

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 3 日現在

機関番号：94416

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08530

研究課題名(和文) 免疫制御機構についての理論・実験の融合的研究

研究課題名(英文) Theoretical and experimental analyses to reveal the mechanisms of immune regulation

研究代表者

山口 智之 (Yamaguchi, Tomoyuki)

医療法人徳洲会野崎徳洲会病院(附属研究所)・研究所・主任研究員

研究者番号：80402791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：自己抗原に応答性する制御性T細胞が安定的に免疫寛容を維持するためには、免疫応答のどの過程を制御することが重要であるかを、T細胞免疫応答のシミュレーションと数理モデルの計算から明らかにした。その結果、制御性T細胞が単に周囲のT細胞の分裂確率を低下させるだけでは、安定な免疫寛容維持には不十分であることが分かった。T細胞と抗原提示細胞の相互作用を増強させることが、免疫寛容を安定に維持するためにも必須であった。更に、この理論予測に基づいて、免疫応答を増強することが可能であることを、糖尿病モデルマウスや同種抗原に対するT細胞増殖応答測定により示した。免疫制御の機構における地形的見取り図モデルを提唱する。

研究成果の概要(英文)：Self-reactive regulatory T cells are essential to maintain the immune tolerance. In this study, I searched which processes in immune response should be controlled by regulatory T cells using simulations and mathematical modeling of T cell immune response. The results indicate that simple reduction of proliferation probability of T cells by regulatory T cells is not sufficient for the robust tolerance. Augmentation of interaction between T cells and antigen-presenting cells is essential to stabilize the tolerance. Further, the theoretical prediction provides novel perturbations to enhance immune responses in autoimmune diabetes mice model and in allogeneic T cell response. Thus, I propose a potential landscape model in immune regulation that stable tolerance proceeds to immune response or proliferation of specific T cells through transient fluctuating states by controlling the total amount of interaction between antigen-presenting cells and T cells.

研究分野：免疫学

キーワード：制御性T細胞 数理モデル 不安定性 ゆらぎ 免疫チェックポイント

## 1. 研究開始当初の背景

免疫系は、病原微生物の感染から守るために体が備えている仕組みである。感染時には、病原体に特異的に応答できるリンパ球 (T 細胞や B 細胞) が急速に増殖し、病原体を抗原として認識し、駆逐する。免疫応答と呼ばれる状態である。様々な病原体に応答できるように、リンパ球は、T 細胞受容体 (TCR) や抗体のゲノムに組換えと点変異を加えることで、高度の多様性を獲得している。

一方で、この多様なリンパ球の発生過程で、自己の体や花粉・食物に応答できる細胞も生じてしまう。これらの本来攻撃すべきではない抗原に対する応答は、制御性 T 細胞と呼ばれるリンパ球によって抑制されている。免疫寛容と呼ばれる状態である。制御性 T 細胞による免疫抑制で重要な分子は、我々の研究成果を含め、これまでに数多く報告されている。その一部は免疫チェックポイント阻害剤として、癌治療の分野で特に注目されている。

このように、免疫系は応答と寛容という異なる二つの状態をとる。免疫応答の局面では、状況 (感染病原体の種類など) に応じて適した細胞が選択的に急速に増殖することが重要である。免疫寛容の局面では、一生涯に渡って暴露される抗原に対して応答せず、リンパ球の多様性を維持する必要がある。このような二状態が如何にして制御されているかを明らかにすることが、本研究の目的である。これまでの分子生物学的研究手法では、免疫応答を弱める・強める分子を明らかにすることには成功している。しかし、必要な応答は弱めず、自己に対する免疫寛容は維持できる仕組みこそより重要であり、この制御機構については不明であった。

発生分化の研究分野では、多様な細胞に分化できる多能性幹細胞の状態から、特定の系統へと分化した状態への推移が、いかに制御されているかは重要な課題である。この分化の過程で、変動 (ゆらぎ) の大きい不安定状態をとることの重要性が提唱されていた (Furusawa, C. & Kaneko, K. "A Dynamical-Systems View of Stem Cell Biology" *Science*, 2012)。免疫学の分野では、このような状態のゆらぎは注目されておらず、制御機構の全体像を理解するための研究自体が盛んではなかった。本研究は、異分野での理論研究と免疫学研究を融合させる挑戦的研究として位置づけられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、免疫応答の制御機構の全体像を明らかにする。この研究は次の 3 つの目標を持つ。

制御性 T 細胞による T 細胞免疫応答の制御機構を明らかにする。

新しい免疫チェックポイント阻害剤となりうる、免疫応答の介入方法を提示する。免疫制御と発生分化制御に共通する生物システムを特徴づける制御機構を数式の

形で提示する。

## 3. 研究の方法

T 細胞免疫応答をシミュレーションするモデルを作成する。多様な T 細胞が抗原提示細胞と相互作用し、抗原刺激を受けることで増殖する。この一連の過程が、抗原提示細胞と相互作用する制御 T 細胞が多い場合には阻害されると想定する。抗原との応答性の高い制御性 T 細胞が多い“自己”の場合に、T 細胞の増殖がおきないためには、制御性 T 細胞がどの過程を阻害することが重要かを明らかにする。

T 細胞と抗原提示細胞の相互作用の変化及び特定の抗原応答性を持つ T 細胞の数の変化について、数式で表現することを行う。式計算を基に、ある T 細胞が増加するための抗原応答性の閾値がどのパラメータで決定されるかを明らかにする。

理論計算の予測が正しいかを、実際の免疫応答で検証する。理論が予測する重要なパラメータに介入することで、実際の免疫応答を操作可能であるかを検証する。マウス T 細胞を刺激培養する増殖応答試験で、制御性 T 細胞の有無の影響を検証する。自己免疫性 I 型糖尿病になりやすいマウスである NOD マウスを用いて、理論予測に基づく免疫介入方法が、糖尿病発症率に影響を与えるかを検証する。

## 4. 研究成果

### 制御性 T 細胞による免疫抑制モデル 1

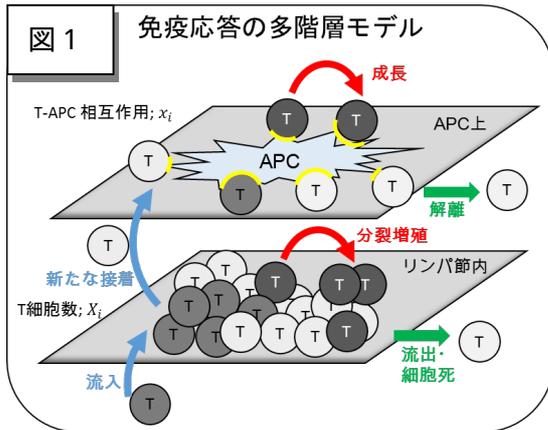
制御性 T 細胞による T 細胞免疫抑制の過程について、単純化したシミュレーションモデルを作成した。制御性 T 細胞が抗原提示細胞上に多い場合は、T 細胞の分裂確率を低下させるとの仮定の下で、抗原提示細胞との結合力の強い制御性 T 細胞が多い場合に、免疫寛容を維持するためには、何が重要かを検討した。免疫応答の場合全体に影響する因子 (具体的にはサイトカインなど) の重要性を示し、雑誌論文として発表した。

ただし、この理論研究では、「制御性 T 細胞は、T 細胞分裂確率を低下させる抑制機構を持つ」ことを仮定として設定したために、新規な抑制性機構を理論から提案することはできなかった。安定な免疫寛容と迅速な免疫応答を両立には、どのような制御機構が理論上理想的かを明らかにすることを次の研究目的とした。そのために、抗原応答性の高い T 細胞が増殖する過程で関与するパラメータを同定することをまず行い、その各パラメータのうちで、制御性 T 細胞が制御すべきパラメータを明らかにすることを試みた。

### 制御性 T 細胞による免疫抑制モデル 2

抗原特異的 T 細胞が抗原提示を受けて増殖する過程を単純化し、シミュレーションモデルを作成した。図 1 に示す通り、抗原提示細胞 (APC) と T 細胞の相互作用は、リンパ節

内のT細胞プールからの新たな接着と、結合力に応じた相互作用の成長と、解離による相互作用の減少によって変化すると考える(図1上段)。あるリンパ節内のT細胞の数は、全免疫システムからの流入と、分裂増殖による増加と、流出や細胞死による減少によって変化すると考える(図1下段)。この際の分裂増殖は、T細胞と抗原提示細胞の相互作用およびその間の結合力に比例すると仮定する。



抗原提示細胞上に、制御性T細胞が多い場合には、分裂増殖確率が減少すると仮定した場合、抗原提示細胞との結合力の高いT細胞が増殖するためには、相互作用の成長確率が高いこと、解離確率が高いこと、新たな接着の確率が低いことが、重要であった。この三つの過程を、それぞれ、成長、解離、新たな接着のパラメータと呼ぶ。

次に、抗原提示細胞との結合力の強い制御性T細胞(自己反応性制御性T細胞)が存在する場合に、T細胞増殖応答が抑制できるかを検討した。制御性T細胞の作用を分裂増殖確率の低下に限定した場合には、T細胞増殖を抑制することは困難であった。一方で、抗原提示細胞上に制御性T細胞が多い場合に、分裂増殖確率の低下に加えて、抗原提示細胞からのT細胞の解離確率の低下することを仮定した場合に、自己反応性制御性T細胞による免疫不応答を維持することができた。制御性T細胞の働きとして、抗原提示細胞への新たな接着確率の増加をさらに仮定した場合には、より安定な不応答性を維持できた。不応答性を実現できた状態では、多種類のT細胞が抗原提示細胞と相互作用していた。

### 免疫応答の数式モデル

図1で示したT細胞と一つの抗原提示細胞との相互作用は下記の数式で表現できる。ただし、制御性T細胞の抑制作用や確率的ノイズは、数式の中には組み入れない。

$$\frac{dx_i}{dt} = \alpha \varepsilon_i \frac{x_i}{\sum_j x_j} - \beta x_i + \gamma \mu_i \frac{X_i}{\sum_j X_j}$$

ここで、 $x_i$ はある特定のT細胞受容体を持つT細胞集団と抗原提示細胞の相互作用量を表

す。右辺第一項は、結合力( $\varepsilon_i$ )に依存した相互作用の成長による増加を表す。第二項は、解離による相互作用の減少を表す。第三項は、リンパ節のT細胞プールの中からの新たな接着を表し、 $X_i$ はリンパ節内のこのT細胞集団の数を表す。

$\alpha/\gamma$ が極端に高い場合、つまり新たな接着に比べて成長が速い場合には、存在する中で最も結合力( $\varepsilon_i$ )の高いT細胞が、抗原提示細胞上を独占する。このような状況は、病原体に対する免疫応答として、いくつかの点で望ましい特徴を備えている。第一に、リンパ節内での存在比率が少ない稀なT細胞であっても、抗原提示細胞を独占することで、急速に増殖できる。第二に、独占することで選択的に増殖することができる。抗原提示細胞が自己抗原をも提示し、少量の自己抗原と弱く結合するT細胞が存在したとしても、病原体抗原と強く結合するT細胞により弾かれ、増殖が抑制される。多数存在する結合力の中程度の細胞の増殖も抑えることができる。第三に、応答できるT細胞が皆無という最悪の事態を回避できる。病原体は変異により抗原性を変化させるし、未知の病原体が侵入することもありうる。このような予測できない抗原に対して、弱い結合力を持つT細胞しか存在しない場合でも、存在する中で最も結合力の高い細胞(比較的ましな細胞)が抗原提示細胞を独占するため、ほぼ必ず細胞の増殖応答が誘導できる。

一方で自己免疫寛容を維持することは困難である。 $\alpha/\gamma$ が高い場合は、稀な自己反応性T細胞の増殖を抑制できない。自己反応性制御性T細胞が増えすぎること、前記シミュレーションで確認された。 $\alpha/\gamma$ が低い場合は、自己反応性T細胞の増殖は抑制しやすい。シミュレーション結果でも、新たな接着の確率を上げることは、制御性T細胞による寛容維持に一定の役割を担っている。ただし、 $\alpha/\gamma$ が極端に低い場合には、抗原提示細胞上のT細胞の比率は、結合力( $\varepsilon_i$ )の影響を受けず、リンパ節内でのT細胞数( $X_i$ )の比率に近くなる。その結果、自己反応性の制御性T細胞が、その高い結合力を利用して抗原提示細胞と相互作用を続けることができない。

抗原提示細胞からの解離を反映するパラメータである $\beta$ が低い場合、抗原提示細胞とT細胞の相互作用の総量( $\sum_j x_j$ )が増加する。その結果、抗原提示細胞上を特定のT細胞が占める割合( $x_i / \sum_j x_j$ )の変化速度が遅くなる。その結果、自己反応性T細胞の選択的増殖は起きにくい。一方で、 $\beta$ の大小は平衡状態における特異的T細胞の比率に影響を与えない。つまり、自己抗原を提示する抗原提示細胞には、自己反応性制御性T細胞が多く相互作用している状態を保つことができる。シミュレーションにおいて、制御性T細胞の働きとして、抗原提示細胞からの解離確率の低下を仮定することが重要であった理由を説明できる。

### 免疫応答の操作

理論研究の結果は、制御性 T 細胞の有する新規作用として、抗原提示細胞と T 細胞の解離確率を減少させ、抗原提示細胞と T 細胞の相互作用の総量を増加させることを示唆した。実際の免疫応答で確認するために、制御性 T 細胞存在下で、T 細胞と抗原提示樹状細胞を共培養し、相互作用の状態を顕微鏡下で観測した。樹状細胞周囲に集まっている総細胞数は、制御性 T 細胞存在下では 2 倍程度増加していた。その機序として、制御性 T 細胞と共培養した抗原提示樹状細胞は、生存数が増加し、接着因子である LFA-1 及び ICAM-1 を高発現することが確認された。

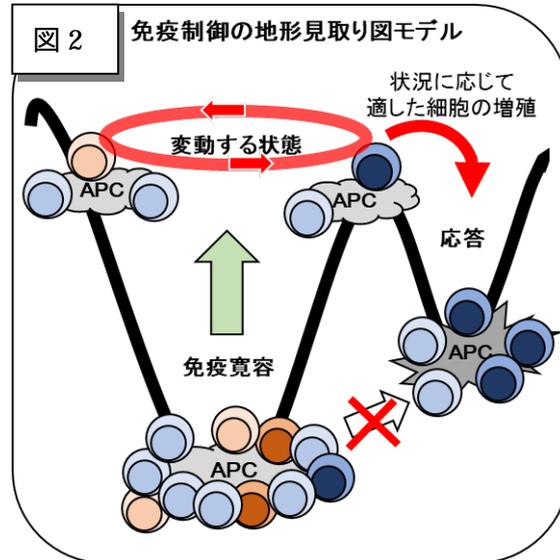
理論解析は、T 細胞の総数が多いことが、安定な免疫寛容維持に重要であることを示している。T 細胞の総数を減らすことで、免疫寛容に錯乱を与えることができるかをマウス個体レベルの実験で確かめた。Thy1 抗体を投与することで、T 細胞数を減らすことができる。T 細胞数を減らしたマウスでは、抗原刺激後の抗原特異的 T 細胞の割合が増加し、活性化 T 細胞の割合も増えていた。自己免疫性 1 型糖尿病を発症しやすい NOD マウスに、生後 4 週齢時に、T 細胞数を減らす処置をすると、対照群に比べて、早期より重度な糖尿病を発症した。以上の結果は、T 細胞数の減少が、特異的 T 細胞の選択的増加を促進することを示している。

### 免疫制御の地形的見取り図モデル

理論研究と実験検証を踏まえ、免疫制御の新しい機構を提唱する。

病原微生物の感染がなく、自己抗原が提示されている場合、自己反応性制御性 T 細胞が抗原提示細胞と相互作用しやすい。制御性 T 細胞が多く接着している場合、抗原提示細胞は、死なず、接着因子の発現を高めることで、T 細胞が離れにくくなる。その結果、多数の T 細胞が抗原提示細胞と相互作用している状態が長く続く。この状態では、特定の T 細胞が増加することがなく、安定な免疫寛容が維持される。

病原微生物の感染がおき、提示される抗原が自己抗原から外来抗原に急変した場合、自己反応性制御性 T 細胞が抗原提示細胞から離れる。抗原提示細胞からの T 細胞の解離が進むことで、少数の T 細胞が抗原提示細胞と相互作用する状態となる。この状態では、新たな T 細胞が接着する度に、相互作用する T 細胞の種類及び比率が変化する不安定な状態となる。偶然、病原体抗原との結合力が高い T 細胞が接着し、制御性 T 細胞が接着しない場合、結合力の高い T 細胞が選択的に増加する免疫応答の状態へと変化する。



この制御機構においては、免疫応答が惹起されるか否かを決定する最も重要な過程は、T 細胞が抗原提示細胞から離れる時点にある。少数の T 細胞が抗原提示細胞と相互作用する不安定状態さえ誘導できれば、偶然(ゆらぎ)を利用することで、多数の T 細胞プールの中から、状況に応じて最適な細胞が選択的に増加する。不安定以降の過程は、多様な T 細胞を準備してさえいれば、自動的におきる。従来の免疫学研究では、Th1 分化には IL-12、Th2 分化には IL-4 が重要であることが示され、T 細胞は更に細分類することで、この不安定化以降の分子機構が研究され続けている。一方で、これら多様な分化に共通する過程として、少数の T 細胞が抗原提示細胞と相互作用する状態がある。この過程こそ、真の免疫チェックポイントであると言える。制御性 T 細胞は、この共通して重要な“抗原提示細胞周囲の T 細胞数”を制御している。

### 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 4 件)

- Sasaki, N., T. Yamashita, K. Kasahara, A. Fukunaga, T. Yamaguchi, T. Emoto, K. Yodoi, T. Matsumoto, K. Nakajima, T. Kita, M. Takeda, T. Mizoguchi, T. Hayashi, Y. Sasaki, M. Hatakeyama, K. Taguchi, K. Washio, S. Sakaguchi, B. Malissen, C. Nishigori, and K.I. Hirata, *UVB Exposure Prevents Atherosclerosis by Regulating Immunoinflammatory Responses*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017. **37**(1): p. 66-74.

Matsumoto, T., N. Sasaki, T. Yamashita, T. Emoto, K. Kasahara, T. Mizoguchi, T. Hayashi, K. Yodoi, N. Kitano, T. Saito, T. Yamaguchi, and K. Hirata, *Overexpression of Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen-4 Prevents Atherosclerosis in Mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016. **36**(6): p. 1141-51.

Furusawa, C. and T. Yamaguchi, *Robust and Accurate Discrimination of Self/Non-Self Antigen Presentations by Regulatory T Cell Suppression*. *PLoS One*, 2016. **11**(9): p. e0163134. DOI 10.1371/journal.pone.0163134 オープンアクセス

Ichimura, T., L.D. Chiu, K. Fujita, H. Machiyama, T. Yamaguchi, T.M. Watanabe, and H. Fujita, *Non-label immune cell state prediction using Raman spectroscopy*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 37562.

〔学会発表〕(計 4 件)

Tomoyuki YAMAGUCHI, Hiroaki MACHIYAMA, Hideaki FUJITA、Control of immune response based on a theoretical model of T cell proliferation 第45回日本免疫学会学術集会 2016年12月

Tomoyuki Yamaguchi, Takahashi R., A simulation model of immune response predicts essential functions of Treg to maintain immune tolerance. 第46回日本免疫学会学術集会 2017年12月

山口 智之、制御性T細胞による免疫調節機構の数理モデルとシミュレーション;第2回理論免疫学ワークショップ(招待講演) 2018年2月

山口 智之、免疫応答の理論モデルが示す制御性T細胞の免疫調節機構;第4回病因研究会別府シンポジウム(招待講演) 2018年3月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等  
<https://nozaki.tokushukai.or.jp/rint/investigation/inv07.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 智之 (Tomoyuki Yamaguchi)

医療法人徳洲会 野崎徳洲会病院

附属研究所

免疫システム研究部

主任研究員

研究者番号：80402791

(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

( )