

平成30年5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15510

研究課題名(和文) 抑制性サイトカインを産生する新規制御性T細胞の解析による自己免疫制御機構の解明

研究課題名(英文) Inhibitory cytokine-producing Treg-mediated control of autoimmunity

研究代表者

藤尾 圭志 (Fujio, Keishi)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：70401114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では制御性T細胞が産生する抑制性サイトカインTGF- β による液性免疫制御機構を解明し、新たな自己免疫疾患治療戦略の確立することを目指した。本研究により、TLRシグナルを介したB細胞活性化制御には、TGF- β およびIL-10の協調的作用が必須であるという知見を得た。さらに、TGF- β /IL-10による抑制はB細胞におけるミトコンドリア機能制御を介していることを明らかにした。これらの検討により、Tregを介した液性免疫抑制機構におけるB細胞エネルギー代謝制御の重要性が示された。これらの成果は、自己抗体産生を介した自己免疫性疾患の新規免疫抑制療法開発の一助となると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project was to elucidate the role of inhibitory cytokine in regulatory T cell (Treg)-mediated control of autoimmunity. Although inhibitory cytokines, such as transforming growth factor- β (TGF- β) and interleukin-10 (IL-10) play major roles in maintaining immune homeostasis, therapeutic application of inhibitory cytokines remains limited due to their pleiotropic and context-dependent effects. In this study, we revealed that a combination of TGF- β and IL-10, but not single cytokine, is required to suppress B cell activation induced by toll-like receptor (TLR) stimulation both in vitro and in vivo. The combination of these two inhibitory cytokines synergistically suppressed cellular energetics of both glycolysis and oxidative phosphorylation in B cells. By exploiting the cytokine synergy-mediated immune suppression, they may provide a new therapeutic method in autoantibody-mediated autoimmune diseases.

研究分野：医歯薬学

キーワード：制御性T細胞 TGF- β LAG3

1. 研究開始当初の背景

自己免疫性疾患では、様々な臓器に免疫細胞による炎症を認める。全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) では腎臓、中枢神経など、関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) では関節が標的となる。これらの疾患の共通点は自己抗体の出現であり、SLE では抗 2 本鎖 DNA 抗体、RA では抗 シトルリン 化 蛋白 抗体 (anti-citrullinated protein antibody: ACPA) などが出現し、その病態形成に影響を与えると考えられている。

申請者らは、B 細胞の抗体産生を抑制するユニークな機能を持つ制御性 T 細胞 (regulatory T cells; Treg) サブセットである、lymphocyte activation gene-3 (LAG3) 陽性の Treg (LAG3 Treg) を同定し報告している (Okamura, T et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 106:13974, 2009)。LAG3 Treg は転写因子 early growth response gene 2 (Egr2) を発現するのが特徴で、抑制性サイトカイン IL-10 を高産生する。EGR2 遺伝子はヒト SLE の疾患感受性遺伝子でもある。さらに LAG3 Treg は transforming growth factor (TGF)- β ファミリー分子の一つである TGF- β 3 を産生することにより、ループモデルマウス MRL/lpr マウスの病態を改善し、能動免疫後の抗体産生を抑制する (Okamura et al. *Nat Commun* 6:6329, 2015)。また、ヒト末梢血においても CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞が存在し、刺激時に EGR2, IL-10, TGF- β 3 を発現し抗体産生を抑制する。

自己抗体は標的臓器に沈着して補体系の活性化、好中球遊走、免疫複合体形成を誘導し、炎症形成に寄与すると考えられており、液性免疫を強力に制御する LAG3 Treg が産生する TGF- β 3 による抗体産生制御メカニズムの解明は、液性免疫異常を基盤とする病態に特異的な治療法の開発に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

自己抗体は自己免疫疾患の病態形成において極めて重要だが、その生理的な制御機構は不明である。現行のステロイド・免疫抑制剤などの非特異的な免疫抑制法は日和見感染症などの重篤な副作用の問題を伴うことより、自己抗体制御メカニズムの解明が強く求められている。

申請者らは上述の如く、免疫応答を抑制する制御性 T 細胞サブセットとして、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞 (LAG3 Treg) を同定し、このサブセットがこれまで免疫系では注目されてこなかった TGF- β ファミリー分子である TGF- β 3 を産生することで B 細胞機能を抑制することを

明らかとした。

本研究ではヒト・マウス B 細胞に対する TGF- β 3 の作用機構を解明し、新たな自己免疫疾患治療戦略の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) TGF- β 3 による抗体産生抑制メカニズムの解析

In vitro 実験系における評価：マウス脾臓 B 細胞を用いて B 細胞受容体刺激、トル様受容体 (Toll-like receptor: TLR) 刺激における TGF- β 3 および IL-10 によるシグナル修飾を、各サイトカイン単独およびコンビネーション添加条件にて検討した。さらに、ヒト末梢血 B 細胞を用いて、シグナル修飾のマウスとヒトで共通した作用点を同定し、そこを標的とした介入法の検討を行った。

In vivo 実験系による評価：各サイトカインの強制発現を *in vivo* において実現するため、pCAGGS プラスミドベクターに Tgfb3 または IL10 遺伝子をサブクローニングした。同ベクターを NP-LPS にて免疫した C57BL/6 マウスに導入し、特異的抗体を指標に評価を行った。

(2) TGF- β 3 を介した B 細胞制御メカニズムの解明

TGF- β 3 もしくは IL-10 単独、TGF- β 3 および IL-10 添加条件における TLR 刺激 B 細胞の RNA sequencing 解析結果より、ミトコンドリア機能の制御の重要性が示唆されたことより (後述)、フラックスアナライザーを用いて、B 細胞エネルギー代謝につき詳細な評価を行った。解糖系は細胞外に排出される水素イオンの濃度変化を細胞外酸性化速度 (ECAR) として、またミトコンドリアによる好氣的呼吸は酸素が電子伝達系・酸化的リン酸化に使用されることを反映する酸素消費速度 (OCR) として、それぞれフォトルミネセンス法により検出し評価した。

4. 研究成果

In vitro における検討の結果、TGF- β 3 は単独では TLR 刺激による抗体産生を促進するが、IL-10 共存下においては抑制性に機能することを確認した。NP-LPS 免疫による *in vivo* 実験系においても TGF- β 3 による液性免疫制御には IL-10 の存在が必要であることが示された。これらの結果より、生体内においても両抑制性サイトカインの共存が液性免疫制御機構において重要であると考えられた。

TGF- β 3、IL-10 の共存、非共存の TLR 刺激、無刺激下における網羅的遺伝子発現解析を RNA-sequencing にて行い、TLR 刺激による抗体産生を抑制可能な TGF- β 3、IL-10 共存下

においてのみ、電子伝達系が抑制されることが示唆されるという結果を得た。そこで、フラックスアナライザーを用いて、細胞の主要なエネルギー代謝経路である解糖、ミトコンドリアによる好気呼吸につき評価した。その結果、TLR 刺激により亢進した OCR, ECAR は TGF- 3、IL-10 の共存においてのみ強力に抑制されるという知見を得た。

ヒト末梢血 B 細胞においても確認を行ったところ、マウス B 細胞と同様の結果を得、ヒト、マウスにおいて共通の制御機構が存在することが明らかとなった。

これらの検討により、TGF- 3 と IL-10 との協調作用が、B 細胞エネルギー代謝経路を強力に抑制することで液性免疫を制御していることを明らかとした。このことにより、生理的条件下において存在し、強力な液性免疫制御能を有する LAG3 Treg が、抑制性サイトカインである TGF- 3 および IL-10 を共に高産生することの意義を明確なものとし、当初の目標を達成した。これらの成果は、自己抗体産生を介した自己免疫性疾患の新規免疫抑制療法開発の一助となると考えられた。

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 10 件)

- 1 . Okamura Tomohisa、Yamamoto Kazuhiko、Fujio Keishi. Early Growth Response Gene 2-Expressing CD4+LAG3+ Regulatory T Cells: The Therapeutic Potential for Treating Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology*. 2018. 9: 1-9 DOI: 10.3389/fimmu.2018.00340 査読 有
- 2 . Fujio Keishi、Yamamoto Kazuhiko、Okamura Tomohisa. Overview of LAG-3-Expressing, IL-10-Producing Regulatory T Cells. *Curr Top Microbiol Immunol*. DOI: 10.1007/82_2017_59 査読 有
- 3 . 竹島 雄介、岩崎 由希子、岡村 僚久、藤尾 圭志、山本 一彦 全身性エリテマトーデスの病態と代謝制御～新規治療応用の可能性～日本臨床免疫学会会誌 2017. 40 巻 12-20 項 DOI: 10.2177/jsci.40.12 査読 無
- 4 . Nakachi Shinichiro、Sumitomo Shuji、Tsuchida Yumi、Tsuchiya Haruka、Kono Masanori、Kato Rika、Sakurai Keiichi、Hanata Norio、Nagafuchi Yasuo、Tateishi Shoko、Kanda Hiroko、Okamura Tomohisa、Yamamoto Kazuhiko、Fujio Keishi. Interleukin-10-producing LAG3+ regulatory T cells are

associated with disease activity and abatacept treatment in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2017, 19: 12-20. 査読 有

- 5 . Tsuchida Y, Sumitomo S, Ishigaki K, Suzuki A, Kochi Y, Tsuchiya H, Ota M, Komai T, Inoue M, Morita K, Okamura T, Yamamoto K, Fujio K. TGF- 3 Inhibits Antibody Production by Human B Cells. *PLoS One*. 2017, 12: 1-16. DOI: 10.1371/journal.pone.0169646. 査読 有
- 6 . Sumitomo S, Nakachi S, Okamura T, Tsuchida Y, Kato R, Shoda H, Furukawa A, Kitahara N, Kondo K, Yamasoba T, Yamamoto K, Fujio K. Identification of tonsillar CD4+CD25-LAG3+ T cells as naturally occurring IL-10-producing regulatory T cells in human lymphoid tissue. *J Autoimmun*. 2017. 76. 78-84. DOI: 10.1016/j.jaut.2016.09.005 査読 有
- 7 . Morita K, Okamura T, Sumitomo S, Iwasaki Y, Fujio K, Yamamoto K. Emerging roles of Egr2 and Egr3 in the control of systemic autoimmunity. *Rheumatology (Oxford)*. 2016, 55. ii76-ii81. DOI: 10.1093/rheumatology/kew342. 査読 有
- 8 . Fujio K, Komai T, Inoue M, Morita K, Okamura T, Yamamoto K. Revisiting the regulatory roles of the TGF- family of cytokines. *Autoimmun Rev*. 2016. 15. 917-922. DOI: 10.2177/jsci.39.51. 査読 有
- 9 . Fujio K, Okamura T, Sumitomo S, Yamamoto K. Therapeutic potential of regulatory cytokines that target B cells. *Int Immunol*. 2016. 28. 189-195. DOI: 10.1093/intimm/dxv069. 査読 有
- 10 . Komai T, Okamura T, Yamamoto K, Fujio K. The effects of TGF- s on immune responses. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 2016. 39. 51-58. DOI: 10.2177/jsci.39.51 査読 無

[学会発表](計 4 件)

- 1 . Keishi Fujio “A landscape of autoimmune diseases from multisubset transcriptome analysis” 4th Symposium on Max Planck-The University of Tokyo Center for Integrative (招待講演) (国際学会) Nov. 20-22, (2017)
- 2 . 照屋周造、岡村僚久、竹島雄介、駒井俊彦、井上真璃子、岩崎由希子、山本一彦、藤尾圭志 「CD4 陽性 T 細胞における転写因子 Klf1 を介した PD-L1

- 発現誘導機構」第45回日本臨床免疫学会総会 2017年9月28日-30日
3. 藤尾圭志、岡村僚久、駒井俊彦、井上眞璃子、森田薫、住友秀次、山本一彦
「B細胞を抑制するCD4陽性CD25陰性LAG3陽性制御性T細胞」第60回日本リウマチ学会総会・学術集会 2016年4月21日-23日
4. 井上眞璃子、岡村僚久、駒井俊彦、森田薫、照屋周造、岩崎由希子、住友秀次、山本一彦、藤尾圭志
「TGF-3およびIL-10による協調性液性免疫制御機構の解明」第60回日本リウマチ学会総会・学術集会 2016年4月21日-23日

〔その他〕

ホームページ

<http://ryumachi.umin.jp/about/research.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤尾 圭志 (FUJIO KEISHI)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：70401114

(4)研究協力者

駒井 俊彦 (KOMAI TOSHIHIKO)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号：50803938

井上 眞璃子 (INOUE MARIKO)

研究者番号：60816601

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

森田 薫 (MORITA KAORU)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

照屋 周造 (TERUYA SHUZO)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医