeletal muscle C protein-derived CD8 epitope peptide. *Int Immunol.* 27(7):327-32, 2015, 査読有, DOI: 10.1093/intimm/dxv001.
5. Kikukawa, Y., Yuki, H., Hirata, S., Ide, K., Nakata, H., Miyakawa, T., Matsuno, N.,

- Nosaka, K., Yonemura, Y., Kawaguchi, T., Hata, H., Mitsuya, H. and Okuno, Y.. Combined use of bortezomib, cyclophosphamide, and dexamethasone induces favorable hematological and organ responses in Japanese patients with amyloid light-chain amyloidosis: a single-institution retrospective study. *Int J Hematol.* 101(2):133-9, 2015, 査読有, 10.1007/s12185-014-1705-9.
6. Ikeda, T., Hirata, S., Takamatsu, K., Haruta, M., Tsukamoto, H., Ito, T., Uchino, M., Ando, Y., Nagafuchi, S., Nishimura, Y. and Senju, S. Suppression of Th1-mediated autoimmunity by embryonic stem cell-derived dendritic cells. *PLoS One.* 9(12), 2014, 査読有, DOI: 10.1371/journal.pone.0115198.
7. Nakamura, T., Kumon, Y., Hirata, S. and Takaoka, H. Abatacept may be effective and safe in patients with amyloid A amyloidosis secondary to rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 32(4):501-8, 2014, 査読有, <http://www.clinexprheumatol.org/abstract.asp?a=7598>
8. Nanki, T., Onoue, I., Nagasaka, K., Takayasu, A., Ebisawa, M., Hosoya, T., Shirai, T., Sugihara, T., Hirata, S., Kubota, T., Harigai, M. and Miyasaka, N. Suppression of elevations in serum C reactive protein levels by anti-IL-6 autoantibodies in two patients with severe bacterial infections. *Ann Rheum Dis.* 72(6):1100-2, 2013, 査読有, DOI: 10.1136/annrheumdis-2012-202768.
9. 平田真哉, 抗 PAD3/PAD4 交叉抗体と関節リウマチの関節破壊, **リウマチ科**, 科学評論社(東京), 51(4): 460-465, 2014, 査読無
10. 平田真哉, SLE における NETs とインフラマソーム活性化, **リウマチ科**, 科学評論社(東京), 50(3): 376-381, 2013, 査読無
11. 平田真哉, リウマチ性疾患における間質性肺病変の多様性, **リウマチ科** 特集: リウマチ性疾患における間質性肺病変の新たな知見, 科学評論社(東京), 49(2): 127-132, 2013, 査読無

〔学会発表〕(計5件)

1. 平田真哉, 熊本大学膠原病内科の最近の診療と実績, 熊本臨床血液懇話会, 2015年9月27日, 熊本県民交流館パレア(熊本県熊本市)
2. 平田真哉, リンパ増殖性疾患の治療後に再燃した関節リウマチの治療におけ

る抗リウマチ薬の安全性, 日本リウマチ学会学術集会, 2015年4月23日-25日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

3. 平田真哉, Case Conference ~ 全身の皮疹にて発症し、診断に難渋した症例 ~, 熊本リウマチ性疾患研究会, 2015年2月13日, ホテル日航熊本(熊本県熊本市)
4. 平田真哉, リンパ増殖性疾患の治療後に関節リウマチを再燃した4症例の解析, 日本リウマチ学会学術集会, 2014年4月24日-26日, グランドプリンス新高輪(東京都港区)
5. 平田真哉, APTT が基準値内でループスアンチコアグラントが陽性となる症例の検討, 日本リウマチ学会学術集会, 2013年4月18日-20日, 国立京都国際会館(京都府京都市)

〔図書〕(計0件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

該当なし

取得状況(計0件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/ketsueki/default.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田真哉 (HIRATA, Shinya)

熊本大学医学部附属病院膠原病内科・助教

研究者番号: 60418829

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし