

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19566

研究課題名(和文) ヒトLAG3陽性制御性T細胞によるB細胞抑制能と、TGF- β 3の作用機序解析

研究課題名(英文) Suppression of B-cell antibody production with human LAG3+ Treg and analysis of mechanism of TGF-beta 3

研究代表者

住友 秀次 (Sumitomo, Shuji)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20392996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らが同定したLAG3+Tregは、マウスで抑制性サイトカインTGF- β 3を特異的に産生し、B細胞の抗体産生を強力に抑制する。本研究では、ヒトにおけるTGF- β 3のB細胞に対する作用機序を解明した。TGF- β 3は、初代培養のヒトB細胞の抗体産生を抑制し、ヒトB細胞の細胞死を誘導し、形質芽細胞への分化および増殖を抑制した。TGF- β 3は、IRF4、Blimp-1、XBP1といった抗体産生細胞への分化に重要な遺伝子発現を抑制し、Sykのリン酸化を抑制していた。また、本研究ではヒト扁桃とヒト末梢血LAG3+Tregを解析し、関節リウマチ、abataceptとの関係を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：LAG3+ Treg identified by the research leaders specifically produces the inhibitory cytokine TGF- β 3 in mice and strongly suppresses antibody production of B cells. In this study, the mechanism of action of TGF- β 3 on human primary B cells was elucidated. TGF- β 3 inhibited antibody production of human primary B cells, induced cell death of human B cells, inhibited proliferation and inhibited differentiation into plasmablast cells. TGF- β 3 suppressed gene expression such as IRF4, Blimp-1, and XBP1, which are important for differentiation into antibody-producing cells, and suppressed phosphorylation of Syk. In addition, in this study, human tonsillar and human peripheral blood LAG3+ Treg were analyzed and the relationship between LAG3+ Treg and rheumatoid arthritis, abatacept was clarified.

研究分野：免疫学

キーワード：制御性T細胞 B細胞 抑制性サイトカイン TGF- β 3

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患において、自己抗体は、標的抗原へ結合し免疫複合体を形成することで重要臓器を障害する。研究代表者らは、制御性T細胞 (regulatory T cells : Treg) と抑制性サイトカインTGF-β3による自己抗体産生B細胞を制御が、自己免疫疾患の治療につながる可能性を考えて研究を進めている。

研究代表者らは、マウスCD4陽性CD25陰性LAG3陽性制御性T細胞 (LAG3⁺ Treg) を同定した (PNAS. 2009;94:5744)。本細胞はアナジー関連転写因子 Egr-2 (Nat Immunol. 2005;6:472) を特異的に発現し、CD4類似分子LAG3を表面マーカーとする。LAG3⁺ Tregは濾胞性ヘルパーT細胞と濾胞中心性B細胞の形成を抑制する。また、LAG3⁺ TregはサイトカインTGF-β3を大量に産生し、B細胞の抗体産生を強力に抑制する。

LAG3⁺ Treg の産生する TGF-β3 が抗体産生抑制能を発揮する理由として、産生される TGF-β3 が大量であることや、高濃度の IL-10 が同時に産生されることが想定されるが、詳細は不明である。LAG3⁺ Treg を自己免疫疾患の治療に臨床応用するためには TGF-β3 詳細な作用機序の解明が必要と考えられる。

研究代表者らは、ヒトLAG3⁺ Tregをヒト扁桃や末梢血中に同定した。本細胞が、マウスと同様にTGF-β3を介してB細胞機能を抑制し、自己免疫疾患を制御する可能性が推測された。しかし、ヒトにおけるTGF-β3の免疫に関する報告は殆どみられない。

TGF-βによるヒトB細胞抑制の作用メカニズムの検討は、悪性リンパ腫由来の細胞株を使用したものがほとんどであり、初代培養のヒトB細胞を用いた検討は少ない。しかし、がん化の過程で、細胞のTGF-βへの反応性が変化することは多いことを考え、初代培養のB細胞を用いた研究が、正常な免疫系におけるTGF-βの影響を解明する上で不可欠である。

2. 研究の目的

研究代表者らが同定した LAG3⁺ Treg は、マウスにおいて抑制性サイトカイン TGF-β3 を特異的に産生し、B細胞の抗体産生を抑制する。研究代表者らはヒト LAG3⁺ Treg も末梢血・扁桃で同定し、ヒト LAG3⁺ Treg は TGF-β3 を高発現しており、ヒト TGF-β3 は B細胞の抗体産生能を抑制していた。これらより、ヒト LAG3⁺ Treg は B細胞の抗体産生を抑制することで自己免疫疾患を制御し、その作用機序として TGF-β3 が重要な役割を担う可能性が示唆された。

本研究では、ヒトにおける TGF-β3 の B細胞に対する作用機序を解明し、TGF-β3 とヒト LAG3⁺ Treg との関連を評価し、その知見より治療戦略の基盤を構築することを目的とする。また、ヒト LAG3⁺ Treg と自己免疫疾患との関連も解析する。そして、扁桃腺と末梢血から同定されたヒト LAG3⁺ Treg の、B細胞抑制機能について、作用機序を

含めた詳細を検討する。

3. 研究の方法

- 1) TGF-β3 のヒト B細胞抗体産生抑制・増殖抑制について、CpG 刺激・BCR 刺激・CD40L 刺激による、分裂・抗体産生への効果を解析する。
- 2) BCR シグナル・TLR シグナル下流や Smad・STAT などどの部分が抑制されているかを細胞内染色と Western blotting を用いて蛋白レベルで抑制されるシグナルを検証する。
- 3) TGF-β3 のヒト B細胞に対する作用機序を、RNA-sequencing を用いて明らかにする。
- 4) ヒト LAG3⁺ Treg の抗体産生抑制能について、ヒト扁桃由来細胞・ヒト末梢血由来細胞を用いて作用機序解析を行う。
- 5) ヒトLAG3⁺ Tregの量的・質的差異を、健康人と関節リウマチとの間で、もしくは同一患者内での生物学的製剤使用前後で、試験管内・生体内で比較検討する。

4. 研究成果

研究代表者らは、初代培養のヒト B細胞を用いてヒト B細胞に対する TGF-β3 の作用機序の解明を行った。IL-21 と可溶性 CD40 リガンド (sCD40L) 刺激下において、TGF-β3 は、ヒト B細胞の IgG、IgA、IgM の産生を抑制し、ヒト B細胞の細胞死を誘導し、CD38^{high} 形質芽細胞への分化および増殖を抑制していた。RNA-Sequencing (RNA-Seq) によるトランスクリプトーム解析では、TGF-β1、β3 ともヒト B細胞に与える影響は類似していた。TGF-β3 は、抗体産生細胞への分化に重要である IRF4 の発現を抑制し、Blimp-1、XBP1 といった、抗体産生細胞への分化を担う遺伝子発現も抑制し、Syk のリン酸化を抑制していた。本研究の成果は、第43回日本臨床免疫学会で学会発表され、また PLoS One 誌に論文発表された (Tsuchida Y, et al. PLoS One. 2017;12(1):e0169646)。

研究代表者らは、ヒト扁桃の LAG3⁺ Treg を同定し、機能解析を行った。ヒト扁桃の LAG3⁺ Treg は Foxp3⁺ CD25⁺ Treg と異なる新規細胞分画であり、扁桃腺の B/T area 双方に局在し、IL-10・IFN-γ を高産生していた。扁桃 LAG3⁺ Treg は B細胞のアポトーシスを誘導し、抗体産生抑制能を有し、PD-L1 が作用している可能性が示唆された。本研究の成果は、Journal of Autoimmunity 誌に論文発表された (Sumitomo S, et al. J Autoimmun. 2017;76:75-84)。

研究代表者らは、ヒト末梢血における LAG3⁺ Treg も解析した。ヒト LAG3⁺ Treg は、疾患活動性の高い関節リウマチ患者の末梢血において、健康人と比較して有意に減少していることが明らかとなった。また、同一患者内での生物学的製剤 (Abatacept) 使用前後で、LAG3⁺ Treg 有意に増加することが

明らかとなった。また、共分子阻害薬である Abatacept 存在下で Naive T 細胞を刺激することによって、LAG3⁺ Treg 様細胞が誘導されることが試験管内実験で明らかとなった。本研究の成果は、第 59 回日本リウマチ学会総会・学術集会以学会発表され、また Arthritis Research & Therapy 誌に論文発表された(Nakachi S, et al. *Arthritis Res Ther.* 2017;19:97)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- 1) 著者名 : Nakachi S, Sumitomo S, Tsuchida Y, Tsuchiya H, Kono M, Kato R, Sakurai K, Hanata N, Nagafuchi Y, Tateishi S, Kanda H, Okamura T, Yamamoto K, Fujio K. 論文標題 : Abatacept facilitates differentiation of IL-10-producing-LAG3⁺ regulatory CD4⁺ T cells with antibody suppression effect. 雑誌名 : Arthritis Research & Therapy, 査読有、19 巻、2017 年、97 ページ、DOI : 10.1186/s13075-017-1309-x.
- 2) 著者名 : Tsuchida Y, Sumitomo S, Ishigaki K, Suzuki A, Kochi Y, Okamura T, Yamamoto K, Fujio K. 論文標題 : Transforming Growth Factor- β 3 Inhibits Antibody Production by Human B Cells. 雑誌名 : PLoS One, 査読有、12 巻、2017 年、e0169646 ページ DOI : 10.1371/journal.pone.0169646.
- 3) 著者名 : Sumitomo S, Nakachi S, Okamura T, Tsuchida Y, Kato R, Shoda H, Furukawa A, Kitahara N, Kondo K, Yamasoba T, Yamamoto K, Fujio K. 論文標題 : Identification of tonsillar CD4⁺CD25⁺LAG3⁺ T cells as naturally occurring IL-10-producing regulatory T cells in human lymphoid tissue. 雑誌名 : Journal of Autoimmunity, 査読有、76 巻、2017 年、75-84 ページ DOI : 10.1016/j.jaut.2016.09.005.
- 4) 著者名 : Morita K, Okamura T, Sumitomo S, Iwasaki Y, Fujio K, Yamamoto K. 論文標題 : Emerging roles of Egr2 and Egr3 in the control of systemic autoimmunity. 雑誌名 : Rheumatology (Oxford), 査読有、55(suppl2)巻、2016 年、ii76-81 ページ DOI : 10.1093/rheumatology/kew342
- 5) 著者名 : Morita K, Okamura T, Inoue M, Komai T, Iwasaki Y, Sumitomo S, Shoda H, Yamamoto K, Fujio K. 論文標題 : Egr2 and Egr3 in regulatory T cells cooperatively control systemic autoimmunity through Ltbp3-mediated TGF- β 3 production.

雑誌名 : Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 査読有、113 巻、2016 年、E8131-E8140 ページ

DOI : 10.1073/pnas.1611286114

- 6) 著者名 : Fujio K, Okamura T, Sumitomo S, Yamamoto K. 論文標題 : Therapeutic potential of regulatory cytokines that target B cells. 雑誌名 : International Immunology, 査読有、28 巻、2016 年、189-95 ページ DOI : 10.1093/intimm/dxv069.
- 7) 著者名 : Okamura T, Sumitomo S, Morita K, Iwasaki Y, Inoue M, Nakachi S, Komai T, Shoda H, Miyazaki Jun-ichi, Fujio K, Yamamoto K. 論文標題 : TGF- β 3-expressing CD4⁺ CD25⁺LAG3⁺ regulatory T cells control humoral immune responses. 雑誌名 : Nature Communications 査読有、6 巻、2015 年、6329 ページ DOI : 10.1038/ncomms7329.

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1) 発表者名 : 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、発表標題 : TGF- β 3 および IL-10 による協調性液性免疫制御機構の解明、学会名 : 第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会、発表年月日 : 2016 年 4 月 21 日、発表場所 : パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- 2) 発表者名 : 土田 優美、住友 秀次、石垣 和慶、井上 眞璃子、鈴木 亜香里、森田 薫、駒井 俊彦、高地 雄太、岡村 僚久、藤尾 圭志、山本 一彦、発表標題 : TGF β 3 のヒト B 細胞への影響の検討、学会名 : 第 43 回日本臨床免疫学会、発表年月日 : 2015 年 10 月 23 日、発表場所 : 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)
- 3) 発表者名 : 仲地 真一郎、住友 秀次、土田 優美、加藤 里佳、櫻井 恵一、花田 徳大、土屋 遙香、永淵 泰雄、庄田 宏文、石垣 和慶、山口 健介、岡村 僚久、藤尾 圭志、山本 一彦、発表標題 : The regulatory function of the CD4⁺CD25⁺LAG3⁺ T cells in vitro and the characteristics in patients with rheumatoid arthritis in the presence of Abatacept. 学会名 : 第 59 回日本リウマチ学会総会・学術集会、発表年月日 : 2015 年 4 月 25 日、発表場所 : 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

〔その他〕

ホームページ等

東京大学医学部附属病院 アレルギー・リウマチ内科 第 18 研究室 :

<http://plaza.umin.ac.jp/areri18/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

氏名：住友 秀次 (SUMITOMO Shuji)

所属研究機関名：東京大学

部局：医学部附属病院

職名：助教

研究者番号：20392996

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者

氏名：土田 優美 (TSUCHIDA Yumi)

氏名：仲地 真一郎 (NAKACHI Shinichiro)

氏名：加藤 里佳 (KATO Rika)