

令和元年5月27日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05177

研究課題名(和文) 日本発の安全で有効な免疫抑制療法 発癌や重篤感染を誘因しない制御性T細胞療法の研究

研究課題名(英文) Research on regulatory T cell-therapy without inducing cancer and severe infections-the safe and effective immunosuppression from Japan

研究代表者

山崎 小百合 (Yamazaki, Sayuri)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70567255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは、樹状細胞による抗原提示で制御性T細胞が抗原特異的に増殖できること、樹状細胞で増えた制御性T細胞が自己免疫や移植片拒絶のみを特異的に抑制できる事、をマウスの系で見出した。本研究では、これらの成果に基づき、自己免疫などの好ましくない免疫反応のみを抑える制御性T細胞療法を目指して実験を遂行した。マウス、および、ヒトの樹状細胞も用いて、制御性T細胞の抗原特異性のコントロールを行う研究を推進した。その結果、制御性T細胞を特異的に増殖誘導する樹状細胞のサブセットを見出し、遺伝子発現解析にも成功するなどの成果をあげることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、制御性T細胞を特異的に増殖誘導する樹状細胞のサブセットを見出し、遺伝子発現解析にも成功するなどの成果をあげることができた。これらの成果は、3つの国際学会で口演に選出され、学術的にも注目されている。重篤感染症や発癌の誘因とならない安全な免疫抑制療法の開発が、増加する自己免疫疾患、移植、アレルギーの治療に世界的に求められている。本研究の成果を今後さらに発展させることで、将来、日本発の安全で有効な制御性T細胞療法の開発に貢献も期待され、社会的にも意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：We showed that antigen presentation by dendritic cells expand antigen-specific regulatory T cells and that dendritic cell-expanded regulatory T cells suppress autoimmunity and graft-versus host disease in a specific way using mice. Based on these our former reports, we performed experiments to control antigen specificity of regulatory T cells using murine and human dendritic cells. In this project in the past three years, we were able to report several findings including a dendritic subset to expand regulatory T cells specifically and its gene expressions.

研究分野：免疫学

キーワード：制御性T細胞 樹状細胞 抗原特異性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、樹状細胞により増殖する制御性 T 細胞を利用することで、全身の免疫を抑制せずに生体にとって好ましくない免疫反応のみを抑制できる事を示した。アナジーで増殖しない制御性 T 細胞は、樹状細胞による抗原提示で増殖する (Yamazaki S et al. *J Exp Med*)。樹状細胞の抗原提示で増殖した制御性 T 細胞はマウスの 1 型糖尿病や graft versus host disease (GVHD) を抗原特異的に抑制した (Tarbell K, Yamazaki S et al. *J Exp Med* 2004; Yamazaki S et al. *PNAS* 2006)。末梢の CD4<sup>+</sup> T 細胞から制御性 T 細胞を誘導する際にも樹状細胞が最も重要な抗原提示細胞であった (Yamazaki S\* et al. *Blood* 2007; Yamazaki S\* et al. *J Immunol* 2008; Yamazaki S\* et al. *PLoSOne* 2012 \*Corresponding author)。本研究では、これまでの基礎的研究成果を臨床応用するために、ヒトの樹状細胞と制御性 T 細胞も使用し、自己免疫反応や移植片拒絶、アレルギーを特異的に抑制する治療法を開発を目指し、その基盤となる基礎研究を行う。本研究にて、発癌や重篤感染症を誘因しない制御性 T 細胞療法-日本発の新しい安全で有効な特異的免疫抑制法-が可能となる。

### 2. 研究の目的

自己免疫反応や移植片拒絶、アレルギーなどの治療にも制御性 T 細胞の抑制を利用した治療が世界中で開発されている。しかし、解決されていない大きな問題が存在する。それは全身的な免疫抑制“発癌と重篤感染症の合併”のリスクである。これは現在使用されている免疫抑制剤一般に全て共通の問題である。発癌と重篤感染症の合併のリスクを避けた特異的な免疫抑制法は世界において未だに開発されていない。制御性 T 細胞は、様々な免疫反応を抑制する重要な細胞である。上述のように、アナジーで増えない制御性 T 細胞が「樹状細胞により増える」事、を私たちは世界に先駆けて発見した。さらに、樹状細胞で増えた制御性 T 細胞が「自己免疫や移植片拒絶のみを特異的に抑制できる」事も見出した。本研究では、これらの成果に基づき、自己免疫などの好ましくない免疫反応のみを抑える制御性 T 細胞療法の開発を目指す。将来の臨床応用を目指し、ヒトの樹状細胞も用いて制御性 T 細胞の抗原特異性の誘導などの研究を行う。本研究で日本発の安全で有効な制御性 T 細胞療法の開発に貢献する。

### 3. 研究の方法

これまでの研究成果の臨床応用のため、癌や感染症に対する免疫を保ちつつ、生体にとって好ましくない免疫反応を特異的に抑制する事を目指し、本研究にて、自己免疫疾患、移植片拒絶、アレルギーの新しい特異的な治療に貢献する。すでに、上述のようにマウスの系で樹状細胞による抗原提示で抗原特異的制御性 T 細胞が誘導できる事を示した。この系に基づき、ヒトにおける実験系をセットアップし、樹状細胞を使用し、抗原特異的制御性 T 細胞の増殖誘導の下記を行い、樹状細胞によるヒト抗原特異的制御性 T 細胞の試験管内誘導系の確立、誘導されたヒト制御性 T 細胞の試験管内抑制機能の測定、などを行った。腫瘍抗原特異的制御性 T 細胞の解析も頭頸部癌のサンプルで行った。樹状細胞はヒトの末梢血液から単核球を分離し、樹状細胞を採取する方法、単核球から GM-CSF+IL-4 で樹状細胞を誘導する方法などを用いた。制御性 T 細胞は、live dead, CD45RA, CD127, CD25 と Foxp3 の染色でフローサイトメーターで発現解析を行った。さらにマウスの系で、皮膚制御性 T 細胞の研究も行った。皮膚には多くの樹状細胞サブセットが存在し、各サブセットごとに得意とする機能をもっている。皮膚における制御性 T 細胞と樹状細胞の相互関係を解析し、皮膚の制御性 T 細胞の誘導に秀でた樹状細胞サブセットを同定した。

### 4. 研究成果

皮膚の制御性 T 細胞の誘導に秀でた樹状細胞サブセットをマウスで同定するため、皮膚で制御性 T 細胞が CD4<sup>+</sup> T 細胞の約 60% にも増殖する系である紫外線照射を利用した。紫外線照射をした皮膚より、Langerin-DTR マウスを利用し、Langerin, CD11c の発現にて皮膚の樹状細胞サ

ブセットを分取し、制御性T細胞の増殖誘導活性を検討した。その結果、Langerin-CD11c+CD11b陽性の皮膚樹状細胞サブセットに、特異的に制御性T細胞を増殖誘導できる活性があることを見出した。Langerin-CD11c+CD11b陽性の皮膚樹状細胞サブセットのRNAシーケンスによる遺伝子発現解析と機能解析を行った。その結果、免疫寛容に重要なPDL1などの遺伝子群が高発現していることを見出した。これらの成果をJ Immunologyに報告することができた (Yamazaki S et al, J Immunol 2018)。

ヒトの樹状細胞を末梢血液のCD14+単核球よりGM-CSF + IL4で誘導し、T細胞と培養して白血球混合反応を行い、アロ抗原特異的制御性T細胞の増殖誘導能を検討した。CFSEラベルした制御性T細胞が増殖することを確認できた。抗原特異的な抑制機能など、試験管内抑制試験を用いてTCRレパトア解析、制御性T細胞特異的なエピゲノム解析、マウスも用いた生体内の抑制試験も検討中である。さらに、ヒトの頭頸部癌のサンプルを利用し、腫瘍抗原に反応して増殖浸潤する制御性T細胞の解析も行った。頭頸部癌の腫瘍環境では、制御性T細胞が細胞表面にCTLA-4を高発現していることを見出すことができた。ヒト頭頸部癌は解剖学的に複雑な場所に発生する関係で病理診断に影響を与えずに大きいサンプルを実験のために入手することが困難であり、小さい検体から細胞を採取せざるをえず、細胞の数に限りがあった。しかし、頭頸部癌より採取した浸潤細胞より、細胞表面にCTLA-4を高発現している制御性T細胞と発現していない制御性T細胞をsortingで分取し、RNAシーケンスによる遺伝子発現解析に成功し、特徴的な遺伝子発現をInt J Cancerに報告することができた (Matoba, Yamazaki S et al, Int J Cancer 2019)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Ikumi K, Odanaka M, Shime H, Imai M, Osaga S, Taguchi O, Nishida E, Hemmi H, Kaisho T, Morita A, Yamazaki S\*. Hyperglycemia is associated with psoriatic inflammation in both humans and mice. *J Invest Dermatol* (査読有) 2019 Feb 15. pii: S0022-202X(19)30117-4. doi: 10.1016/j.jid.2019.01.029. **\*Corresponding author**

Matoba T, Imai M, Ohkura N, Kawakita D, Ijichi K, Toyama T, Morita A, Murakami S, Sakaguchi S, Yamazaki S\*. Regulatory T cells expressing abundant CTLA-4 on the cell surface with a proliferative gene profile are key features of human head and neck cancer. *Int J Cancer*. (査読有) 2019 Jun 1;144(11):2811-2822. doi: 10.1002/ijc.32024. **\*Corresponding author**

Loh JT, Lim TJF, Ikumi K, Matoba T, Janela B, Gunawan M, Toyama T, Bunjamin M, Ng LG, Poidinger M, Morita A, Ginhoux F, Yamazaki S, Lam KP, Su IH. Ezh2 Controls Skin Tolerance through Distinct Mechanisms in Different Subsets of Skin Dendritic Cells. *iScience*. (査読有) 2018 Dec 21;10:23-39. doi: 10.1016/j.isci.2018.11.019

Yamazaki S\*, Odanaka M, Nishioka A, Kasuya S, Shime H, Hemmi H, Imai M, Riethmacher D, Kaisho T, Ohkura N, Sakaguchi S, Morita A. Ultraviolet B Induced Maturation of CD11b-Type Langerin<sup>-</sup> Dendritic Cells Controls the Expansion of Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells in the Skin. *J Immunol*. (査読有) 2018 Jan 1;200(1):119-129. doi: 10.4049/jimmunol.1701056. **\*Corresponding author**

Kubo R, Muramatsu S, Sagawa Y, Saito C, Kasuya S, Nishioka A, Nishida E, Yamazaki S, Morita A. Bath-PUVA therapy improves impaired resting regulatory T cells and increases activated regulatory T cells in psoriasis. *J Dermatol Sci*. (査読有) 2017;86:46-53. doi: 10.1016/j.jdermsci.2017.01.001.

〔学会発表〕(計19件)

### 学会招待講演

山崎 小百合、紫外線で誘導される樹状細胞と制御性T細胞のクロストークによる免疫制御、第69回日本皮膚科学会中部支部学術大会招待特別講演、2018年

山崎 小百合、樹状細胞と制御性T細胞-二つのコントローラーによる免疫制御、日本樹状細胞研究会シンポジウム講演、2018年

山崎 小百合、専門医に必要な樹状細胞・T細胞の機能と皮膚免疫疾患の基礎知識、第116回日本皮膚科学会総会教育講演、2017年

#### 国際学会発表 シンポジウム口演発表選出

Yamazaki S, Odanaka M, Shime H, Imai M, Hemmi H, Kaisho T, Ohkura N, Sakaguchi S, Morita A. Skin dendritic cells expressing a unique set of genes associated with immunological tolerance are specialized to expand thymus-derived Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells upon ultraviolet B exposure. Japan-Singapore International Skin Conference 2019, 2019.

Yamazaki S, Odanaka M, Nishioka A, Kasuya S, Shime H, Hemmi H, Imai M, Riethmacher D, Kaisho T, Ohkura N, Sakaguchi S, Morita A. Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells are expanded by ultraviolet B-exposed PD-L1<sup>+</sup> skin dendritic cell expressing a unique set of genes in a CSF1-independent manner. International Investigative Dermatology, 2018.

Yamazaki S, Odanaka M, Nishioka A, Kasuya S, Shime H, Hemmi H, Imai M, Riethmacher D, Kaisho T, Ohkura N, Sakaguchi S, Morita A. The critical role of dendritic cell subset in expanding Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in the murine skin after ultraviolet B exposure. 15<sup>th</sup> International Workshop on Langerhans Cells. 2017.

#### 国内学会ワークショップ口演発表選出

的場拓磨、今井優樹、大倉永也、川北大介、伊地知圭、遠山竜也、森田明理、村上信五、坂口志文、山崎小百合、頭頸部癌における制御性T細胞の新たな特徴、第37回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2019年

Matoba T, Imai M, Ohkura N, Kawakita D, Ijichi K, Toyama T, Morita A, Murakami S, Sakaguchi S, Yamazaki S. A new feature of regulatory T cells in human head and neck cancer. 第47回日本免疫学会、2018年

Yamazaki S, Odanaka M, Nishioka A, Kasuya S, Shime H, Hemmi H, Imai M, Riethmacher D, Kaisho T, Ohkura N, Sakaguchi S, Morita A. Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells are expanded by ultraviolet B-exposed PD-L1<sup>+</sup> skin dendritic cell expressing a unique set of genes in a CSF1-independent manner. 第47回日本免疫学会、2018年

#### 国際学会ポスター発表

Yamazaki S, Odanaka M, Nishioka A, Kasuya S, Shime H, Hemmi H, Imai M, Riethmacher D, Kaisho T, Ohkura N, Sakaguchi S, Morita A. Dermal dendritic cells present neo-self antigens induced by ultraviolet B exposure to expand Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. 77th Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology, 2019

Ikumi K, Odanaka M, Shime H, Imai M, Taguchi O, Hemmi H, Kaisho T, Yamazaki S, Morita A. Successful treatment of psoriatic inflammation restores hyperglycemia. International Investigative Dermatology, 2018

Yamazaki S, Odanaka M, Nishioka A, Kasuya S, Imai M, Taguchi O, Morita A. Ultraviolet B Expands Skin-Homing Thymus-derived Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Regulatory T Cells. Cold Spring Harbor Conference Asia, 2016

Odanaka M, Yamazaki S, Nishioka A, Kasuya S, Taguchi O, Imai M, Morita A. Ultraviolet B exposure expands skin-homing receptor<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in the skin. Cold Spring Harbor Conference Asia, 2016

Kanno K, Imai M, Odanaka M, Nishioka A, Kasuya S, Nose M, Henmi H, Kaisho T, Morita A, Yamazaki S. Does Juzen-Taiho-To show therapeutic effect in Imiquimod-induced psoriatic mice? Cold Spring Harbor Conference Asia, 2016

Imai M, Odanaka M, Takayama S, Ohta R, Yamazaki S. The complement anaphylatoxin C5ades Arg still induce the acute inflammatory response. Cold Spring Harbor Conference Asia, 2016

Imai M, Odanaka M, Takayama S, Ohta R, Yamazaki S. The complement anaphylatoxin C5adesArg still induce the acute inflammatory response. The XXVI International Complement Workshop, 2016

#### 国内学会ポスター発表

Shime H, Matsumoto M, Yamazaki S, Seya T. The TLR3/TICAM-1 signal constitutively controls spontaneous polyposis through suppression of c-Myc in *Apc<sup>Min/+</sup>* mice. 第47回日本免疫学会、2018年

Odanaka M, Ikumi K, Shime H, Imai M, Taguchi O, Hemmi H, Kaisho T, Yamazaki S, Morita A. Hyperglycemia is associated with psoriatic inflammation in both humans and mice 第47回日本免疫学会、2018年

Kanno K, Odanaka M, Imai M, Nishioka A, Kasuya S, Nose M, Hemmi H, Kaisho T, Morita A, Yamazaki S. Does Juzen-Taiho-To have immunosuppressive effect? 第45回日本免疫学会学術集会、2016年

#### 〔図書〕（計5件）

山崎 小百合, 森田 明理、皮膚の樹状細胞と制御性T細胞のクロストークによる免疫制御、医学のあゆみ、2019年第268巻13号

志馬 寛明, 松本 美佐子, 山崎 小百合, 瀬谷 司、TLRアゴニストを用いた抗癌免疫アジュバント療法、Thrombosis Medicine、2018年第8巻2号

山崎 小百合、樹状細胞と制御性T細胞による免疫制御、NAGOYA MEDICAL JOURNAL、2017年第55巻第3号

山崎 小百合、加齢で増加する制御性T細胞と免疫制御、加齢皮膚医学セミナー、2016年Vol.11

山崎 小百合, 森田 明理、制御性T細胞の恒常性と皮膚、臨床皮膚科、「2.皮膚疾患の病態」、2016年第70巻第5号増刊号

#### 〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

#### 〔その他〕

##### ホームページ等

名古屋市立大学大学院医学研究科免疫学分野

<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/immunol.dir/index.html>

2019年5月 名古屋市立大学発行 創新vol.33にNagoya Immunology Network in NCUが記事として掲載された。

2019年3月11日 Nagoya Immunology Network in NCU 国際シンポジウムを主催し、開催した。

2017年11月～2018年1月 山崎小百合他 名古屋市立大学最新医学講座 オープンカレッジ「免疫の制御で病気を治す新時代～名古屋ゆかりの免疫学者が世界へ発信する研究と治療戦略について」（全8回）

2018年11月 文科省に名古屋市大の代表として1ヶ月間研究成果のポスター提示「夢の免疫抑制法」を行った。

2018年7月1日 新学術領域研究ネオ・セルフのニューズレター第2号に記事を掲載した。

2017年8月 免疫ふしぎ未来「お肌の健康と制御性T細胞」

#### 新聞（計4件）

2019年2月15日発行の科学新聞にNagoya Immunology Network in NCUが記事として掲載された。

2019年3月14日中日新聞にNagoya Immunology Network in NCUが記事として掲載された。  
2018年6月12日発行 中部経済新聞「免疫の制御を利用する」  
2017年5月号 名古屋市地域女性団体連絡協議会機関誌 女性なごや「免疫と病気」

#### 招待講演

S Yamazaki, Regulating immunity by dendritic cells and regulatory T cells. Invited Lecture, Dept. of Human Pathology, University of Messina, 2018

山崎 小百合、樹状細胞と制御性T細胞による免疫制御、岐阜大学特別講演、2017年

山崎 小百合、東京医科歯科大学学外教授の会特別講演、2016年

山崎 小百合、愛知医科大学 特別講演、2016年

#### 受賞

山崎 小百合、制御性T細胞による自己免疫性関節炎・膠原病の特異的治療の研究、公益財団法人日本リウマチ財団 平成28年度塩川美奈子・膠原病研究奨励賞

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：小田中 瑞夕

ローマ字氏名：ODANAKA, Mizuyu

所属研究機関名：名古屋市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：研究員

研究者番号(8桁)：00510281

研究分担者氏名：今井 優樹

ローマ字氏名：IMAI, Masaki

所属研究機関名：名古屋市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：講師

研究者番号(8桁)：30440936

研究分担者氏名：大倉 永也

ローマ字氏名：OHKURA, Naganari

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学(系)研究科(研究院)

職名：教授

研究者番号(8桁)：20300949

##### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：森田 明理

ローマ字氏名：MORITA, Akimichi

所属研究機関名：名古屋市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：30264732

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。