

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860803

研究課題名(和文) IL-27による制御性T細胞誘導機構の解明 SLEの新規治療応用へ

研究課題名(英文) Elucidation of the regulatory T cell induction mechanism by IL-27 -towards novel therapy for SLE-

研究代表者

岩崎 由希子 (Iwasaki, Yukiko)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30592935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは、転写因子early response gene 2(Egr2)を特異的に発現するCD4陽性CD25陰性LAG3陽性新規制御性T細胞(LAG3 Treg)を近年同定した。申請者は、サイトカインinterleukin(IL)-27がナイーブCD4陽性T細胞にEgr2、LAG3双方を誘導することを見出し、本研究により、IL-27誘導性CD4陽性T細胞がB細胞からの抗体産生をTGF- $\beta$ 3依存性に抑制することが明らかとなった。更に、IL-27からEgr2発現に至るシグナル伝達が、転写因子STAT3を介することも示された。本研究にて新たな全身性エリテマトーデス治療に繋がる知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：We have recently reported the CD4+CD25-LAG3+ new regulatory T cells (LAG3 Treg), which specifically express the transcriptional factor early response gene 2 (Egr2). The applicant has already found that interleukin (IL)-27 cytokine can induce both Egr2 and LAG3 on naive CD4-positive T cells. In this project, it was shown that the IL-27-induced CD4-positive T cells can suppress antibody production from B cells. In addition, the applicant revealed that IL-27 signal can be transduced by the transcriptional factor signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), resulting in Egr2 expression. These findings provide insights into the novel therapeutic potential for systemic lupus erythematosus (SLE).

研究分野：膠原病学、免疫学

キーワード：IL-27 制御性T細胞 Egr2

## 1. 研究開始当初の背景

自己免疫応答・寛容のメカニズムは急速に解明が進んでいるが、細胞レベルでは制御性(regulatory)T細胞(以下Treg)が自己免疫寛容維持において中心的役割を果たしていることが広く知られている。Tregの中で主要なものは、CD4陽性CD25陽性細胞の表現型を持ち、多様な自己抗原の免疫寛容に関与する。CD4陽性CD25陽性Tregを規定する転写因子としてFoxp3が同定されたことにより、その制御機構に関する研究が世界中で精力的に行われている。一方で、Foxp3に規定されないTregの存在も明らかになり、抗原特異的に末梢において誘導されるFoxp3陰性誘導性(inducible)Tregとして解析されている。従来報告されたタイプ1制御性T細胞(Tr1)は、ヒトやマウスのCD4陽性T細胞を生体外で高濃度のIL-10で刺激した際に、IL-10およびTGF- $\beta$ を産生するT細胞サブセットとして同定され、IL-10依存性にT細胞の活性化と腸炎発症を抑制する。申請者らの研究室(以下当研究室)の岡村らは、CD4陽性CD25陰性LAG3陽性Egr2陽性新規Treg(以下LAG3<sup>+</sup>Treg)を同定した。LAG3<sup>+</sup>TregもIL-10がその抑制能発揮に重要な点で、Tr1を含むIL-10産生Tregサブセットの一つと捉えることが可能である。Egr2はzinc finger型の転写因子の一つで、当研究室と理研の共同研究により、EGR2のsingle nucleotide polymorphism(SNP)がヒトの全身性エリテマトーデス(以下SLE)と関連することが明らかになっている(Hum.Mol.Genet. 19:2313-2320,2010)。また、T細胞特異的Egr2欠損マウスで、脱毛や皮膚症状、抗ds-DNA抗体を認め、免疫複合体やIgG沈着を伴う糸球体腎炎といったSLE様症状をきたすという報告がある(J.Exp.Med. 205:2295-2307,2008)。これらのことから、LAG3<sup>+</sup>Tregはヒトの自己免疫疾患の制御に関わっている可能性が想定される。今後の治療応用を考える上でLAG3<sup>+</sup>Tregを誘導するサイトカインの同定は非常に重要であると考えられ、申請者は、LAG3<sup>+</sup>TregがIL-10を産生すること、一方でIL-10を高産生するTr1細胞がIL-27により誘導されることを手掛かりとして、IL-27がナイーブCD4陽性T細胞にEgr2およびLAG3の双方の発現を誘導することを見出した。更に、CD4陽性T細胞におけるIL-10産生に重要な転写制御因子Blimp-1のプロモーター活性がEgr2により制御されることを、ルシフェラーゼアッセイおよび免疫沈降法(ChIPアッセイ)を用いて証明し、Egr2がIL-27によるIL-10産生誘導に必須であることを明らかにした(Y. Iwasaki et al. Eur. J. Immunol. 43:1063-1073,2013)。

## 2. 研究の目的

上述の結果は、IL-27がEgr2発現誘導を介してLAG3<sup>+</sup>Tregの分化を促進し、SLEの病

態制御に寄与している可能性を示唆している。実際に、SLEモデルマウスMRL/lprにIL-27R $\alpha$ (WSX1)を過剰発現させると病態が改善し(Ann. Rheum. Dis. 67:1461-1467,2008)、WSX1を欠損したMRL/lprマウスは糸球体腎炎が増悪することが報告されている(J. Immunol. 175:7185-7192,2005)。一方でIL-27はTh1免疫応答を増強し、B細胞に対しては分裂と抗体産生を促進させる炎症性サイトカインとしての側面ももつ。さらにIL-27トランスジェニックマウスではIL-2の産生抑制によりFoxp3陽性制御性T細胞の分化が抑制され、全身性に炎症反応が惹起されることも報告されている(J. Immunol. 187:266-273,2011)。従って、IL-27そのものの投与による治療応用は難しいと考えられるが、IL-27により制御能を誘導したT細胞による細胞治療の可能性は期待される。本研究ではIL-27によるT細胞の制御活性誘導時の分子機構の詳細な解明を行い、自己免疫疾患の病態解明や新規治療法開発の礎となる知見を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

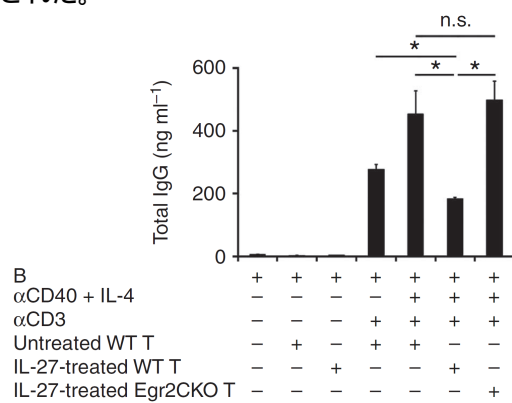
(1) IL-27により誘導されたEgr2高発現CD4陽性LAG3陽性T細胞の試験管内における、免疫抑制能を検討した。具体的にはC57BL/6マウス(以下B6マウス)よりB細胞を分離し、IL-27刺激下で培養したナイーブT細胞との共培養を行い、B細胞の分裂抑制能およびB細胞からの抗体産生抑制能を検討した。

(2) IL-27により誘導されたEgr2高発現CD4陽性LAG3陽性T細胞の生体内における免疫抑制能を検討した。B6マウスより分離したB細胞とヘルパーT細胞を移入したRAG1欠損マウス(以下RAG1 KOマウス)を免疫した際に抗体産生が誘導されるが、そこにサイトカイン刺激なしで培養されたCD4陽性T細胞ないしIL-27により誘導されたEgr2高発現CD4陽性LAG3陽性T細胞を各々養子移入することで、移入したT細胞による免疫抑制能を検証した。

## 4. 研究成果

(1) **IL-27誘導性Egr2高発現CD4陽性T細胞の抗体産生抑制活性のin vitro解析**: 先ず、B6マウスよりナイーブCD4陽性T細胞を分離し、T細胞受容体刺激下で、IL-27添加・非添加で培養した。その後、培養したCD4陽性T細胞と新たにB6マウスより分離したB細胞を、B細胞刺激下で共培養し、B細胞の抗体産生能および分裂能を指標に、T細胞による抑制能を評価した。その結果、IL-27刺激を受けたCD4陽性T細胞は、B細胞の抗体産生および分裂を有意に抑制することが明らかとなった。このことは、IL-27により抗体産生抑制能を持ったT細胞が誘導され

ることを示している。また、T 細胞特異的 Egr2 欠損(Egr2CKO)マウス由来の CD4 陽性 T 細胞を用いて同様の実験を行った結果、これらの T 細胞では抗体産生抑制能を認めなかった。更に、申請者は IL-27 により誘導される Egr2 の発現は STAT3 に依存しているという知見を得ていたことから、各種 STAT ノックアウトマウスを用いて LAG3<sup>+</sup> Treg がいずれの STAT 依存性に誘導されているのかを検討した。興味深いことに、LAG3<sup>+</sup> Treg の存在比は STAT3 ノックアウトマウスで顕著に低下していることが判明した。このことは、定常状態においても LAG3<sup>+</sup> Treg の誘導には STAT3 の関与が大きいことを意味している。以上のことより、IL-27 による STAT3 を介した Egr2 誘導系が、抗体産生抑制能を有する LAG3<sup>+</sup> Treg 分化に関与している可能性示唆された。

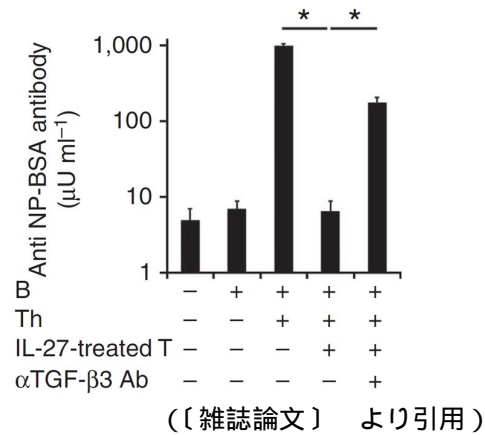


(〔雑誌論文〕より引用)

(2) **In vivo 実験系における IL-27 誘導性 Egr2 高発現 CD4 陽性 T 細胞の抗体産生抑制活性の解析**：RAG1 KO マウスに B6 マウス由来の B 細胞と OVA(ovalbumin)特異的 T 細胞受容体を持つ OT-II マウス由来 T 細胞を共移入し、そこに IL-27 刺激下ないし非刺激下で培養したナイーブ CD4 陽性 T 細胞を養子移入した。同マウスを OVA で免疫することにより特異抗体が産生されるが、IL-27 非刺激下で培養したナイーブ CD4 陽性 T 細胞を移入した場合にはこの抗体産生が抑制されないのに対し、IL-27 誘導性ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を移入したマウスでは、抗体産生が有意に抑制された。これらの検討により、IL-27 により誘導される Egr2 高発現 CD4 陽性 T 細胞が生体内においても強い抗体産生制御能を有することが明らかとなった。

(3) **IL-27 誘導性 Egr2 高発現 CD4 陽性 T 細胞の抗体産生抑制メカニズムの解明**：最近申請者らは LAG3<sup>+</sup> Treg が TGF-β3 産生を介して B 細胞の抗体産生を制御する知見を得ていたが、IL-27 誘導性ナイーブ CD4 陽性 T 細胞も LAG3<sup>+</sup> Treg 同様 TGF-β3 を産生することを、定量的 PCR 法と ELISA 法を用いて mRNA およびタンパクレベルで確認した。また、STAT3 ノックアウトマウス由来のナイーブ

CD4 陽性 T 細胞を用いた検討にて、IL-27 刺激による TGF-β3 産生が STAT3 依存性であることも明らかにした。更に、生体内の系で示した IL-27 誘導性ナイーブ CD4 陽性 T 細胞の抗体産生抑制能が TGF-β3 に依ることを、抗 TGF-β3 阻害抗体を用いて証明した。



(〔雑誌論文〕より引用)

本研究を通じて申請者は、IL-27 誘導性 Egr2 高発現 CD4 陽性 T 細胞が、試験管内および生体内において B 細胞抑制能をもつことを示した。さらに、その抑制機序が STAT3 依存性 TGF-β3 産生を介していることまで明らかにした。今後は TGF-β3 産生経路の詳細な分子メカニズムの解明を通じて、自己免疫疾患の新たな治療戦略へ繋がる研究に発展することが期待される。

#### 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 2 件)

Okamura T., Sumitomo S., Morita K., Iwasaki Y., Inoue M., Nakachi S., Komai T., Shoda H., Miyazaki J., Fujio K., Yamamoto K.: TGF-β3-expressing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAG3<sup>+</sup> regulatory T cells control humoral immune responses. *Nature Communications*, 6, 6329 (2015) doi: 10.1038/ncomms7329 (査読有)

Iwasaki Y., Fujio K., Okamura T., Yamamoto K.: Interleukin-27 in T cell immunity. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 2851 (2015) doi: 10.3390/ijms16022851 (査読有)

(学会発表)(計 4 件)

第 43 回日本免疫学会学術集会, 2014 年 12 月 11 日, 国立京都国際会館, “IL-27 induces regulatory T cells that suppress B cell responses” Y. Iwasaki, T. Okamura, K. Morita, M. Inoue, S. Sumitomo, K. Fujio, K. Yamamoto

第5回 EAGOR (East Asian Group of Rheumatology) meeting, 2013年5月31日, ソウル(大韓民国), “ Transcription factor Egr-2 mediates IL27-induced IL-10 production in CD4<sup>+</sup> T cells ” Y. Iwasaki, K. Fujio, T. Okamura, A. Yanai, S. Sumitomo, T. Tamura, H. Yoshida, K. Yamamoto

第57回日本リウマチ学会, 2013年4月19日, 国立京都国際会館, “Novel IL-10 induction pathway mediated by Egr-2 in IL-27-stimulated T cells” Y. Iwasaki, K. Fujio, T. Okamura, S. Sumitomo, H. Shoda, K. Yamamoto

第50回日本臨床分子医学会学術集会, 2013年4月12日, 東京国際フォーラム, “転写因子 Egr-2 を介する新規 IL-27 シグナル伝達経路は CD4 陽性 T 細胞からの IL-10 産生を制御する”, 岩崎由希子, 藤尾圭志, 岡村僚久, 柳井敦, 住友秀次, 庄田宏文, 田村智彦, 吉田裕樹, 山本一彦

〔図書〕(計 2件)

“ IL-10 産生制御性 T 細胞の治療応用にむけて ” 日本臨床免疫学会会誌 第 36 巻第 1 号 p40-46 (2013) 岩崎由希子, 藤尾圭志, 岡村僚久, 柳井敦, 山本一彦

“ IL-27 による免疫制御機構 ” 臨床免疫・アレルギー科 (科学評論社) 第 59 巻第 3 号 p275-282 (2013) 岩崎由希子

〔その他〕

受賞歴

平成 25 年度 第 5 回 EAGOR (East Asian Group of Rheumatology) meeting, Young Investigator Award 受賞

平成 25 年度 第 57 回日本リウマチ学会 国際ワークショップ賞受賞

研究室ホームページ

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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岩崎 由希子 ( IWASAKI. Yukiko )  
東京大学医学部附属病院アレルギーリウマチ内科・助教

研究者番号 : 30592935