

令和元年8月29日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09918

研究課題名(和文) サイトカイン阻害性協調作用による自己抗体産生制御機構の解明

研究課題名(英文) Cytokine synergy-mediated control of humoral immune tolerance

研究代表者

岡村 僚久 (Okamura, Tomohisa)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：10528996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：当研究室で同定したCD4陽性CD25陰性LAG3陽性制御性T細胞(LAG3 Treg)は、TGF- $\beta$ 3およびIL-10を大量に産生し、かつ抗体産生の強力な抑制能を有するが、両サイトカインの協調的作用およびそのメカニズムは不明なままであった。本課題において申請者は、TGF- $\beta$ 3とIL-10が協調してB細胞におけるmTORC1制御を介し液性免疫抑制能を発揮することを明らかにした。本研究により自己免疫疾患におけるTGF- $\beta$ 3/IL-10を用いたサイトカインコンビネーションセラピーの展開の有用性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫抑制機構の中心的サイトカインはTGF- $\beta$ 3とIL-10が広く知られているが、共に免疫に対して促進性にも抑制性にも働くという側面があり、臨床応用への大きなハードルとなっている。当研究室で同定したLAG3 Tregは両サイトカインを大量に産生し、かつ抗体産生の強力な抑制能を有する。本研究では、両サイトカインが単独ではなく協調することで抑制能を発揮する「抑制性サイトカイン協調(inhibitory Cytokine Synergy: ICS)作用」の詳細なメカニズムを初めて明らかにした。本知見は、自己抗体産生機序を介した自己免疫疾患の新規治療法に繋がる可能性を内包している。

研究成果の概要(英文)：CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells produce a large amount of IL-10 and TGF- $\beta$ 3, and effectively suppress humoral immune responses. However, the mechanisms behind the inhibitory cytokine synergy mediated by IL-10 and TGF- $\beta$ 3 are unclear. In this study, we revealed that IL-10 and TGF- $\beta$ 3 synergistically regulate humoral immunity via modulating mTORC1 signaling in B cells. These findings indicate that the cytokine combination therapy with IL-10 and TGF- $\beta$ 3 might be an effective approach for the treatment of autoimmune diseases.

研究分野：制御性T細胞

キーワード：制御性T細胞 自己抗体 全身性エリテマトーデス TGF- $\beta$ 3 IL-10

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

### 1. 研究開始当初の背景

申請者は、T細胞刺激時のアナジー誘導に必須の転写因子 Egr2 に関連した抗原特異的免疫抑制能を有する CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性抑制性 T 細胞 (以下、LAG3 Treg) を同定した (PNAS 2009, 106:13974-9)。LAG3 Treg は抑制性サイトカイン IL-10 を高産生し T 細胞を抑制する。さらに、理化学研究所との共同研究にて Egr2 は、多彩な自己抗体産生を特徴とする難治性自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス (SLE) の感受性遺伝子の一つであることを同定し (Hum Mol Genet 19:2313-20, 2010)、LAG3 Treg が Egr2 および Egr3 依存性に TGF- $\beta$  3 産生を介して、自己抗体産生を抑制し、SLE モデルマウスの病態を改善することを報告している (Nature Communications 2015, 19; 6329)。このように LAG3 Treg は 2 つの抑制性サイトカインを高産生し、液性免疫を強力に制御することから、両サイトカインによる協調的抑制作用が免疫学的恒常性維持において重要であることが示唆されるが、両サイトカイン共に免疫に対して促進性にも抑制性にも働くという側面があり、臨床応用への大きなハードルとなっていた。

### 2. 研究の目的

代表的な炎症性自己免疫疾患である膠原病に共通しているのは、自己免疫寛容の破綻であり、自己反応性 B 細胞による自己成分に対する抗体産生を特徴とする。当研究室で同定した LAG3 Treg は TGF- $\beta$  3 および IL-10 を大量に産生し、かつ抗体産生の強力な抑制能を有するが (PNAS 2009, 106:13974-9、Nat Commun. 2015, 19; 6329)、両サイトカインの協調的作用およびそのメカニズムは不明なままであった。本課題において申請者は、TGF- $\beta$  と IL-10 の combination による自己抗体制御機構を解明し、自己免疫疾患の新規治療法開発に繋げることを目的とした。

### 3. 研究の方法

本課題は、LAG3 Treg による B 細胞制御機構に着想を得て、各種 TLR シグナル下における TGF- $\beta$  および IL-10 の「抑制性サイトカイン協調 (inhibitory Cytokine Synergy: ICS) 作用」による液性免疫制御システムを解明することを目的とし、以下の検討を行った。

(1) TGF- $\beta$  および IL-10 共存下 (ICS 条件) におけるシグナル伝達系の解析  
B 細胞における TGF- $\beta$  を介した Smad 系シグナルと、IL-10 を介した STAT3 シグナルの各伝達系の ICS 条件における協調的作用につき、NF- $\kappa$ B、I- $\kappa$ B、Akt などを Western blot 法を用いて検討すると同時に、各種シグナル伝達系阻害剤を用いた機能解析も行った。

(2) ICS 条件におけるオートファジーへの影響の検討  
ICS 条件におけるオートファジーを、オートファゴソームに特異的に局在する LC3 と GFP の融合タンパク質を CAG プロモーター制御によりほぼ全身の臓器で発現するトランスジェニックマウスの B 細胞を FACS を用いることで評価した。

(3) 生体内における獲得免疫系と自然免疫系に対する ICS 作用の検討  
マウスに pCAGGS Tgfb3 vector, pCAGGS IL10 vector をそれぞれ単独およびコンビネーションで投与し、NP-KLH/CFA 免疫下における濾胞 B 細胞、濾胞ヘルパー T 細胞分化、抗体産生につき評価を行った。また、自然免疫系においては、TLR7 agonist であるイミキモドの皮膚への塗布による SLE モデル実験系を用いて評価した。マウスは、野生型以外に T 細胞特異的 TGF- $\beta$  3 コンディショナルノックアウトマウスも使用した。

### 4. 研究成果

平成 28 年度は、Toll-like receptor (TLR) 刺激において TGF- $\beta$ 、IL-10 単独では抗体産生は促進されるが、両サイトカインの共存により抗体産生は完全に抑制されることを示し、解糖系や酸化リン酸化、アミノ酸代謝など代謝パスウェイに影響のある遺伝子群の抑制および、mTOR シグナル伝達系が、TGF- $\beta$  と IL-10 を共添加した LPS 刺激 B 細胞で特異的に抑制されていることを明らかにした。H29 年度は、NP-KLH/CFA 免疫下における TGF- $\beta$  と IL-10 の協調的な液性免疫制御能を検証した。さらに TLR7 agonist であるイミキモドの皮膚への塗布による SLE モデルマウスにおいても、TGF- $\beta$  と IL-10 は協調して自己抗体産生を著しく抑制するという知見を得た。最終年度である平成 30 年度は、T 細胞特異的 TGF- $\beta$  3 コンディショナルノックアウトマウスを用いた検討にて、生体内における液性免疫応答においても T 細胞の産生する TGF- $\beta$  3 が液性免疫制御機構において中心的役割を果たすことをフローサイトメトリーおよび遺伝子発現解析により確認した。さらに、ヒト B 細胞においても TGF- $\beta$  /IL-10 のサイトカインシナジー効果が存在することまで検証を行った。

上述の検討により、免疫制御において bifunctional な機能を有するサイトカインが協調することで強力な液性免疫制御能を発揮するという抑制性サイトカイン協調 (ICS) 作用のメカニズムを初めて明らかにした。本知見によりヒト自己免疫疾患に対する TGF- $\beta$  /IL-10 を用いたサイトカインコンビネーションセラピーの展開の有用性が示唆された。今後はヒト各種自己免疫疾患における ICS を介した免疫制御機構の破綻メカニズムにつきマルチオミックス解析も含めた検討を行い、創薬ターゲット探索を進める。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14 件)

1. Inoue M, Okamura T, Komai T, Yamamoto K, Fujio K. CD4+CD25 + LAG3+ regulatory T cells in humoral immunity. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 2019. 10 (suppl. 1), 1-8, Feb. doi: 10.1111/cen3.12498 査読有
2. Komai T, Okamura T, Inoue M, Yamamoto K, Fujio K. Reevaluation of Pluripotent Cytokine TGF- 3 in Immunity. *Int J Mol Sci.* 2018 Aug 1;19(8). pii: E2261. doi: 10.3390/ijms19082261. 査読有
3. Komai T, Inoue M, Okamura T, Morita K, Iwasaki Y, Sumitomo S, Shoda H, Yamamoto K, Fujio K. Transforming Growth Factor- and Interleukin-10 Synergistically Regulate Humoral Immunity via Modulating Metabolic Signals. *Front Immunol.* 2018 Jun 14;9:1364. doi: 10.3389/fimmu.2018.01364. eCollection 2018. 査読有
4. Teruya S, Okamura T, Komai T, Inoue M, Iwasaki Y, Sumitomo S, Shoda H, Yamamoto K, Fujio K. Egr2-independent, Klf1-mediated induction of PD-L1 in CD4+ T cells. *Sci Rep.* 2018 May 4;8(1):7021. doi: 10.1038/s41598-018-25302-1. 査読有
5. Okamura T, Yamamoto K, Fujio K. Early Growth Response Gene 2-Expressing CD4(+)/LAG3(+) Regulatory T Cells: The Therapeutic Potential for Treating Autoimmune Diseases. *Front Immunol.* 2018 Feb 26;9:340. doi: 10.3389/fimmu.2018.00340. eCollection 2018. 査読有
6. Fujio K, Yamamoto K, Okamura T. Overview of LAG-3-Expressing, IL-10-Producing Regulatory T Cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2017;410:29-45. doi: 10.1007/82\_2017\_59. 査読無
7. 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. Interleukin-10-producing LAG3+ regulatory T cells are associated with disease activity and abatacept treatment in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2017 May 16;19(1):97. doi: 10.1186/s13075-017-1309-x. 査読有
8. Takeshima Y, Iwasaki Y, Okamura T, Fujio K, Yamamoto K. The metabolic regulation in immune cells and pathogenesis of systemic lupus erythematosus ~toward new therapeutic applications~. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi.* 2017;40(1):12-20. doi: 10.2177/jsci.40.12. in Japanese 査読無
9. Tsuchida Y, Sumitomo S, Ishigaki K, Suzuki A, Kochi Y, Tsuchiya H, Ota M, Komai T, Inoue M, Morita K, Okamura T, Yamamoto K, Fujio K. TGF- 3 Inhibits Antibody Production by Human B Cells. *PLoS One.* 2017 Jan 4;12(1):e0169646. doi: 10.1371/journal.pone.0169646. 査読有
10. Sumitomo S, Nakachi S, Okamura T, Tsuchida Y, Kato R, Shoda H, Furukawa A, Kitahara N, Kondo K, Yamasoba T, Yamamoto K, Fujio K. Identification of tonsillar CD4+CD25-LAG3+ T cells as naturally occurring IL-10-producing regulatory T cells in human lymphoid tissue. *J Autoimmun.* 2017 Jan;76:75-84. doi: 10.1016/j.jaut.2016.09.005. 査読有
11. Morita K, Okamura T, Inoue M, Komai T, Teruya S, Iwasaki Y, Sumitomo S, Shoda H, Yamamoto K, Fujio K. Egr2 and Egr3 in regulatory T cells cooperatively control

- systemic autoimmunity through Ltbp3-mediated TGF- $\beta$ 3 production. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Dec 13;113(50):E8131-E8140 査読有
12. 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 (Oxford). 2016 Dec;55(suppl 2):ii76-ii81.
13. Fujio K, Komai T, Inoue M, Morita K, Okamura T, Yamamoto K. Revisiting the regulatory roles of the TGF- $\beta$  family of cytokines. Autoimmun Rev. 2016 Sep;15(9):917-22. doi: 10.1016/j.autrev.2016.07.007. 査読有
14. Komai T, Okamura T, Yamamoto K, Fujio K. The effects of TGF- $\beta$ s on immune responses. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi. 2016; 39(1):51-8. doi: 10.2177/jsci.39.51. in Japanese 査読無

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 発表者名 岡村僚久  
 発表標題 Role of CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells in the maintenance of humoral immune tolerance (口頭発表)  
 学会等名 第 47 回日本臨床免疫学会総会 (International Symposium2: Humoral Immunity and diseases)  
 発表年 2018 年
2. 発表者名 照屋周造、岡村僚久、竹島雄介、駒井俊彦、井上真璃子、岩崎由希子、山本一彦、藤尾圭志  
 発表標題 CD4 陽性 T 細胞における転写因子 Klf1 を介した PD-L1 発現誘導機構 (口頭発表)  
 学会等名 第 45 回日本臨床免疫学会総会  
 発表年月日 2017 年
3. 発表者名 Tomohisa Okamura  
 発表標題 Role of Egr2/Egr3 in regulatory T cell-mediated humoral immune tolerance (口頭発表)  
 学会等名 4th Symposium on Max Planck-The University of Tokyo Center for Integrative Inflammation  
 発表年月日 2017 年
4. 発表者名 Toshihiko Komai, Tomohisa Okamura, Mariko Inoue, Yukiko Iwasaki, Kaoru Morita, Kazuhiko Yamamoto, Keishi Fujio  
 発表標題 Immunological significance of dual secretion of TGF-beta3 and IL-10 from regulatory T cells (口頭発表)  
 学会等名 第 45 回 日本免疫学会総会・学術集会  
 発表年月日 2016 年
5. 発表者名 井上真璃子、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- $\beta$  3 および IL-10 による協調性液性免疫制御機構の解明 (口頭発表)  
学会等名 第 60 回 日本リウマチ学会総会・学術集会  
発表年月日 2016 年

6. 発表者名 藤尾圭志、岡村僚久、駒井俊彦、井上眞璃子、森田薫、住友秀次、山本一彦  
発表標題 B 細胞を抑制する CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞 (口頭発表)  
学会等名 第 60 回 日本リウマチ学会総会・学術集会  
発表年月日 2016 年

〔図書〕(計 5 件)

1. 著者名 岡村僚久  
出版社 北隆館  
書名 「Precision Medicine」 「自己免疫疾患の個別化医療 Personalized medicine of autoimmune disease」 2019 年 1 月号 (2018 年 12 月 29 日発行)  
タイトル「マルチオミックス解析に基づく自己免疫疾患の個別化医療」  
発行年 2019  
総ページ数 14-18 (5 頁)
2. 著者名 岡村僚久  
出版社 医歯薬出版株式会社  
書名 週刊『医学のあゆみ』 「制御性 T 細胞の現在」 268 巻 13 号  
タイトル「LAG3 陽性制御性 T 細胞の分化と機能」  
発行年 2018  
総ページ数 1191-1196 (6 頁)
3. 著者名 岡村僚久  
出版社 医歯薬出版株式会社  
書名 週刊『医学のあゆみ』 「Class 1b 拘束性 T 細胞研究の新展開・Qa1 拘束性 T 細胞の分化と機能における新展開」 265 巻 4 号  
タイトル「Qa-1 拘束性 CD8 陽性制御性 T 細胞の分化と機能」  
発行年 2018  
総ページ数 264-268 (4 頁)
4. 著者名 岡村僚久  
出版社 科学評論社  
書名 「リウマチ科」特集 「免疫学の基本的知識およびリウマチ性疾患との関連について理解する」 vol.58 no.5  
タイトル「T 細胞における Egr2 および Egr3 による自己免疫制御機構」  
発行年 2017  
総ページ数 519-524 (6 頁)
5. 著者名 岡村僚久  
出版社 先端医学社  
書名 「分子リウマチ治療」 連載「疾患からみた細胞表面機能分子」 vol.9 no.3

タイトル「SLE における CD4 陽性 LAG3 陽性 制御性 T 細胞」

発行年 2016

総ページ数 39-44 (6 頁)

〔その他〕

ホームページ等

<http://ryumachi.umin.jp/staff/index.html>

<http://ryumachi.umin.jp/about/research.html>

6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：住友 秀次

ローマ字氏名：Sumi tomo Shuji