

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07206

研究課題名(和文)重症筋無力症患者における制御性T細胞の誘導とプレシジョンメディスンに関する検討

研究課題名(英文)Regulatory T cells and their Potential for Tolerance Induction in Myasthenia Gravis Towards Precision Medicine

研究代表者

田中 祥子(TANAKA, SACHIKO)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：50328556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：重症筋無力症(MG)患者における免疫抑制薬によるエピゲノム制御と治療応答性との関連について検討した。MG患者における末梢血単核細胞由来制御性T(Treg)細胞では、FOXP3遺伝子のメチル化レベルが健常者に比べて高く、免疫異常に寄与している可能性が考えられた。一方、FOXP3の恒常的な発現を維持する脱メチル化酵素TET2との関連は見られなかった。CD4+T細胞およびCD19+B細胞におけるIL-10産生は、治療応答性のみならずCD4+CD25+Treg細胞の割合およびガラクトース欠損IgG抗体産生に影響を及ぼす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりMG患者Treg細胞の分化誘導にFOXP3遺伝子のメチル化制御が有用である可能性が示唆された。抗炎症性サイトカインであるIL-10がTreg細胞の誘導に関与するとともに、MG患者由来IgGにおけるガラクトース欠損のレベルとの関連が明らかとなった。自己免疫疾患における分子標的薬による治療戦略の構築に、末梢血免疫細胞のタイピングに基づくプレシジョンメディスンの可能性を示したものと思われる。

研究成果の概要(英文)：The transcription factor forkhead box P3 (FOXP3) is specifically expressed in CD4+CD25+ regulatory T (Treg) cells, and it is regarded as a critical developmental and functional factor for Treg cells. We found that the FOXP3 gene methylation in patients with myasthenia gravis was significantly higher than healthy subjects, which could contribute to the immunodeficiency of MG. However, it was not shown that the influence of the enzyme for demethylation, TET2 on the stable FOXP3 expression. Interleukin-10 (IL-10) is a pleiotropic cytokine with an important anti-inflammatory and contributed to the immunoregulatory function of Treg cells. In this study, we showed the relationship between the percentage of IL-10+CD19+ B cells and the frequency of Treg cells in CD4+ T cells. We also demonstrated that the IL-10 production on CD4+ T cells was elevated in the MG patients with the galactose-deficient IgG.

研究分野：薬理学

キーワード：重症筋無力症 制御性T細胞 エピジェネティック制御 プレシジョンメディスン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

重症筋無力症 (MG) は、神経筋接合部のアセチルコリンレセプター (ACh-R) に対する抗体が生じ、神経筋伝達がブロックされる自己免疫疾患である。MG における治療の第一選択薬はステロイドであり、応答性は良好である。しかしながら寛解率は 10% 程度である。さらに、減量不十分なまま長期化し、患者の QOL を阻害している可能性が指摘されていた。ステロイドの長期投与は副作用や感受性低下の原因となりうる。ステロイドの減量あるいは離脱後もなお免疫寛容を誘導し、自己抗体産生を制御し、無症状状態を維持する必要がある。

MG 患者では Treg 細胞の数的機能的異常が発症や増悪に関与している可能性が考えられる。しかしながら、Treg 細胞の抑制機能を増加させる、あるいは細胞数を増加させる治療法は不明である。T 細胞分化の方向性は、染色体のエピジェネティック制御によっても決定される。転写因子 Foxp3 は Treg 細胞に特異的に発現しており、Treg 細胞の分化や抑制性の機能発現には Foxp3 が必須であることが明らかとされている。

本研究では、MG 患者末梢における Treg 細胞の分化あるいは機能を明らかにし、Treg 細胞を誘導する治療の有効性について検討する。MG 患者 Treg 細胞の分化誘導に関連するゲノム情報あるいは分子情報を解析し、過剰な自己免疫応答を制御するために有効な治療あるいは発症予防を目的とした Treg 細胞の誘導の可能性について検討した。

## 2. 研究の目的

本研究では、MG 患者末梢における Treg 細胞の分化あるいは機能を明らかにし、Treg 細胞を誘導する治療の有効性について検討する。MG 患者 Treg 細胞の分化誘導に関連するゲノム情報あるいは分子情報を解析し、過剰な自己免疫応答を制御するために有効な治療あるいは発症予防を目的とした Treg 細胞の誘導の可能性について検討した。

## 3. 研究の方法

### 患者背景

本研究は東京医科大学および東京薬科大学の倫理審査委員会の承認を得た後に実施する。東京医科大学病院脳神経内科の外来を受診し、本研究の参加について説明し、内容を理解、納得し、文書にて同意の得られた MG 患者 123 名 (男性 51 名、女性 72 名、平均年齢  $59.3 \pm 16.3$  歳) および健常者 16 名 (男性 9 名、女性 7 名、平均年齢  $30.2 \pm 13.4$  歳) を対象とした。外来診察時に、静脈より末梢血 20mL を採血する。静脈血より分取した末梢血単核細胞 (PBMC) および血漿あるいは血清を用いて、下記項目について検討する。

### サイトカイン測定

血漿中の IL-6 および TGF-1 濃度は ELISA 法によって測定した。CD4+ あるいは CD19+ 細胞内の IL-10 産生量は、フローサイトメトリー法で算出した。

### FOXP3 メチル化レベルの測定

PBMC から DNA を抽出し、バイサルファイト処理を行った後にメチル化特異的 PCR 法にて Foxp3 遺伝子のメチル化解析を行った。一方、TET2 遺伝子発現量の測定をリアルタイム RT-PCR 法で行った。

### ガラクトース欠損 IgG の検出

血清から IgG を精製し、ガラクトース欠損 IgG の糖鎖末端に露出する N アセチルグルコサミン (GlcNAc) 残基と特異的に結合するレクチン Wheat Germ Agglutinin (WGA) を用いて ELISA 法による検出を行った。

### 補体の活性化スクリーニング

マンノース結合レクチンによる補体活性を ELISA 法で測定した。

## 4. 研究成果

初年度は血漿中あるいは CD4<sup>+</sup>T 細胞におけるサイトカイン濃度と治療応答性との関連について検討を行った。CD4<sup>+</sup>T 細胞における IL-10 産生能と GC 減量率との関連が示唆された ( $p=0.036$ )。血漿中の IL-6 濃度は、抗 AChR 抗体価と有意な正の相関を示し ( $p=0.043$ )、自己抗体産生能との関連が示唆された。MG 患者における Treg 細胞の分化能を評価するため、末梢における Treg 誘導因子である TGF- $\beta$  産生と治療効果との関連についても検討を行った。MG 症状が軽快している群に比べて、臨床症状の改善がみられず、治療薬が減量されなかった群では、血漿中 TGF- $\beta$ 1 濃度が高値を示した ( $p=0.028$ )。

次年度には、エピジェネティックな制御として Treg 特異的脱メチル化領域における Foxp3 遺伝子のメチル化レベルを検討した。MG 患者において健常者と比べてメチル化 Foxp3 遺伝子の割合が高く、内因性 Treg 細胞が少ない可能性が明らかとなった。さらに脱メチル化酵素である ten-eleven translocation protein (TET)2 遺伝子の発現量とメチル化 Foxp3 遺伝子の発現量との間に関連はなかった。

関節リウマチなど自己免疫疾患において IgG 上に存在する糖鎖構造の差異が IgG の機能あるいは量に影響を与えることが推測されている。抗 AChRIgG 抗体における糖鎖異常を明らかとするため、レクチンを用いてガラクトース欠損を検証した結果、自己抗体産生および Foxp3 遺伝子のメチル化レベルとの関連については認められなかった。GlcNAc 末端が内因性レクチンにより認識されると補体が活性化する。ガラクトース欠損 IgG と補体活性との関連はみられなかった。しかしながら、ガラクトース欠損 IgG と CD4<sup>+</sup>T 細胞における IL-10 産生との関連が明らかとなり、抗 AChR 抗体における糖鎖異常は治療応答性にも影響を及ぼす可能性が示唆された。

### 得られた成果の国内外の位置づけ

Treg 細胞には特異的な脱メチル化領域 (TSDR) が存在しており、誘導性の iTreg 細胞では TSDR がメチル化されやすいことから、内在性の Treg 細胞に比べて、Foxp3 発現が不安定となる。このため Treg 細胞を誘導する有効な方法は未だ見出されていない。本研究において Treg 細胞のエピジェネティクス解析の結果から、Treg 細胞の免疫抑制機能に影響を及ぼす FOXP3 遺伝子発現の制御は内因性であることが明らかとなった。しかしながら TSDR 特異的にメチル化を阻害することにより、iTreg 細胞を大量に増やすことができれば、MG をはじめとする自己免疫疾患の治療への応用が期待される。

### インパクト

本研究成果から MG においては、炎症性サイトカインである IL-6 が自己抗体産生に関与する一方で、Treg 細胞の分化誘導を阻害する可能性が考えられた。T 細胞における IL-10 産生が低い MG 患者においてはステロイド受容体を高発現していることを明らかとしている。その他の自己免疫疾患と同様に、免疫応答を推進する正のエフェクター T 細胞と負の制

御を担う抑制性 T 細胞(Treg)のバランスの破綻が IL-10 産生低下の原因であると考えられる。本研究成果から抗炎症サイトカインである IL-10 が Treg 細胞の抑制機能 や GC など免疫抑制薬物療法に対する応答性に影響を及ぼす可能性が示唆された。関節リウマチ, 炎症性腸疾患や乾癬などでは, 炎症性サイトカインを標的とした生物学的製剤による治療により高い臨床効果が得られている。本研究成果から抗炎症性サイトカインである IL-10 を標的とした生物学的製剤によっても, 患者の社会生活の制限を緩和し生活の質を大きく改善する可能性が示された。

### **今後の展望**

MG においては Treg 細胞の抑制機能に關与する IL-10 や T 細胞の表面に発現する免疫チェックポイント受容体の一つである細胞傷害性 T リンパ球抗原 4 (CTLA-4) 遺伝子変異の発現頻度が高いと考えられている。本研究において, CD4<sup>+</sup>T 細胞あるいは CD19<sup>+</sup>B 細胞内における IL-10 は検出可能であり, Treg 細胞との関連も認められた。しかしながら, その産生量には個人差があり GC 応答性や IgG の糖鎖修飾に影響を及ぼす可能性が示唆された。プレジジョンメディスンを実践するために, エピゲノムを含む生体分子情報を蓄積し, MG 患者における亜集団分類と治療応答性の評価を実施したい。

### **当初予期していなかったことに対する新たな知見**

2017 年から抗補体療法としてヒト化 C5 モノクローナル抗体であるエクリズマブが MG 治療においても適応拡大となり, 実臨床でのデータが蓄積されつつある。抗体補体介在性に筋終板膜が破壊されるとシナプス後膜の AChR の密度が低下し, 神経筋伝達ブロックが起こる。本研究ではガラクトース欠損 IgG において露出される GlcNAc との関連を明らかとするため, レクチン経路を介する補体活性の評価を行った。C5 の検出が可能となる補体活性評価を実施し, エクリツマブによる治療応答性との関連についても検討する必要があると思われる。さらに Fc 領域に結合する N 型糖鎖の分析を行うことで, 自己抗体による筋終板膜の破壊を制御しうる治療法が明らかとなるものと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 増田真之, 田中祥子, 上田優樹, 齋藤智子, 新井礼美, 山崎 純 , 渡邊江莉, 長澤早由美, 秋葉優樹 , 内海裕也, 平野俊彦, 相澤仁志
2. 発表標題 重症筋無力症患者の高用量ChE阻害剤と CNIs併用治療は有痛性筋痙攣を引き起こす
3. 学会等名 第60回 日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増田真之, 上田優樹, 内藤万希子, 大久保芳彦, 齋藤智子, 井戸信博, 山崎 純, 渡邊江莉, 長澤早由美, 木村亮之, 内海裕也, 田中祥子, 平野俊彦, 相澤仁志
2. 発表標題 重症筋無力症におけるエクリズマブによるQOL改善
3. 学会等名 第61回 日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------