

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06374

研究課題名(和文) T細胞受容体の量的制御による抗体産生反応調節機構の解明と自己免疫疾患治療への応用

研究課題名(英文) The effect of quantitative T-cell receptor down-modulation in antibody responses and its application for autoimmune diseases

研究代表者

水井 理之 (Mizui, Masayuki)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30423106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：量的TCR数を調節する方法として、抗CD3F(ab')₂抗体をマウスに投与したところ、一時的にTCRの蛍光強度が約20%程度減弱することが確認された。抗体投与下でNP-CGGで抗体産生反応を惹起したところ、胚中心B細胞数の有意な減少を認めしたが、濾胞性ヘルパーT細胞(Tfh)数には、有意な減少が認められなかった。また、抗体投与によってCD69陽性細胞の割合もやや増加していたが、同時に制御性T細胞(Treg)数の著明な増加が認められることを見出した。抗体産生反応の減少が、直接Tfh抑制に働いたのか、Treg増強作用を介したものであるのかに関し、現在も検討を進めているところである。

研究成果の概要(英文)：For quantitative down-modulation of T-cell receptor, we used anti-CD3 F(ab')₂ antibody. In vivo injection of the antibody resulted in the temporal reduction of TCR intensity (around 20% vs controls) by flow cytometric analysis. When wild-type mice were immunized with NP-CGG, formation of germinal center B cells were significantly reduced, however, follicular helper T cell number were comparable in antibody-treated group. Notably, we found that the number of regulatory T cells (Tregs) were significantly increased by F(ab')₂ antibody treatment. To address whether the reduction of antibody responses is due to direct inhibition of Tfh induction or through the induction of Treg, we will use Treg depletion models and/or Treg transfer models using Foxp3-DTR mice and/or Foxp3-GFP mice.

研究分野：免疫学、腎臓病学

キーワード：全身性エリテマトーデス 自己免疫疾患 T細胞受容体 制御性T細胞 抗CD3抗体

1. 研究開始当初の背景

(1)ヒトの代表的な自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス(SLE)は、その発症や進展に遺伝的素因のみならず性差・環境素因・遺伝子のエピジェネティックな変化など、様々な要因が複合的に絡み合っている。疾患の主体となっている自己抗体の産生はB細胞で行われるが、その成熟を制御するのはT細胞であり、申請者らはこれまでにT細胞の機能変容が疾患進展に重要な役割を果たしていることを報告してきた。

(2)SLEのT細胞では、T細胞受容体(TCR)コンポーネントのひとつであるCD3ζ(CD247)の発現が低下し、Fc受容体鎖発現上昇していることがわかっている。これをマウスで検討するためにCD247ノックアウトマウスをSLEモデルマウスと交配、作成していたが、その過程でCD247(+/-)ループスマウスにおいて、自己抗体産生低下、腎病変の軽減が認められることがわかった。

2. 研究の目的

(1)CD247(+/-)マウスにおいて、末梢のT細胞、B細胞、マクロファージ等の免疫細胞数、分化には影響がないことから、CD247(+/-)マウスの臓器障害の軽減は、自己抗体産生低下によるものと考えられた。このマウスではTCRの発現が約30%減弱していることがわかった。このため、TCRの量的な減少が自己免疫疾患軽減に関連しているとの仮説を立て、さらなる検討を加えることにした。

(2)T細胞の活性化および分化は、TCRと抗原複合体の親和性の強さによって決定づけられると考えられている。しかし、今回の検討で、TCRの親和性(質的制御)だけではなく、量的制御によって免疫反応を制御することが、結果として自己免疫反応を減弱しうる可能性を想定している。TCR発現量を減少させることによる免疫反応の変化を詳細に検討し、自己免疫疾患治療戦略を見出す。

3. 研究の方法

1. Anti-CD3 F(ab')₂抗体を用いた検討
通常anti-CD3抗体はFc portionがマクロファージや樹状細胞等に認識されることで強いクロスリンク効果をT細胞に誘導し活性化を引き起こすが、それだけではなくCD3抗体が結合したT細胞が抗原と認識され貪食・除去されてしまう。F(ab')₂はFc部分を除去することで、こういった抗体依存的な反応をなくし、TCRに弱いクロスリンクを引き起こし細胞内にinternalizeさせることが可能である。

Anti-CD3 F(ab')₂抗体をマウスに投与した結果、TCR発現量は20%程度減少し、またわずかなクロスリンク効果はあるが、明らかな活性化を認めないことを確認している。さらに抗体投与後のT

細胞の機能を詳細にチェックするために、抗体100 microgを2回投与したマウスをnitrophenyl基修飾 chicken gamma globulin (NP-CGG)で免疫し、脾臓・リンパ節よりT細胞を単離し、in vitroにて再刺激を行い、IFN-g, IL-4, IL-10などのサイトカイン産生能を検討する。また、濾胞性ヘルパーT細胞(Tfh)や胚中心B細胞(GCB)の分化が減少していることを確認しているが、経時的変化についても検討を行う。

2. ループスマウスにおける抗体投与の効果

C57BL/6バックグラウンドのFas遺伝子変異マウス(B6/lpr)マウスは、約15週~20週齢において多量の自己抗体を産生し、末梢臓器に炎症が認められることが知られている。このマウスに、自己抗体産生前の10週齢よりanti-CD3 F(ab')₂抗体を50microg/日で週2回、腹腔内投与を2ヶ月間行う。その後血液、脾臓、腎、肺を単離し、TfhやGCBなどのリンパ球分画、自己抗体産生量、臓器障害の程度を検討する。また、MRL/MpJバックグラウンドでFas変異のあるMRL/lprマウスは、より発症が早く重篤であるが、このマウスには8週齢から同様に抗体を投与し、検討を行う。その他、Fas変異によらずループスを発症するNZB/WマウスやFcγRIIbマウスにもそれぞれ適切な週齢から抗体を投与し、効果を検討する。

4. 研究成果

(1)Anti-CD3 F(ab')₂抗体投与におけるTCR量の経時的検討

実際に抗体投与によってどの程度TCRが減弱し、その効果が持続するかを検討した。抗体100 microgをマウスにDay 0, day 2で腹腔内投与を行い、以降1週間まで経過を観察した。その結果、抗体投与翌日にCD4+T細胞において約30%程度の減少を認めたが、4日後、7日後にはその効果は15%程度にとどまっていたが、持続していた。このことから、週2回の投与によって、持続的なTCRの減少効果が得られることがわかった。これに対して、CD8+T細胞については、CD4+T細胞ほどのTCR減少効果を認めなかった(図1)。

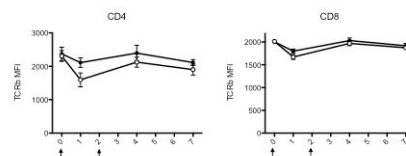
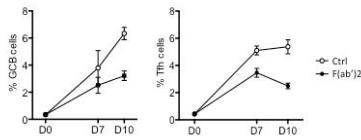


図1. Anti-CD3 F(ab')₂抗体投与によるTCR発現量の経時的変化

(2)抗体投与による免疫細胞反応の動態

先行実験から、Anti-CD3 F(ab')₂抗体投与によって、Tfh、GCBともに有意な減少を認めたが、これらの細胞は時間的変動が大きいことから、経時的に変化を追ったところ、免



疫 1 週間後、10 日後ともに、Tfh、GCB 数の

図 2. GCB, Tfh の変動

一貫した低下が認められた(図 2)。このことは、TCR の発現量を低下させることによって抗体産生反応制御が可能であることを示唆するものであった。

(3) マウスループモデルに対する抗体投与の効果

F(ab)2 が自己免疫疾患発症や進展を抑制しうるかどうかを確認するために、Fas 遺伝子に変異をもち、早期に激しい自己免疫疾患を発症する MRL/lpr マウスに 3 週間 F(ab)2 の投与を試みた。その結果、3 週間後の自己抗体価に有意な変化は認められなかった。ところが、CD4+Foxp3+CD25+ Treg 細胞数が F(ab)2 投与群で著明に上昇

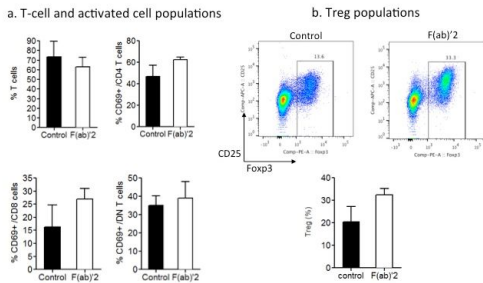


図 3. マウスループモデルに対する抗体投与

していることが確認された(図 3)。同時に F(ab)2 投与により CD69 陽性 T 細胞もやや増加しており、このことから F(ab)2 には少なからず T 細胞活性化作用があることも確認した。ただし、F(ab)2 は通常のマウスに投与しても T 細胞集団に変化を来たさないため、抗原刺激時、あるいは自己免疫反応賦活時等の免疫細胞活性が上昇している際に投与すると効果を発揮する可能性がある。ところで、Treg は T 細胞活性化制御に重要な役割を果たしており、自己免疫と関連の深い IL-17 産生 T 細胞や Tfh の分化も負に制御することがわかっている。一方、これまでに F(ab)2 を用いた報告では、経口投与により免疫寛容を誘導できる、あるいは高脂肪食による肥満・インスリン抵抗性誘発モデルにおいて F(ab)2 を腹腔内投与することで、インスリン抵抗性が改善されることが報告されている。免疫寛容誘導メカニズムとしては CD4+LAG3+ 抑制性 T 細胞の関与や、インスリン抵抗性改善は内臓脂肪における抑制性 M2 マクロファージ誘導の可能性がそれぞれ示唆されている。

ヒトにおいては、In vitro で F(ab)2 存在下で T 細胞を培養した際に Treg が誘導されるとの報告もある。しかしながら、いかにして Treg の誘導または増殖に関わるのか、あるいはその他の制御メカニズムが関与しているのか、どの反応が dominant であるのか等、詳細なメカニズムについては未だ明らかではない。F(ab)2 による抗体産生抑制効果が、Treg 増強によるものか、あるいは TCR 発現低下によるものかを含め、現在も検討を継続している。

ヒト化抗 CD3 抗体は、現在腎移植前処置で用いられているが、マウス IgG2a に由来する Fc 部分を持っており、生体投与後は T 細胞に対してオプソニン効果が発揮され、T 細胞が除去されることで効果を発揮する。断片化抗 CD3-F(ab)2 抗体にはこのような作用はないため、F(ab)2 によって惹起される抗体産生反応抑制および抑制性メカニズムの詳細を明らかにし、自己免疫疾患において有用性を証明することができれば、リンパ球を除去することなく免疫反応制御可能な生物学的製剤として、早期に臨床応用できる可能性がある。それは、従来のステロイドや免疫抑制剤の長期投与による様々な副作用からの離脱につながり、画期的な前進となりうる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(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：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/kid/kid/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水井 理之 (MIZUI, Masayuki)

大阪大学大学院医学系研究科 腎臓内科学・助教

研究者番号：30423106

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()