

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 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：25860804

研究課題名(和文) ヒトLAG3陽性制御性T細胞の制御性活性と抗体産生抑制能の解析

研究課題名(英文) Analysis of regulatory activity of human LAG3+ regulatory T cells

研究代表者

住友 秀次 (Sumitomo, Shuji)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20392996

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)：我々はヒト新規制御性T細胞(Treg)LAG3+Tregを同定した。ヒトLAG3+Tregは、IL-10を高産生し、B細胞による抗体産生を抑制し、B細胞のアポトーシスを誘導し、ヒト化マウスにおける免疫反応を生体内で抑制した。ヒトLAG3+TregはIL-10産生制御性T細胞(Tr1)と考えられるが、ヒト二次リンパ組織におけるTr1が同定されたのは本研究が初めてである。我々は、ヒトLAG3+Tregが関節リウマチ患者の末梢血で健常人より少なく、加療により増加することも確認した。現在、ヒトPBMCにおけるLAG3+Tregが関節リウマチの加療によって増加する機序を明らかにしつつある。

研究成果の概要(英文)：We identified human new regulatory T cell subset LAG3+ Treg cells. They produced high amount of IL-10 and suppressed antibody production of B cells. They also induced b cell apoptosis and suppressed in vivo inflammatory reaction in humanized mice. Our research is the first report about the detection of IL-10 producing type 1 regulatory T cells (Tr1) in human secondary lymphoid tissue. We also found that patients with rheumatoid arthritis possessed fewer LAG3+ Treg cells than healthy control. We are now investigating the mechanism of the increase in LAG3+ Treg after treatment.

研究分野：免疫学

キーワード：制御性T細胞 自己免疫疾患 IL-10 LAG3 抗体産生抑制

1. 研究開始当初の背景

制御性T細胞 (regulatory T cells:Treg)は、細胞増殖や抗体産生を抑えることで適応免疫の反応を抑制する細胞集団を指す。Tregの作用機序には、表面分子や抑制性サイトカインIL-10やTGF- β 1を介してエフェクターT細胞の働きを強く阻害する報告(Nat Rev Immunol.2008;8:523)、また抗体産生B細胞の成熟を阻害するという報告も認められる(J Clin Invest.2004;4:1640)。CD4陽性CD25陽性Tregは、Tregの中で報告の多い細胞群で、転写因子Foxp3によって規定され、Foxp3遺伝子に異常を持つヒト(IPEX症候群)やマウス(Scurfyマウス)では、多臓器に自己免疫性の炎症性病変を認める(J Clin Invest.2003;112:1310)。本細胞集団の制御性活性には、特に抑制性表面分子CTLA-4が抗原提示細胞とレスポンドーT細胞の作用を阻害することが重要と考えられている(Science 2008;322:271)。

Tregには、CD4陽性CD25陽性Tregの他にも多様なサブセットが認められており、申請者らのグループはその一つとしてLAG3⁺Tregを報告した。LAG3は、CD4と相同性の高い表面分子で、T細胞には抑制性のシグナル伝達を示す(PNAS.1997;94:5744)。

研究代表者のグループは、新規Tregとして、CD4陽性CD25陰性CD45RB^{low}LAG3陽性T細胞(LAG3⁺Treg)を報告した。この細胞はマウス脾臓やパイエル板に存在し、IL-10を高産生し、IL-10を介してマウス腸炎モデルを抑制する(PNAS.2009;94:5744)。本細胞群は、アナジーとなったT細胞で高発現する転写因子Egr-2を特異的に発現しており、Egr-2がLAG3⁺Tregの表現型の規定に大きく寄与すると考えられる。また、研究代表者らのグループは、LAG3⁺Tregが自己抗体産生B細胞の抗体産生能の抑制にも強くかわることを発見し、解析を進めている。

2. 研究の目的

研究代表者は、マウスにおける知見を基にヒト扁桃や末梢血単核球中にLAG3⁺Tregを同定した。マウスLAG3⁺TregはIL-10を高産生し、B細胞の抗体産生を抑制することがわかっており、ヒトLAG3⁺Tregにも同様の機能があり、また自己免疫疾患患者では健常人と数・質的な差があることが推測される。

本研究では、健常ヒトLAG3⁺Tregの詳細な機能解析を行い、それを基に自己免疫疾患下での量的・質的修飾を評価し、治療戦略構築の基盤となる情報を明らかにすることを目的とした。

- 1) ヒトLAG3⁺Tregの遺伝子発現やサイトカイン産生のプロファイルの詳細な検討を行う。
- 2) ヒトLAG3⁺TregのT細胞に対する制御性活性を評価する。
- 3) ヒトLAG3⁺TregのB細胞に対する制御性活性について、試験管内で評価を行い、

そのメカニズムについて明らかにする。

- 4) ヒトLAG3⁺TregのB細胞に対する制御性活性について、ヒト化マウスを用いて生体内での反応を評価する。
- 5) 健常人と自己免疫疾患患者との間のヒトLAG3⁺Tregの量的・質的差異を、試験管内・生体内で比較検討する。生物学的製剤使用時のヒトLAG3⁺Tregの量的・質的变化も検討する。

3. 研究の方法

- 1) ヒトLAG3⁺Tregの解析
ヒトLAG3⁺Tregを扁桃・PBMCから分取し、遺伝子発現、サイトカインプロファイルをマイクロアレイと細胞上清ELISAを用いて検討する。
- 2) ヒトLAG3⁺TregのT細胞に対する制御性活性の評価
CFSEラベルしたナイーブT細胞との共培養実験を行い、分裂抑制能の有無について評価する。
- 3) ヒトLAG3⁺TregのB細胞抗体産生抑制についての解析
試験管内での濾胞性ヘルパーT細胞によるB細胞活性化の実験系にヒトLAG3⁺Tregを共培養し、培養上清のELISAを行って抗体産生能に対する影響を評価する。B細胞の分化および濾胞性ヘルパーT細胞の機能に対するヒトLAG3⁺Tregの影響も解析する。また、トランスウェルを用いた実験により、抗体産生抑制能の発揮に細胞間接触が必要かどうかを検討する。また、マウスでは抗体産生抑制にはPD-L1とFasが寄与しているという結果が得られており、抗PD-L1抗体・抗Fas阻害抗体を用いてPD-L1/PD-1系とFas/FasL系を阻害し、ヒトLAG3⁺Tregの抗体産生抑制作用への影響を解析する。
- 4) ヒト化マウスを用いたヒト細胞のin vivo解析
研究代表者は、免疫不全マウス；NOD/Shi-scid, IL-2R γ ^{null}マウス(NOGマウス)にヒトPBMCを移入してヒト化マウスを作製する実験系を伊藤らの報告に倣い確立した(Transplantation 2009;87.1654)。2.5Gyの放射線照射後のNOGマウスに5x10⁶のヒトPBMCを移入することで移植片対宿主病(GVHD)を発症させることができる。GVHDの評価はマウスの体重減少、生存期間、臓器への細胞浸潤により行う。このマウスにヒトLAG3⁺Tregを移入することで、GVHDを抑制することが可能かどうかを評価する。
- 5) 自己免疫疾患患者検体の解析
自己免疫疾患患者と健常者での末梢血中のLAG3⁺Tregの割合をフローサイトメーターで観察する。また関節リウマチにおける生物学的製剤使用時の

LAG3⁺Treg の変化を検討する。

4. 研究成果

研究代表者は、ヒト扁桃の解析から、LAG3⁺Treg がヒトでも存在することを明らかにした。またマイクロアレイ解析から、LAG3⁺Treg は扁桃中の新規細胞集団であることが示唆された。ヒト LAG3⁺Treg は、IL-10 を高産生し、濾胞性ヘルパーT 細胞による B 細胞活性化と抗体産生を試験管内で抑制し、B 細胞のアポトーシスを誘導していることが明らかとなった。T 細胞に対する制御性活性は明らかではなかった。また、本細胞群はヒト化マウスの移植対宿主病 (GVHD) を生体内で抑制した。

ヒト LAG3⁺Treg の作用機序においては、細胞接触因子が重要であることを明らかにし、阻害抗体の実験から、PD-1/PD-L1 系が重要であることが明らかとなった。これまでの実験結果から、LAG3⁺Treg は IL-10 産生制御性 T 細胞 (Tr1) と考えられるが、ヒト二次リンパ組織における Tr1 が同定されたのは本研究が初めてである。現在論文投稿中である。

続いて我々は、ヒト LAG3⁺Treg を末梢血単核球でも同定し、扁桃の LAG3⁺Treg と同様の Tr1 の性質をもつことを明らかにした。特に疾患活動性の高い関節リウマチ患者の PBMC でヒト LAG3⁺Treg が低く、加療により増加することが明らかとなり、LAG3⁺Treg は自己免疫疾患を抑制する細胞集団と考えられた。本研究の結果の一部は、マウスの結果と併せて Nature Communications に掲載された (Nat Commun. 2015;6:6329.)。現在、ヒト PBMC における LAG3⁺Treg が関節リウマチの加療によって増加する機序を明らかにしており、その結果について論文投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

- 1) 著者名 : Okamura T, Sumitomo S, Morita K, Iwasaki Y, Inoue M, Nakachi S, Komai T, Shoda H, Miyazaki Jun-ichi, Fujio K, Yamamoto K.
論文 標 題 : TGF- β 3-expressing CD4⁺CD25⁺LAG3⁺ regulatory T cells control humoral immune responses.
雑誌名 : Nature Communications
査読有、6 巻、2015 年、6329 ページ
DOI : 10.1038/ncomms7329.
- 2) 著者名 : 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.
論文 標 題 : Transcription factor early growth response 3 is associated with the TGF- β 1 expression and the

regulatory activity of CD4⁺positive T cells in vivo.

雑誌名 : Journal of Immunology
査読有、191 巻、2013 年、2351-2359 ページ

DOI : 10.4049/jimmunol.1202106.

- 3) 著者名 : Sumitomo S, Fujio K, Okamura T, Yamamoto K.
論文 標 題 : Egr2 and Egr3 are the unique regulators for systemic autoimmunity.
雑誌名 : JAKSTAT
査読無、2 巻、2013 年、e23952 ページ
DOI : 10.4161/jkst.23952.

〔学会発表〕(計7件)

- 1) 発表者名 : 仲地 真一郎、住友 秀次、土田 優美、加藤 里佳、土屋 遥香、永淵 泰雄、花田 徳大、駒井 俊彦、櫻井 恵一、庄田 宏文、岡村 僚久、藤尾 圭志、山本 一彦
発表 標 題 : A quantitative alteration of Human CD4⁺CD25⁺LAG3⁺Tregs in patients with Rheumatoid Arthritis
学会名 : 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 (京都府・京都市)
- 2) 発表者名 : 仲地 真一郎、住友 秀次、駒井 俊彦、山口 健介、花田 徳大、加藤 里佳、櫻井 恵一、土田 優美、永淵 泰雄、土屋 遥香、岡村 僚久、立石 晶子、神田 浩子、藤尾 圭志、山本 一彦
発表 標 題 : ヒト CD4⁺CD25⁺LAG3⁺制御性 T 細胞の機能と関節リウマチ患者における解析
学会名 : 第 42 回日本臨床免疫学会総会
発表年月日 : 2014 年 9 月 25 日
発表場所 : 京王プラザホテル (東京都・新宿区)
- 3) 発表者名 : 住友 秀次、仲地 真一郎、土田 優美、加藤 里佳、永淵 泰雄、駒井 俊彦、山口 健介、庄田 宏文、岡村 僚久、藤尾 圭志、山本 一彦
発表 標 題 : 関節リウマチ患者におけるヒト LAG3 陽性 T 細胞の解析
学会名 : 第 35 回日本炎症・再生医学会
発表年月日 : 2014 年 7 月 2 日
発表場所 : 万国津梁館 (沖縄県・名護市)
- 4) 発表者名 : 仲地 真一郎、住友 秀次、土田 優美、加藤 里佳、永淵 泰雄、山口 健介、駒井 俊彦、神田 浩子、立石 晶子、藤尾 圭志、山本 一彦
発表 標 題 : 関節リウマチ患者における CD4⁺CD25⁺LAG3⁺制御性 T 細胞の解析
学会名 : 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・港区)

- 5) 発表者名：住友 秀次、仲地 真一郎、藤尾 圭志、岡村 僚久、岩崎 由希子、石垣 和慶、森田 薫、庄田 宏文、澁谷 美穂子、山本 一彦
発表標題：The functional analysis of human CD4⁺CD25⁺LAG3⁺ T cells and their association with autoimmune diseases
学会名：第 42 回日本免疫学会学術集会
発表年月日：2013 年 12 月 11 日
発表場所：幕張メッセ(千葉県・千葉市)
- 6) 発表者名：住友 秀次、藤尾 圭志、岡村 僚久、庄田 宏文、澁谷 美穂子、岩崎 由希子、石垣 和慶、仲地 真一郎、桑原 里佳、山本 一彦
発表標題：ヒトにおける CD4⁺CD25⁺LAG3⁺T 細胞の機能解析と自己免疫疾患との関連について
学会名：第 34 回日本炎症・再生医学会
発表年月日：2013 年 7 月 3 日
発表場所：国立京都国際会館(京都府・京都市)
- 7) 発表者名：住友 秀次、藤尾 圭志、岡村 僚久、庄田 宏文、山口 優美、澁谷 美穂子、岩崎 由希子、岡本 明子、山本 一彦
発表標題：ヒトにおける CD4⁺CD25⁺LAG3⁺ T 細胞の機能解析と自己免疫疾患との関連について
学会名：第 57 回日本リウマチ学会学術集会
発表年月日：2013 年 4 月 18 日
発表場所：国立京都国際会館(京都府・京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

氏名：住友 秀次 (Sumitomo Shuji)

所属研究機関名：東京大学

部局：医学部附属病院

職名：助教

研究者番号：20392996