

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：34533

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08119

研究課題名(和文) HGF受容体アゴニスト・アンタゴニストとIL-2を用いた免疫反応の制御

研究課題名(英文) Regulation of immune reactions using HGF receptor agonist/antagonist and IL-2

研究代表者

岩崎 剛 (Iwasaki, Tsuyoshi)

兵庫医療大学・薬学部・教授

研究者番号：10151721

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)：IL-2-抗IL-2抗体免疫複合体(IL-2ICs)を、コラーゲン誘導関節炎(CIA)マウスに導入すると、末梢血に制御T細胞(Tregs)が2倍以上に増加し、関節炎抑制効果が認められた。滑膜組織の血管新生、炎症細胞浸潤が著明に減少し、滑膜組織のIL-17、IL-6、TNF- α などの炎症性サイトカインの発現の抑制とIL-10発現やTregsの増加が認められた。IL-2ICsにより誘導されたTregsのT細胞増殖抑制機能は、コントロールマウスのTregsに比べより強いことが明らかになった。IL-2ICsは、Tregsを誘導し、関節炎を抑止することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：IL-2ICs administration effectively elicited a >2-fold expansion of CD4+Foxp3+ regulatory T cells (Tregs) in peripheral blood cells than that found in control mice. IL-2ICs treatment significantly inhibited arthritis in CIA mice. Histopathological examination of joints revealed inhibited synovial cell proliferation and IL-17, IL-6, TNF- α , but increased FoxP3+ Tregs after IL-2ICs treatment. Flow cytometric examination of spleen cells revealed reduced IFN- γ - and IL-17-producing cells, and increased IL-10 producing Tregs after IL-2ICs treatment. The suppressive activities of CD4+CD25+ Tregs induced by IL-2ICs were stronger than those in untreated mice. IL-2ICs inhibit arthritis by augmenting not only Treg numbers, but also Treg functions, which play regulatory roles in autoimmune arthritis..

研究分野：免疫学

キーワード：IL-2 免疫複合体 関節リウマチ 制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

Tregs には胸腺内において自己反応性 T 細胞と共に産生される nTregs と、末梢血中のナイーブ T 細胞から分化誘導される iTregs が存在し、いずれも免疫寛容に關与している。iTregs は T 細胞受容体 (TCR) の刺激が無くても、IL-2 が存在すれば増殖可能である。連携研究者らは、IL-2-抗 IL-2 抗体免疫複合体 (IL-2ICs) とシクロスポリン (CyA) の併用で、in vitro、in vivo において、エフェクター T 細胞を減少させ、iTregs を増幅し、実験的脳脊髄炎 (EAE) モデルの発症を制御できることを明らかにしてきた。そこで今回、IL-2IC により iTregs を誘導し、自己免疫反応を制御して、より効果的に自己免疫疾患を制御する新規治療法を開発することに着想した。

2. 研究の目的

関節リウマチモデルに、IL-2ICs を投与し、その効果を検討する。

(1) 実験プロトコルは、まず、モデルマウスに IL-2IC を単独で腹腔内投与し、iTregs の in vivo での誘導と関節炎の抑制効果を解析する。本研究の連携研究者は、IL-2IC による iTregs の増幅により、移植免疫反応や自己免疫反応が制御できることを報告している。本研究の特色は IL-2IC により iTregs を誘導し、iTregs による免疫制御効果を併用し、より効果的な自己免疫疾患の治療法を開発する点にある。

(2) エフェクター T 細胞の制御と iTregs 誘導の治療概念は、自己免疫疾患のみならず、移植免疫反応や腫瘍免疫反応の制御など、幅広い分野に臨床応用できる可能性がある。

3. 研究の方法

連携研究者らは、IL-2ICs を腹腔内投与すると、急性 GVHD や EAE が改善することを明らかにしている。そこで、まず、IL-2ICs の単独投与により、CIA マウス関節炎が改善可能かどうかを検討する。

(1) モデル動物の作成

CIA モデル：DBA/1J マウスに型コラーゲンをマウス尾の付け根に 2 回皮内投与することにより作製した。型コラーゲン処置後、経時的に関節炎スコアを記録した。現在型コラーゲン誘導により、均一な関節炎誘発を確認している。

(2) IL-2ICs の作成と投与

IL-2 と抗 IL-2 抗体 (JES-6.1) の免疫複合体 (IC) は、IL-2 単独に比べ半減期が長く、生体内で CD25 と特異的に結合するため、iTregs を効率的に増殖させることが可能である。マウス rIL-2 (1 µg) と抗マウス IL-2 抗体 (JES-6.1: 5 µg) を 30 分間 on ice で incubate し、IL-2ICs を作成し、関節炎や GVHD 誘導後から 3 日間連日腹腔内投与を行う。

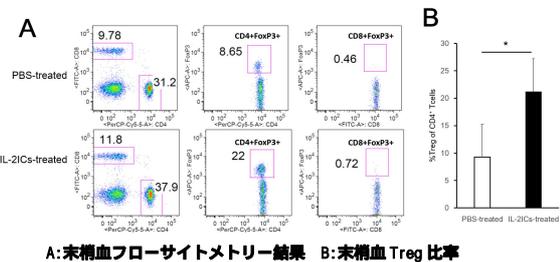
(3) 実験プロトコル

実験群は PBS 投与群、IL-2IC 投与群、コントロール IC 投与群に分け、IL-2ICs およびコントロール ICs の投与は、関節炎誘導後、3 日間連続腹腔内投与を行う。治療効果は、関節組織の病理組織学的解析、組織の炎症性サイトカインの発現、関節腫脹スコア、病理組織学的解析、関節組織の炎症性サイトカイン発現、末梢血リンパ球数を解析し判定する。さらに、これらの動物モデルの治療後の末梢血 Tregs の増加をフローサイトメトリーにて解析する。

4. 研究成果

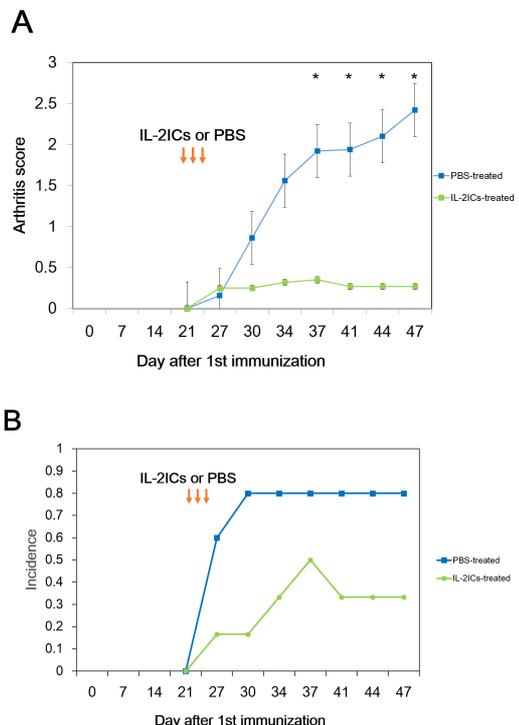
(1) IL-2ICs による Tregs の誘導

CIA マウスに IL-2ICs 腹腔内注射 7 日後の血中 Tregs を解析した。その結果、IL-2ICs 腹腔内注射により、2 倍以上の末梢血 Tregs が増加することが明らかになった。



(2) IL-2ICs による関節炎抑制効果

CIA マウスに、IL-2ICs を 3 日間連日腹腔内投与し、関節炎スコア (0, 腫脹なし; 0.1, 1 足指関節腫脹; 0.5, 軽度の膝関節腫脹; 1.0, 高度の膝関節腫脹) を測定した。その結果、IL-2ICs 投与により、有意に関節炎が抑制されることが明らかになった。

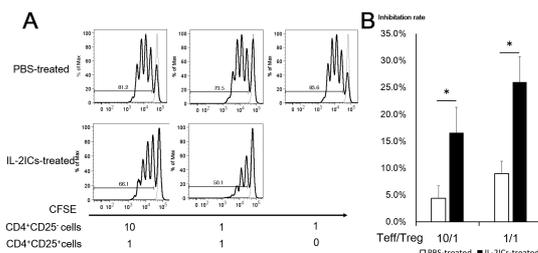


A: 関節スコア B: 関節炎発症率

(3) IL-21Cs による関節組織への効果
 関節炎誘導後 60 日の非治療 CIA マウスの関節組織は、マクロファージや好中球などの炎症性細胞浸潤と滑膜細胞増殖を認めたが、IL-21Cs 治療 CIA マウスの関節組織は、これらの病理組織学的変化は抑制されていた。

(4) IL-21Cs による関節組織の炎症性細胞浸潤、炎症性サイトカイン発現の抑制効果
 関節炎誘導後 60 日の非治療 CIA マウスでは、関節組織の IL-6、TNF- α 、IL-17、が強く発現していたが、IL-21Cs 治療 CIA マウスでは、これらの発現が抑制されていた。また、関節組織内への Tregs 浸潤が増加していることが明らかになった。以上の実験結果より、IL-21Cs は、Tregs を誘導し、炎症性サイトカイン発現を抑制することが明らかになった。

(5) IL-21Cs 誘導 Tregs の T 細胞増殖抑制効果
 マウス脾臓 CD4+CD25-T 細胞と CD4+CD25+T 細胞を共培養し CD3/CD28 で刺激し、細胞増殖能を CFSE 染色後フローサイトメトリーで解析した (A)。その結果、CD4+CD25+T 細胞添加により容量依存的に T 細胞増殖が抑制されることが明らかになった。また、IL-21Cs で誘導された CD4+CD25+T 細胞は、コントロールマウス由来 CD4+CD25+T 細胞に比べ、より強い抑制効果があることが明らかになった (B)。



A フローサイトメトリー結果 B Tregs 抑制効果

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)

[学会発表] (計 8 件)

Yokoyama Y, Iwasaki T, Kitano S, Furukawa T, Satake A, Matsui K, Sano H. IL-21C suppresses CIA in mice by the Th1/Th2 immune responses due to enhancement of both Treg numbers and Treg functions, European League Against Rheumatism (EULAR), Madrid, Spain, 2017

横山雄一、岩崎 剛、北野幸恵、古川哲也、松井 聖、佐野 統 IL-2-抗 IL-2 抗体免疫複合体によるモデルマウス関節炎抑制と制御性 T 細胞増強効果の検討、第 61 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2017、福岡市

Yokoyama Y, Iwasaki T, Kitano S, Satake A, Shibasaki S, Karasaki M, Moriya N, Matsui K, Sano H. Involvement of regulatory T cells and microRNAs in regulation of collagen-induced arthritis in mice treated with IL-2/anti-IL-2 immune complexes, The 13th International Workshop on Autoantibodies and Autoimmunity, Kyoto, Japan, 2016

Yokoyama Y, Iwasaki T, Satake A, Shibasaki S, Karasaki M, Moriya N, Matsui K, Kitano S, Sano H. Involvement of regulatory T cells and microRNAs in regulation of collagen-induced arthritis in mice treated with IL-2/anti-IL-2 immune complexes, European League Against Rheumatism (EULAR), London, UK, 2016

Iwasaki T, Shibasaki S. Interleukin-2/anti-interleukin-2 immune complexes inhibits arthritis by induction of regulatory T cells in collagen-induced arthritis model, 26th Anniversary World Congress on Biosensors, Gothenburg, Sweden, 2016

横山雄一、岩崎 剛、北野幸恵、古川哲也、松井 聖、佐野 統、IL-2-抗 IL-2 抗体免疫複合体による関節リウマチ治療の検討、第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2016、横浜市

横山雄一、岩崎 剛、北野幸恵、古川哲也、関口昌弘、東 直人、北野将康、角田慎一郎、松井 聖、佐野 統、IL-2-抗 IL-2 抗体免疫複合体による関節リウマチの治療、第 80 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2015、東京都

Iwasaki T, Yokoyama Y, Kitano S, Satake A, Matsui K, Sano H. Paradoxical effects of interleukin-2/anti-interleukin-2 monoclonal antibody immune complex on collagen-induced arthritis, European League Against Rheumatism (EULAR),

Rome, Italy, 2015

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 剛 (Iwasaki, Tsuyoshi)
兵庫医療大学・薬学部・教授
研究者番号：10151721

(2) 研究分担者

佐野 統 (Sano, Hajime)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：00196304

芝崎 誠司 (Shibasaki, Seiji)
兵庫医療大学・共通教育センター・准教授
研究者番号：50342530

(3) 連携研究者

佐竹 敦志 (Satake, Atsushi)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号：50412028