

平成 29 年 5 月 2 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：15K19568

研究課題名(和文) CD4陽性T細胞におけるTGF-beta3産生の意義と誘導機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism and significance of TGF-beta3 production in CD4+ T cells

研究代表者

岩崎 由希子 (IWASAKI, YUKIKO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30592935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：末梢で誘導されるLAG3+Tregは、その免疫抑制能にTGF-beta3が重要であることが報告されている。申請者らは、IL-27が、マウスナイーブCD4陽性細胞に、TGF-beta3を誘導し免疫抑制能を付与することを報告していた。IL-27はp28とEbi3のヘテロダイマーで、p28、Ebi3はそれぞれ単独の作用を持つことが示唆されている。興味深いことに、IL-27+IL-6+p28+Ebi3の組み合わせでTGF-beta3のmRNA産生が最も強力に誘導されることが見出され、p28、Ebi3欠損マウスではLAG3+TregにおけるTGF-beta3 mRNA発現が著明に抑制されていた。

研究成果の概要(英文)：LAG3+ Treg, a peripherally-inducible Treg, is reported to show suppressive function through production of TGF-beta3. We have reported that IL-27 can induce TGF-beta3 on mouse naive CD4+ T cell, being endowed with suppressive function. IL-27 consists of p28 and Ebi3, each of which is suggested to have its own function. Interestingly, IL-27+IL-6+p28+Ebi3 combination was the strongest stimuli to induce TGF-beta3 mRNA expression. Moreover, TGF-beta3 mRNA expression was deeply suppressed in p28 or Ebi3 deficient LAG3+ Treg.

研究分野：膠原病

キーワード：制御性T細胞 TGF-beta3 IL-27 IL-6 p28 Ebi3

1. 研究開始当初の背景

様々な自己免疫疾患の病態には、自身の構成成分に対する抗体、すなわち自己抗体が関わっていると考えられている。全身性エリテマトーデス(以下 SLE(Systemic Lupus Erythematosus))は、代表的な自己免疫疾患の一つで、主に核抗原に対する自己抗体により多臓器に亘り炎症をもたらす難病であるが、その疾患活動性の指標として、二重鎖DNA に対する血清中の自己抗体の量が有用であることが知られている。細胞レベルで特に自己免疫寛容の維持の要となっているものは制御性(regulatory) T 細胞(以下 Treg)である。Treg の中で主要なものは CD4 陽性 CD25 陽性の表現型をもち、転写因子 Foxp3 の発現によりその免疫制御能が特徴づけられる所謂 Foxp3 陽性 Treg(別呼称 nTreg)である。近年さらに、CD4 陽性 CD25 陽性 CXCR5 陽性濾胞性制御性 T 細胞(T_{FR})や CD4 陽性 CD25 陽性 CD69 陰性 T 細胞が、抗体産生抑制能をもつことも報告された。一方で、Foxp3 により規定されない未知の制御性 T 細胞の存在可能性が報告され(Proc Natl Acad Sci USA.41:14735-14740,2005) また、SLE における CD25 陽性 Treg の役割については、未だ確立されてはいない(J Formos Med Assoc. 111:465-470,2012)。Foxp3 により規定されない制御性 T 細胞は、抗原特異的に末梢で誘導される Foxp3 陰性誘導性(inducible)Treg として解析されている。当研究室では、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 Egr2 陽性新規制御性 T 細胞(以下 LAG3⁺ Treg と表記)を同定しており(Proc Natl Acad Sci USA. 106:13974-13979,2009)、マウス腸炎モデルを IL-10 依存性に LAG3⁺ Treg が抑制することを明らかとした。申請者らは研究開始当初、SLE 疾患モデルマウスである MRL/lpr マウスに、lpr 遺伝子変異を有さない MRL/+ LAG3⁺ Treg を移入することで、抗二重鎖 DNA 抗体産生および腎炎の進行を抑制することを見出していた。更に、その抗体産生抑制には、サイトカイン transforming growth factor-β3 (TGF-β3)が重要であること、および TGF-β3 産生は Egr2 依存性であることを見出していた。2012 年には TGF-β3 が T_H17 細胞から産生されること、TGF-β1 よりも TGF-β3 がより病原性の高い T_H17 を誘導することが報告され、TGF-β3 が炎症惹起性のサイトカインであることが示唆された(Nat Immunol.13:991-999,2012) ていたが、申請者らの知見は TGF-β3 が免疫応答の抑制に関与することを初めて明確にしたものであった。

この TGF-β3 を高産生する LAG3⁺ Treg の誘導機構の解明は、LAG3⁺ Treg および TGF-β3 を用いた生理的な治療法の開発につながることを期待される。申請者は抑制性サイトカイン IL-27 によりマウスナイーブ CD4 陽性 T 細胞に IL-10 産生が誘導される過程で、転写因子 Egr2 および転写制御因子 Blimp-1

を介した新たな誘導系を見出し報告した(Eur.J.Immunol. 43:1063-1073,2013)。同時に、IL-27 により LAG3 陽性 Egr2 陽性の LAG3⁺ Treg 様の T 細胞が誘導されてくことも報告し、続く検討の中で、IL-27 により刺激した T 細胞を B 細胞と共培養した際に、B 細胞活性化が抑制されること、更に IL-27 により STAT3 依存性に TGF-β3 産生が誘導されることを見出した。一方で、炎症性サイトカイン IL-6 によっても、Egr2 発現および TGF-β3 産生が誘導されることも同時に見出しており、より効率的かつ抑制能をもった TGF-β3 を誘導する機構についての解明が望まれた。

2. 研究の目的

最近申請者らは T 細胞による B 細胞の抗体産生抑制に、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 Egr2 陽性新規制御性 T 細胞及び抑制性サイトカイン TGF-β3 が重要であることを明らかにした。更に申請者は IL-27 刺激によりマウスナイーブ CD4 陽性 T 細胞に TGF-β3 の発現が誘導されることを見出していた。本研究は、T 細胞における TGF-β3 誘導機構の解析を進め、ヒトの自己免疫疾患、特に SLE の病態解明に繋がる研究基盤の確立を目的とする。

< 具体的な目的 >

- (1) マウスナイーブ CD4 陽性 T 細胞に TGF-β3 産生をより効率的に誘導するサイトカインについて、IL-27 にとどまらず IL-27 の構成分子である p28 や Ebi3 を中心に検討を行う。
 - (2) IL-27 と IL-6 による TGF-β3 誘導の差異の検討を行う。
- これらの解析により、CD4 陽性 T 細胞における TGF-β3 誘導機構を解明し、その意義を明らかにする。抑制性サイトカインの理解により、今後の自己免疫疾患制御につながる基盤の構築を試みることを目的とする。

3. 研究の方法

マウスナイーブ CD4 陽性 T 細胞に Egr2、TGF-β3 を誘導し免疫抑制能を付与するサイトカイン刺激条件の網羅的検討を行う。

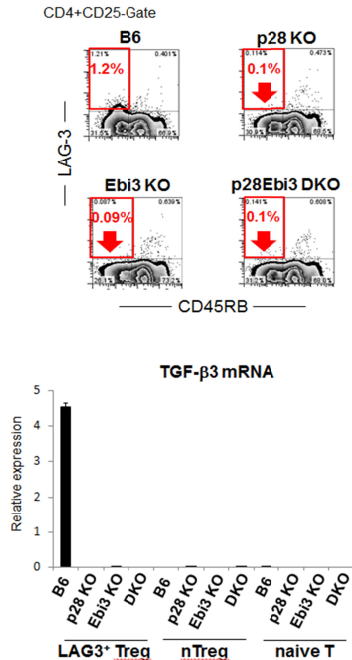
- (1) p28、Ebi3 を中心とした、gp130 シグナルサイトカインの組み合わせによる Egr2、TGF-β3 誘導条件検討: C57BL/6 マウス(以下 B6 マウス)脾臓より、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞をセルソーターにより回収し、p28 単独、Ebi3 単独、IL-27 単独、IL-6 単独、p28 + Ebi3、p28 + IL-27、Ebi3 + IL-27、p28 + Ebi3 + IL-27、p28 + IL-6、Ebi3 + IL-6、p28 + Ebi3 + IL-6 といった組み合わせにより、Egr2、TGF-β3 の発現について、まずは mRNA の発現を定量的 RT-PCR 法により確認する。TGF-β3 については、細胞培養上清を用いて ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)を行い、タンパクレベルでの発現を検討する。

- (2) IL-27 ないし IL-6 で誘導された Egr2、TGF-β3 発現 CD4 陽性 T 細胞における免疫抑制活性の検討: 誘導された CD4 陽性 T 細胞が抗

体産生抑制活性をもつかについて検討する。具体的には、*in vitro*において、B6 マウス由来のB 細胞と、誘導されたT 細胞を、抗IgM 抗体によるB 細胞刺激下に共培養し、B細胞の細胞分裂抑制能について、比較検討する。

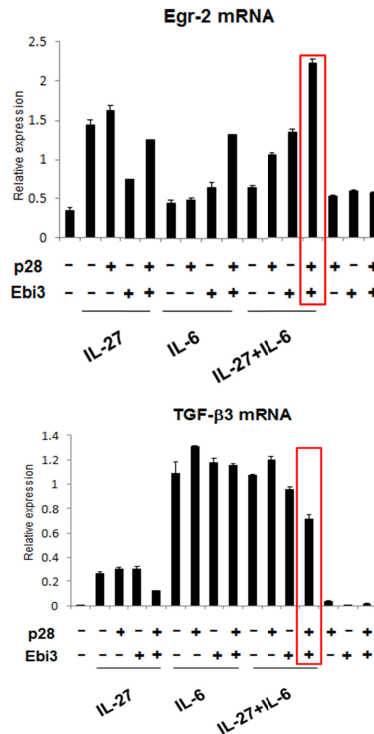
4. 研究成果

(1)p28, Ebi3 が LAG3⁺ Treg の誘導に重要であるかについて、各々の欠損マウスの脾臓の解析により検証した。



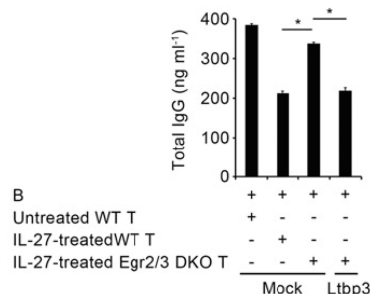
上図の如く、p28, Ebi3 単独欠損および double knockout (以下 DKO) マウスにおいて、LAG3⁺ Treg の存在比が有意に低下していることが示された。このことより gp130 を介した経路が LAG3⁺ Treg の誘導に重要であることが示唆された。制御性 T 細胞である LAG3⁺ Treg が低下するにも関わらず、これらのマウスは aging においても自己免疫疾患様の病態を呈しない。申請者は、steady state および抗原 NP-OVA で免疫を行った各マウスの脾臓の解析を行い、germinal center B cell (GCB) および follicular helper T cell (T_{FH}) の存在比が、p28, Ebi3 単独欠損および DKO マウスで低下傾向にあることを確認した。また、抗原特異的な IgG 産生については、これらのマウスで野生型とマウスと比較し産生量に増減を認めなかった。以上より p28 や Ebi3 は、LAG3⁺ Treg 分化以外に T_{FH} 細胞分化にも影響を与えることにより、個体としては自己免疫疾患を発症しないことが考えられた。更に各マウスより LAG3⁺ Treg, nTreg, およびナイーブ CD4 陽性 T cell (naive T と図内で表記) を分取し、TGF-β3 の mRNA を確認したところ、p28, Ebi3 欠損で LAG3⁺ Treg の TGF-β3 産生が著明に低下することが明らかになった。

(2)gp130 刺激サイトカインのコンビネーションによる Egr2, TGF-β3 の誘導能の検討

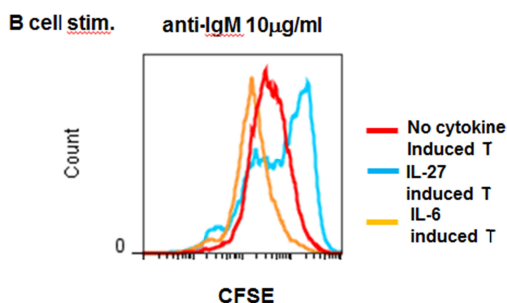


IL-27, IL-6, p28, Ebi3 の種々のコンビネーションでマウスナイーブ CD4 陽性 T 細胞を TCR 刺激下で刺激を行った。上図の如く Egr2, TGF-β3 双方の mRNA 発現を強く誘導する刺激として IL-27+IL-6+p28+Ebi3 が候補として考えられた。

しかしながら興味深いことに、刺激上清を用いた ELISA にて TGF-β3 のタンパクレベルの発現を確認したところ、IL-27+IL-6+p28+Ebi3 では著明に抑制されており、IL-6 単独ないし、IL-6+p28+Ebi3 のコンビネーションで最も高い TGF-β3 タンパク発現を認めた。申請者は、TGF-β3 タンパクの細胞質外への分泌には Egr2 依存性に誘導される Ltp3 の結合が重要であることを下記論文①にて報告しており、IL-27 刺激 CD4 陽性 T 細胞において、TGF-β3 を介した B 細胞に対する抗体産生抑制能は、Egr2 欠損により解除されるが、Ltp3 の遺伝子導入により回復することを示している(下図)。従って IL-27+IL-6+p28+Ebi3 による TGF-β3 mRNA の強い誘導があるものの、ネガティブフィードバックなど何らかのメカニズムで Ltp3 の発現抑制がかかることにより分泌が阻害されている可能性が考えられた。[〔雑誌論文〕①より引用]



(3) IL-27 および IL-6 刺激を受けた CD4 陽性 T 細胞の抑制能の比較

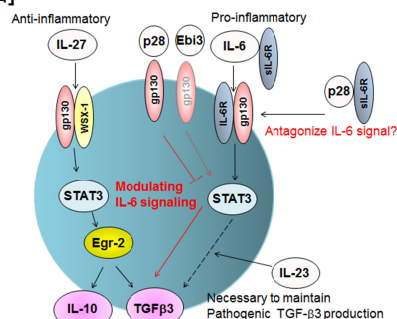


IL-6 による TGF- β 3 のタンパクレベルの発現が強く認められたことから、IL-27, IL-6 それぞれにより誘導されたマウスナイーブ CD4 陽性 T 細胞の B 細胞の増殖抑制能について検討した。IL-27 により誘導された CD4 陽性 T 細胞は B 細胞の増殖を有意に抑制したが、IL-6 により誘導された CD4 陽性には同様の抑制活性はなく、寧ろ増殖を促進する方向で作用した。

本研究を通じて申請者は、マウスナイーブ CD4 陽性 T 細胞に TGF- β 3 のタンパクレベルの発現を強く誘導する刺激は IL-6 ないし IL-6 と p28+Ebi3 のコンビネーションであり、mRNA 誘導を強く起こす刺激の組み合わせとの乖離があることを明らかにした。一方で、TGF- β 3 の高産生のみが B 細胞の増殖抑制に必須ではなく、IL-6 により誘導された T 細胞はむしろ B 細胞の増殖に働くことが示唆された。

TGF- β 3 の産生は、分泌における Ltbp3 による制御の他、下図のように、抑制性サイトカイン IL-27 と炎症性サイトカイン IL-6 と、p28、Ebi3 刺激とが細胞内シグナル伝達物質 STAT3 などの活性調節を介して、最終的に pathogenic か anti-inflammatory なのかの方向性を決めて、もたらされていると想定され、それぞれの微妙なサイトカインバランスが LAG3⁺ Treg の分化・機能の方向性も決めていることが考えられる。今後はこれらの制御メカニズムをさらに細かく解析することにより、自己免疫疾患の新たな治療戦略へ繋がる研究に発展することが期待される。

[IL-27 と IL-6 による TGF- β 3 産生制御機構の概念図]



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 1件)

① Morita K., Okamura T., Sumitomo S., Iwasaki Y., Fujio K., Yamamoto K.: Egr2 and Egr3 in regulatory T cells cooperatively control systemic autoimmunity through Ltbp3-mediated TGF- β 3 production. *Proc Natl Acad Sci USA*. 13. E8131 (2016) (査読あり)

② Morita K., Okamura T., Sumitomo S., Iwasaki Y., Fujio K., Yamamoto K.: Emerging roles of Egr2 and Egr3 in the control of systemic autoimmunity. *Rheumatology*. 55. ii76 (2016) (査読あり)

[学会発表](計 1件)

第 61 回日本リウマチ学会、2017 年 4 月 22 日 福岡国際会議場

[W82-4] CD4⁺CD25⁺LAG3⁺制御性 T 細胞による液性免疫制御機構における転写因子 Egr2/Egr3 の役割

森田薫、岡村僚久、井上眞璃子、駒井俊彦、照屋周造、岩崎由希子、住友秀次、庄田宏文、山本一彦、藤尾圭志

[図書](計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 由希子 (Iwasaki Yukiko)

東京大学医学部附属病院アレルギーリウマチ内科・助教

研究者番号： 30592935

(4) 研究協力者

照屋 周造 (Teruya Shuzo)

東京大学医学部附属病院アレルギーリウマチ内科・大学院生