

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791067

研究課題名(和文) 制御性T細胞の樹状細胞抑制に関する転写因子の同定と免疫療法の開発

研究課題名(英文) Identification of transcription factors responsible for suppression of dendritic cells by regulatory T cells and development of immunotherapy

研究代表者

大西 康 (Onishi, Yasushi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：10509574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト単球由来樹状細胞においてFoxO3aの発現抑制を行うことで共刺激分子CD80/86、HLA-DRの発現上昇とT細胞刺激能および炎症性サイトカイン産生増加がみられた。また、これらの変化はNF- κ B依存性であった。樹状細胞にLPS刺激を行うと速やかにFoxO3aはリン酸化され、核外に移動した。LPS刺激後、CD86 mRNAの増加が観察され、遅れてFoxO3a mRNAの増加が認められた。LPS刺激の際には早期にFoxO3aが不活化することで樹状細胞が活性化すると考えられる。これらの結果からFoxO3aは樹状細胞の機能制御において中心的な役割を担うことが示唆される。

研究成果の概要(英文)：Suppression of FoxO3a in human monocyte-derived dendritic cells (DC) increased the expression of CD80/86 and HLA-DR. T-cell proliferation and production of inflammatory cytokines, IL-6 and TNF α , were enhanced in co-culture of FoxO3a-knockdown DC and T cells. The activation of DC by FoxO3a suppression was dependent on NF- κ B. When DC was stimulated with LPS, FoxO3a was promptly phosphorylated and moved to cytoplasm from nucleus. Levels of FoxO3a mRNA increased later than elevation of CD86 mRNA levels after the addition of LPS. Inactivation of FoxO3a induced the activation of DC in an early phase of the LPS stimulation. These results suggest that FoxO3a has a central role in the regulation of DC functions.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：樹状細胞 免疫寛容 制御性T細胞 FoxO3a CD86 免疫療法

1. 研究開始当初の背景

免疫反応を負に制御するメカニズムについてはいまだに不明な点が多い。これまでの研究から制御性 T 細胞が免疫寛容の成立・維持に中心的な役割を担うことが示された。さらに、制御性 T 細胞の主たる免疫抑制機構は CTLA-4 を介した、樹状細胞(dendritic cells, DC)の CD80/86 発現抑制であると考えられる。

DC は抗原提示細胞として、T 細胞活性化などの免疫応答の調整を担う細胞である。マウスにおいて制御性 T 細胞が DC を抑制する際には、DC の転写因子 FoxO3a が必須であることが報告された。しかし、FoxO3a が DC を負に制御するメカニズムは不明である。FoxO3a とそれに関連する分子の解析を進め、DC を抑制する詳細なメカニズムを解明することで、新規免疫療法の基盤となる知見が得られる可能性がある。

2. 研究の目的

ヒト DC において免疫反応の際に FoxO3a が果たす役割を明らかにし、さらに FoxO3a が DC を負に制御するうえで必要とする分子を同定し、その抑制メカニズムを解明することを目的とした。ヒト DC の抑制メカニズムを明らかにすることで、その抑制を解除して DC を活性化させる方法の発見につなげる。

3. 研究の方法

(1) DC の調整

臍帯血または末梢血の単核球分画より MACS 法で CD14 陽性単球を分離し、GM-CSF + IL-4 存在下で培養し作成した。

(2) FoxO3a の発現抑制 (ノックダウン)

Electroporation 法では DC の生存率が低くなるため、リポフェクション法を用いて FoxO3a もしくは control siRNA のトランスフェクションを行った。Real-time RT-PCR 法により FoxO3a mRNA の定量を行い、ノックダウン効率を評価した。CD80、CD86、HLA-DR の発現、アポトーシス割合はフローサイトメトリー法を用いて解析した。

(3) DC と T 細胞の共培養

CD3 陽性 T 細胞と DC を抗 CD3 抗体および IL-2 の存在下で培養した。T 細胞増殖は CFSE ラベリング法を用いて評価した。IL-6、TNF は ELISA 法を用いて測定した。

(4) FoxO3a の細胞局在

DC を固定し免疫蛍光染色を行い共焦点顕微鏡を用いて解析した。LPS 添加後、一定の時間ごとに固定を行うことで経時的な変化を観察した。

(5) TIM-3 強制発現

U937 細胞株にレンチウイルスベクターを用いて TIM-3 強制発現細胞株を作成した。

4. 研究成果

(1) DC における FoxO3a 発現抑制

DC において FoxO3a 発現を抑制したところ、共刺激分子 CD80/86 および HLA-DR 発現が上

昇し、T 細胞刺激能が高くなることが示された。さらに、T 細胞との共培養時の上清において炎症性サイトカイン IL-6、TNF が増加していることも確認された。これらの結果から FoxO3a は DC の CD80/86 の発現を抑制することで免疫応答を制御している可能性が示唆された。一方で、FoxO3a 発現抑制により DC のアポトーシスの割合が増加することが確認され、FoxO3a が DC のアポトーシスを抑制している可能性が示唆された。

(2) FoxO3a 発現抑制と NF- κ B 依存性変化

DC の活性化においては NF- κ B が重要な役割を持つことが知られている。DC における FoxO3a 発現抑制の際に NK- κ B1 mRNA は約 3 倍程度に上昇し、一方で I κ B mRNA は約 1/2 に低下した。これらの結果から FoxO3a 発現抑制による DC 活性化に NK- κ B の関与が示唆された。NF- κ B 活性化阻害剤 PDTC(Pyrrolidinedithiocarbamate) を添加したところ、CD80/86、HLA-DR の発現上昇が抑制された。

(3) FoxO3a リン酸化と細胞内局在

次に LPS 刺激後の DC 活性化時における細胞内 FoxO3a 局在の変化とリン酸化を経時的に調べた。LPS 刺激から 30 分後には FoxO3a の核外への移動が観察された。さらに FoxO3a に対するリン酸化 FoxO3a 比は LPS 刺激 15 分後から上昇し、30 分後には約 2 倍となった。LPS 刺激後 FoxO3a は速やかにリン酸化され、核外へ移動することで DC における抑制が解除され、CD80/86 発現上昇を誘導することが示唆された。

(4) LPS 刺激後の FoxO3a 発現量変化

LPS 刺激後 CD86 mRNA 量を経時的に定量したところ、6 時間後から上昇が認められ、12 時間後には約 2 倍、24 時間後には約 6 倍に増加した。一方、FoxO3a mRNA 量は 6 時間後までは発現量が変化しないが、12~24 時間後には約 8 倍に急増した。FoxO3a 発現上昇は CD86 発現上昇よりも遅れて観察された。

(5) TIM-3 強制発現と FoxO3a 活性化

次に DC において FoxO3a 活性化と関連する分子として TIM-3 について検討した。TIM-3 は HMGB1 と核酸の複合体をリガンドとして DC に対して抑制性シグナルを伝達することが知られている。腫瘍に浸潤した DC においては FoxO3a 活性化と TIM-3 発現上昇が報告されている。単球系細胞株である U937 において TIM-3 を強制発現させたところ U937 の増殖が抑制され、FoxO3a の核への局在が増加していることが示された。TIM-3 からの抑制性シグナルは FoxO3a を介して作用する可能性が示唆された。

以上の結果から、FoxO3a は定常状態において DC 活性化を抑制し、LPS などの刺激時には速やかにリン酸化され、核外に移動することで DC が活性化するように働くことが示された。LPS 刺激後の CD86 mRNA 発現上昇に遅れて観察された FoxO3a mRNA の増加は、DC の活性化に対するネガティブフィードバックと

して機能している可能性があり、今後の検討が必要である。FoxO3a 発現抑制による NF- κ B 依存性の DC 活性化誘導という知見を基礎として、新たな免疫療法の開発につなげていきたい。

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 17 件)

1. Fujiwara T, Saitoh H, Inoue A, Kobayashi M, Okitsu Y, Katsuoka Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Harigae H. 3-deazaneplanocin a (dznep), an inhibitor of s-adenosylmethionine-dependent methyltransferase, promotes erythroid differentiation. *J Biol Chem*, 289, 8121-8134. 2014. 10.1074/jbc.M114.548651
2. Nakajima S, Ohguchi H, Fujiwara T, Onishi Y, Kamata M, Okitsu Y, Fukuhara N, Ishizawa K, Harigae H. Induction of thymic stromal lymphopoietin in mesenchymal stem cells by interaction with myeloma cells. *Leuk Lymphoma*, 2014. [Epub ahead of print] 10.3109/10428194.2014.881478
3. Tanaka J, Morishima Y, Takahashi Y, Yabe T, Oba K, Takahashi S, Taniguchi S, Ogawa H, Onishi Y, Miyamura K, Kanamori H, Aotsuka N, Kato K, Kato S, Atsuta Y, Kanda Y. Effects of kir ligand incompatibility on clinical outcomes of umbilical cord blood transplantation without atg for acute leukemia in complete remission. *Blood Cancer J*, 3, e164. 2013. 10.1038/bcj.2013.62
4. Ohba R, Furuyama K, Yoshida K, Fujiwara T, Fukuhara N, Onishi Y, Manabe A, Ito E, Ozawa K, Kojima S, Ogawa S, Harigae H. Clinical and genetic characteristics of congenital sideroblastic anemia: Comparison with myelodysplastic syndrome with ring sideroblast (mds-rs). *Ann Hematol*, 92, 1-9. 2013. 10.1007/s00277-012-1564-5
5. Kato H, Onishi Y, Okitsu Y, Katsuoka Y, Fujiwara T, Fukuhara N, Ishizawa K, Takagawa M, Harigae H. Addition of clarithromycin to lenalidomide/low-dose dexamethasone was effective in a case of relapsed myeloma after long-term use of lenalidomide. *Ann Hematol*, 92, 1711-1712, 2013. 10.1007/s00277-013-1761-x
6. Kato H, Onishi Y, Nakajima S, Okitsu Y, Fukuhara N, Fujiwara T, Yamada-Fujiwara M, Kameoka J, Ishizawa K, Harigae H. Significant improvement of takayasu arteritis after cord blood transplantation in a patient with myelodysplastic syndrome. *Bone Marrow Transplant*, 49, 458-459, 2013. 10.1038/bmt.2013.198
7. Kanda J, Atsuta Y, Wake A, Ichinohe T, Takanashi M, Morishima Y, Taniguchi S, Takahashi S, Ogawa H, Ohashi K, Ohno Y, Aotsuka N, Onishi Y, Kato K, Nagamura-Inoue T, Kanda Y. Impact of the direction of hla mismatch on transplantation outcomes in single unrelated cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 19, 247-254. 2013. 10.1016/j.bbmt.2012.09.017
8. Inoue A, Fujiwara T, Okitsu Y, Katsuoka Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Harigae H. Elucidation of the role of Imo2 in human erythroid cells. *Exp Hematol*, 41, 1062-1076, 2013. 10.1016/j.exphem.2013.09.003
9. Ichikawa S, Fukuhara N, Inoue A, Katsushima H, Ohba R, Katsuoka Y, Onishi Y, Yamamoto J, Sasaki O, Nomura J, Fukuhara O, Ishizawa K, Ichinohasama R, Harigae H. Clinicopathological analysis of primary adrenal diffuse large b-cell lymphoma: Effectiveness of rituximab-containing chemotherapy including central nervous system prophylaxis. *Exp Hematol Oncol*, 2, 19. 2013. 10.1186/2162-3619-2-19
10. Fujiwara T, Okitsu Y, Katsuoka Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Harigae H. Expression profiling of eto2-regulated mirnas in erythroid cells: Possible influence on mirna abundance. *FEBS Open Bio*, 3, 428-432. 2013. 10.1016/j.fob.2013.10.004
11. Fujiwara T, Alqadi YW, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Harigae H. Role of transcriptional corepressor eto2 in erythroid cells. *Exp Hematol*, 41, 303-315e301.2013.10.1016/j.exphem.2012.10.015
12. Atsuta Y, Kanda J, Takanashi M, Morishima Y, Taniguchi S, Takahashi S, Ogawa H, Ohashi K, Ohno Y, Onishi Y, Aotsuka N, Nagamura-Inoue T, Kato K, Kanda Y. Different effects of hla disparity on transplant outcomes after single-unit cord blood transplantation between

pediatric and adult patients with leukemia. Haematologica, 98, 814-822. 2013. 10.3324/haematol.2012.076042

13. Yamada-Fujiwara M, Miyamura K, Fujiwara T, Tohmiya Y, Endo K, Onishi Y, Ishizawa K, Kameoka J, Ito M, Harigae H. Diagnosis of intestinal graft-versus-host disease and thrombotic microangiopathy after allogeneic stem cell transplantation. Tohoku J Exp Med, 227, 31-37. 2012. 10.1620/tjem.227.31

14. Inokura K, Onishi Y, Shimosegawa K, Okitsu Y, Katsuoka Y, Fujiwara T, Fukuhara N, Ishizawa K, Harigae H. Philadelphia-negative acute promyelocytic leukemia in a patient with chronic myeloid leukemia in complete cytogenetic response after treatment with tyrosine kinase inhibitor. Ann Hematol, 91, 1825-1826. 2012. 10.1007/s00277-012-1477-3

(以上全て査読有)

15. 大西 康, 文光堂、Medical Practice 妊娠時の貧血、2013年、vol.30(9)、1569-1572、査読無

16. 大西 康, メディカ出版、プロフェッショナルがんナースング 造血器腫瘍に対する分子標的薬(白血病・悪性リンパ腫) 2013年、vol.3(5)、42-44、査読無

17. 大西 康, 文光堂、Medical Practice 妊娠と貧血 診断と対処のしかた、2011年、vol.28(12)、2137-2141、査読無

[学会発表](計12件)

1. 大西康、賀古真一、康秀男、森毅彦、中尾真二、内田直之、大橋一輝、坂巻壽、森島泰雄、加藤剛二、鈴木律朗、山崎宏人。成人再生不良性貧血の生着不全に対する2回目同種造血幹細胞移植の検討。第36回日本造血細胞移植学会総会 2014/3/7-9 沖縄

2. 長谷川慎、大西康、大橋圭一、加藤浩貴、近藤愛子、沖津庸子、勝岡優奈、福原規子、藤原亨、藤原実名美、石澤賢一、亀岡淳一、張替秀郎。非寛解期血液悪性疾患に対する臍帯血移植の成績：単一施設50例の後方視的検討。第36回日本造血細胞移植学会総会 2014/3/7-9 沖縄

3. 加藤浩貴、大西康、大橋圭一、近藤愛子、長谷川慎、沖津庸子、勝岡優奈、福原規子、藤原亨、藤原実名美、石澤賢一、亀岡淳一、張替秀郎。同種造血幹細胞移植におけるポリコナゾール血中濃度測定とその有用性についての後方視的検討。第36回日本造血

細胞移植学会総会 2014/3/7-9 沖縄

4. 近藤愛子、大西康、大橋圭一、加藤浩貴、長谷川慎、沖津庸子、福原規子、勝岡優奈、藤原実名美、石澤賢一、亀岡淳一、張替秀郎。T細胞性急性リンパ性白血病/リンパ芽球性リンパ腫に対する造血幹細胞移植13例の後方視的解析。第36回日本造血細胞移植学会総会 2014/3/7-9 沖縄

5. 大橋圭一、大西康、加藤浩貴、近藤愛子、長谷川慎、沖津庸子、勝岡優奈、福原規子、藤原実名美、藤原亨、亀岡淳一、張替秀郎。マントル細胞リンパ腫に対し自己末梢血細胞移植治療後に成人T細胞性白血病/リンパ腫を発症したHTLV-1キャリアの一例。第36回日本造血細胞移植学会総会 2014/3/7-9 沖縄

6. Yasushi Onishi, Koichiro Sugimura, Yoko Okitsu, Yuna Katsuoka, Noriko Fukuhara, Tohru Fujiwara, Junichi Kameoka, Kenichi Ishizawa, Heideo Harigae. Amelioration of pulmonary artery hypertension after cord blood transplantation in an CAEBV patient. 第75回日本血液学会 2013/10/11-13 札幌

7. Yukiko Kamogawa, Yasuhi Onishi, Makiko Suzuki, Yoko Okitsu, Yuna Katsuoka, Noriko Fukuhara, Toru Fujiwara, Junichi Kameoka, Kenichi Ishizawa, Hideo Harigae. Progressive multifocal leukoencephalopathy by JCV in a PCL patient treated with bor/lem/dex therapy. 第75回日本血液学会 2013/10/11-13 札幌

8. Hiroki Kato, Yasuhi Onishi, Keiichi Ohashi, Aiko Kondou, Shin Hasegawa, Youko Okitsu, Yuuna Katsuoka, Noriko Fukuhara, Tohru Fujiwara, Junichi Kameoka, Kenichi Ishizawa, Masanori Takagawa, Hideo Harigae. Addition of oral cyclophosphamide is effective for myeloma refractory to lenalidomide/dexamethasone. 第75回日本血液学会 2013/10/11-13 札幌

9. 大西康、甲斐龍幸、松本勇人、原崎頼子、佐々木治、木村秀夫、小川一英、張替秀郎。成人再生不良性貧血に対する同種造血幹細胞移植におけるフルダラビン+シクロフォスファミドを含む前処置の検討。第35回日本造血細胞移植学会 2013/3/7-9. 金沢

10. Yasuhi Onishi, Kentaro Nasu, Makiko Suzuki, Shinji Nakajima, Yuna Katsuoka, Yoko Okitsu, Tohru Fujiwara, Noriko Fukuhara, Junichi Kameoka, Kenichi Ishizawa, Ryo Ichinohasama, Hideo Harigae. Allogeneic HSCT in adult patients with EBV-associated T/NK-cell LPD, ENKL, and

ANKL. 第 7 4 回 日 本 血 液 学 会
2012/10/19-21, 京 都

11. **大西康**、八田俊介、斎藤陽、猪倉恭子、
小野寺晃一、三浦由希子、木幡桂、勝岡優奈、
福原規子、石澤賢一、亀岡淳一、張替秀郎。臍
帯血移植または非血縁者間骨髄移植を施行
された成人急性骨髄性白血病および骨髄異
形成症候群の成績：単一施設における比較解
析。第 3 4 回日本造血幹細胞移植学会総会
2012/2/24-25 大阪

12. Mayuko Tsuji, **Yasushi Onishi**, Mayumi
Kamata, Tsuyoshi Shirai, Shinji Nakajima,
Rie Ohba, Toru Fujiwara, Kenichi Ishizawa,
Hideo Harigae. Fox03a has a crucial role
for immune response in human dendritic
cells. 第 7 3 回日本血液学会学術集会
2011/10/14-16 名古屋

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大西 康 (Onishi, Yasushi)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号：10509574