

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591168
 研究課題名（和文） 免疫担当細胞に発現するGPCRを介した免疫制御機構の解明と自己免疫疾患の治療
 研究課題名（英文） Elucidation of the immunoregulation through GPCR expressing in immunocompetent cells and therapy for the autoimmune diseases
 研究代表者
 長谷川 均(HASEGAWA HITOSHI)
 愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号：40164826

研究成果の概要：ヒト制御性T細胞、Th1 および Th2 細胞に発現する G 蛋白共役型受容体 (GPCR) を網羅的に解析し、それぞれの細胞に特異的に発現する GPCR を単離した。また、多くの GPCR のリガンドが含まれる脂質ライブラリー等からも、制御性 T 細胞の機能を変化させる物質を単離した。これらのうち、Lysophosphatidylcholine や PPAR アゴニストは、ヒト制御性 T 細胞の抑制機能を高めた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：G-protein coupled receptors, chemokines, regulatory T cells, Th1 cells, Th2 cells, lipids

1. 研究開始当初の背景

G 蛋白共役型受容体 (GPCR) は約 1,200 種類存在し、これらには神経伝達物質受容体、ホルモン受容体、オータコイド受容体からケモカイン受容体にいたる多くの種類の受容体が含まれ、生体の多様かつ重要な機能に関与している。また、GPCR およびそのリガンドの解明は、新しい生命現象の理解の糸口になるとともに創薬の重要なターゲットと考えられている。

免疫分野においては、今まで、GPCR の研究はケモカイン受容体を中心に行われてきた。ところがそれ以外に、① スフィンゴシン 1 リン酸 (SIP) が胸腺から末梢血液中へのリンパ球への移動を促進する (Nature 427: 355,

2004)、② 腎移植や多発性硬化症などの治療薬として注目されている FTY720 の標的分子が SIP の受容体である (Curr Pharm Des 12: 161, 2006)、③cannabinoid receptor (CB)1 や CB2 を介して、抗原提示能のある樹状細胞がアポトーシスを起こす (J Immunol 173: 2373, 2004)、④cannabinoid を多発性硬化症のモデルマウスに投与すると症状が軽減する (Pharmacol Ther 95: 165, 2002)、⑤ロイコトリエン受容体の BLT1 や CysLT2 は、それぞれの欠損マウスの解析にて Th2 免疫反応に関与している (J Immunol 176: 6254, 2006)等の報告が相次いで出始めてきた。このように、GPCR のリガンドである生理活性脂質やペプチド等が様々な免疫担当細胞の移

動やTh1/2反応のバランスの制御に深く関わっていることが明らかになるにつれて、GPCRの免疫系への関与が注目されてきた。

2. 研究の目的

本研究では、制御性T細胞、Th1およびTh2細胞の免疫担当細胞で発現しているGPCRを網羅的に解析し、これらのGPCRとそのリガンドの免疫反応での役割を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト制御性T細胞、Th1およびTh2細胞の単離

①制御性T細胞：MACSカラムもしくはソーティングにてCD4+CD25+ T細胞を分離し、用いた。

②Th1細胞：CD4+CD45RA+ T細胞（ナイーブT細胞）を単離し、抗CD3抗体をコートしたプレートに分注し、IL-12、抗IL-4抗体、抗CD28抗体およびIL-2を添加し、7日間培養し、Th1細胞に分化したものを用いた。

③Th2細胞：ナイーブT細胞を単離し、抗CD3抗体をコートしたプレートに分注し、IL-4、抗IL-12抗体、抗CD28抗体およびIL-2を添加し、7日間培養し、Th2細胞に分化したものを用いた。

(2) スクリーニング

①制御性T細胞、Th1およびTh2細胞のT細胞サブセットに発現するGPCRをApplied Biosystems ヒトゲノムサーベイアレイ（約1,200種類のGPCR）にて網羅的に解析した。

②さらにこれらのうち、それぞれの発現を、real-time PCR法にて確認し、それぞれのサブセットに特異的に発現するGPCRを選択した。

(3) GPCRとそのリガンドを介した免疫反応の解析

それぞれのT細胞サブセットに特異的に発現しているGPCRのうち、既知のリガンドを添加後に、それぞれの各細胞の機能変化を検討した。

①制御性T細胞では、Foxp3の発現レベルの増強、TGF-βやIL-10などの抑制型サイトカインの分泌変化を検討した。

②Th1細胞およびTh2細胞の機能解析：(1)の準備した細胞で、サイトカインや抗体を除去し、リガンドを添加2日後のTh1細胞ではIFN-γ、Th2細胞ではIL-4の産生をELISAにて検討し、コントロールと比較した。

(4) GPCRに反応するモノクローナル抗体の作成

CD4+CD25+ T細胞は、heterogeneityがあり、すべて制御性T細胞ではないので、さ

らに制御性T細胞を分離する目的で、制御性T細胞に特異的に発現しているGPR83に対するモノクローナル抗体の作成を試みた。パキウイルスシステムを用い、大量にGPR83の蛋白を作成し、免疫原としてマウスに投与し、ハイブリドーマの作成を試みた。

(5) ヒト制御性T細胞のFoxp3発現や抑制機能を増強する生理活性物質の単離

GPCRのリガンドには脂質が多く存在する。それぞれのT細胞サブセットに特異的に発現するGPCR側からだけの解析では限界があるので、逆に脂質側から解析を行った。即ち、生理活性脂質ライブラリー等から、ヒト制御性T細胞の機能を増強させる物質の単離を行った。物質添加後にFoxp3の発現が増強し、さらに制御性T細胞の抑制機能が増強する物質をスクリーニングした。

(6) リガンド添加によるヒト誘導型制御性T細胞の機能変化の検討。

①CD4+CD25- T細胞をTGF-β、抗CD3抗体、IL-2および上記Foxp3増強のリガンドで5日間培養し、その後IL-2とリガンドのみで7日間培養し、Foxp3の発現を検討した。

②上記の誘導された細胞からCD4+CD25+CD127-部分を単離し、抑制試験(MLR)を行った。

(7) メチレーションアッセイ：Bisulfite sequencing PCR法

上記の誘導された細胞からDNAを抽出してBisulfiteで処理し、TSDR(Treg-specific demethylated region)のmethylationの比率を比較検討する。

4. 研究成果

(1) 制御性T細胞、Th1およびTh2細胞のT細胞サブセットに特異的に発現するGPCRの選択。

①Applied Biosystems ヒトゲノムサーベイアレイ（約1,200種類のGPCR）にて網羅的に解析し、制御性T細胞に発現しているGPCRは144種類、Th1細胞では123種類、Th2細胞では149種類が単離された。

②これらのうち、さらにreal-time PCR法にて解析し、それぞれのT細胞サブセットに特異的に発現している（他のT細胞サブセットより10倍以上発現しているものを特異的発現とした）GPCRを単離した。その結果、Table 1に示しているように、制御性T細胞では6種類、Th1細胞では3種類、Th2細胞では5種類が単離された。

Table 1 Specific GPCR expression on T cell subsets with real time-PCR

T cell subset	GPCR		
Treg	GPR83 GPR132	KISS1R EDG4	GPR4 AVPR2
Th1	PROKR2	GPR126	GHSR
Th2	MCHR1 HRH1	GPR124 HTR2B	MC3R

Specific expression: >10-fold expression than those on the other T cell subsets

(2) 制御性 T 細胞、Th1 および Th2 細胞の T 細胞サブセットに特異的に発現する GPCR のリガンドを介した免疫反応の解析

Table 1 に示している GPCR の既知のリガンドをそれぞれの T 細胞サブセットに添加し、機能変化を検討した。

①GPR4 や GPR132 (G2A) のリガンドである Lysophosphatidylcholine (LPC) を CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T 細胞(nTreg)に添加すると、Foxp3 の発現増強がみられた。また、LPC は nTreg からの TGF-β の産生を亢進させるが、IL-10, IL-2, IL-4, IFN-γ の産生には影響を与えなかった。以上より、LPC は GPR4 や GPR132 を介して nTreg から TGF-β を産生させ、nTreg の機能を亢進させることが明らかになった(Fig 1&2)。

Fig 1 Foxp3 expression of LPC-treated cells

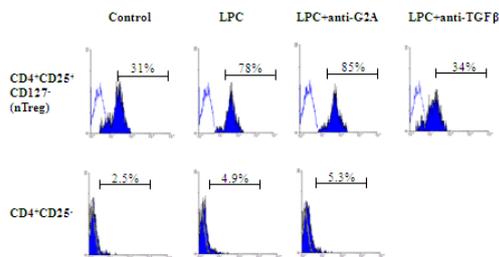
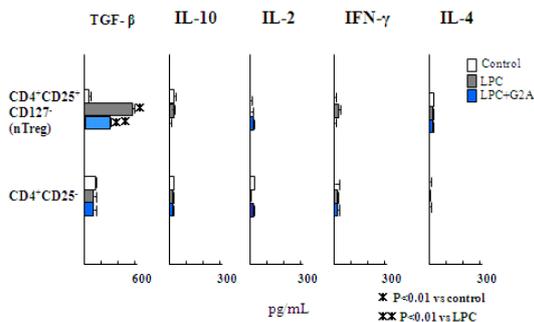


Fig 2 Cytokine production of LPC-treated cells



②他の既知のリガンドでは、制御性 T 細胞、Th1 および Th2 細胞の機能を明らかに変化させるものはなかった。

(3) ヒト制御性 T 細胞の Foxp3 発現や抑制機能を増強する生理活性物質の単離

上記の結果より、それぞれの T 細胞サブセットの特異的に発現する GPCR とそのリガンドを介した解析では、十分満足する結果が得られなかった。そこで、GPCR のリガンドが多く含まれる生理活性脂質ライブラリー等から、制御性 T 細胞の Foxp3 の発現や抑制機能を亢進させる脂質等をスクリーニングした。約 120 種類の物質をスクリーニングし、Table2 に示しているように、14 種類単離している。

Table 2 Screening of lipids and nuclear receptor ligands that up-regulate Foxp3 expression

•Lysophosphatidylcholine(LPC)
•Ciglitazone
•5,8,11,14-Eicosatetraynoic acid
•Bezafibrate
•Clofibric acid
•Gemfibrozil
•GW7647
•N-Oleylethanolamide
•9,10-Octadecenoamide
•AGC
•13(S)-HODE
•12(S)-HHT
•Estrone
•17β-Estradiol

(4) PPAR アゴニストによる制御性 T 細胞の機能変化の検討

Table2 に示している 14 種類の物質のうち、驚くべきことに、Ciglitazone, Bezafibrate, 5,8,11,14-Eicosatetraynoic acid, GW7647, Clofibric acid, Gemfibrozil の 6 種類も PPAR アゴニストが単離された。このため、PPAR アゴニストによる制御性 T 細胞の機能変化を検討した。

①PPAR アゴニスト添加によるヒト誘導型制御性 T 細胞の機能変化の検討: TGF-β で誘導したコントロール群の誘導型 Treg の Foxp3 は低発現で、抑制機能はないが、Ciglitazone, Bezafibrate, 5,8,11,14-Eicosatetraynoic acid, GW7647 の PPAR アゴニスト投与群では、Foxp3 は高発現に維持され、抑制機能を持った (Fig 3 & 4)。また、Foxp3 遺伝子の TSDR 部分のメチル化を検討すると、PPAR アゴニスト投与群は有意に TGF-β で誘導したコントロール群より、メチル化率が低下していた。以上より、上記の 4 種類の PPAR アゴニストは抑制機能を持つ誘導型 Treg を誘導することが明らかになった。

Fig 3 Foxp3 expression of PPAR agonist-treated cells

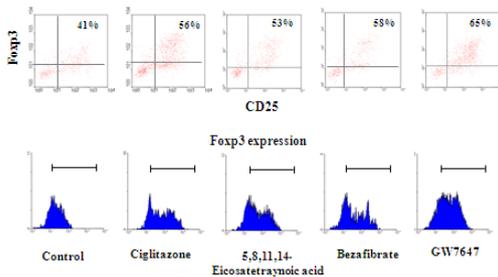
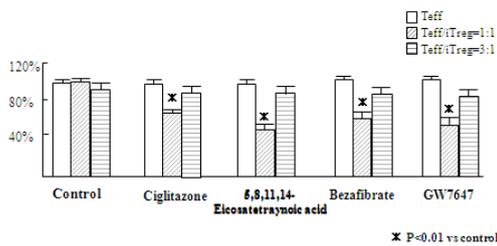


Fig 4 Suppression assay



(5) その他

GPCR であるケモカインレセプターの CCR2 や CX3CR1 をブロックすることにより、腎炎・血管炎が軽減されることを示した。また、CXCR3 発現制御性 T 細胞を傷害臓器に集積させることにより、GVHD を軽減させた。

(6) 今後の展望

- ①それぞれの T 細胞サブセットに特異的に発現する GPCR が単離された。これらのモノクローナル抗体を作成することで、それぞれの T 細胞サブセット、特にヒト制御性 T 細胞が細分化され、真の制御性 T 細胞が見いだせる可能性がある。現在 GPR 83 に対するモノクローナル抗体の作成を試みている。
- ②多くのヒト制御性 T 細胞の分化誘導を促進させる生理活性物質が見出されており、自己免疫疾患の治療に結びつくかもしれない。

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)

- (1) Hasegawa H, Inoue A, Kohno M, Lei J, Miyazaki T, Yoshie O, Nose M, Yasukawa M. Therapeutic effect of CXCR3-expressing regulatory T cells on liver, lung and intestinal damages in a murine acute GVHD model. **Gene Therapy** 15: 171-182, 2008. 査読有。
- (2) Hasegawa H. Chemokine blockade for lupus model mice. **Front. Biosci.** 13: 2900-2908, 2008. 査読有。

[学会発表] (計 7 件)

- (1) 金磊、長谷川均、河野政志、井上淳、安川正貴。ヒト制御性 T 細胞への分化誘導を促進する生理活性物質の解析。第 53 回日本リウマチ学会総会。2009 年 4 月 25 日。東京。
- (2) 長谷川均、金磊、河野政志、井上淳、安川正貴。ヒト CD4 陽性 T リンパ球の Foxp3 の発現を増強する脂質および核内受容体リガンドの解析。第 38 回日本免疫学会総会。2008 年 12 月 1 日。京都。
- (3) 長谷川均。「血管炎研究の最前線」血管炎・腎炎とケモカイン：治療への応用。第 54 回日本病理学会秋期特別総会。2008 年 11 月 20 日。松山。
- (4) 長谷川均、井上淳、河野政志、能勢真人、安川正貴。ケモカインレセプター発現制御性 T 細胞を用いた自己免疫疾患および GVHD の治療。第 52 回日本リウマチ学会総会。2008 年 4 月 21 日。札幌。
- (5) Yamanouchi J, Hasegawa H, Inoue A, Kohno M, Fujiwara H, Hato T, Yasukawa M. Therapeutic effect of CXCR3-expressing regulatory T cells on liver and intestinal damages in a murine acute GVHD model. 49th American Society of Hematology. 2007. 12.9, Atlanta, Georgia, USA.
- (6) 井上淳、長谷川均、河野政志、金磊、宮崎龍彦、能勢真人、安川正貴。GVHD モデルマウスの肝および腸管傷害に対する CXCR3 強制発現制御性 T 細胞の抑制効果。第 37 回日本免疫学会総会。2007 年 11 月 20 日。東京。
- (7) 長谷川均、河野政志、井上淳、金磊、宮崎龍彦、能勢真人、安川正貴。MRL/lpr マウスの臓器傷害に対する CCR2 強制発現制御性 T 細胞の抑制効果。第 37 回日本免疫学会総会。2007 年 11 月 20 日。東京。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 均 (HASEGAWA HITOSHI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40164826

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

井上 淳 (INOUE ATSUSHI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：20403826