

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H01051

研究課題名(和文) 病態に直結するT細胞レパトアの制御を目指した、新たな免疫制御機構の同定と解析

研究課題名(英文) Analysis on a new immunoregulatory mechanism to control pathogenic T cell repertoires

研究代表者

高橋 勇人 (TAKAHASHI, Hayato)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：40398615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、様々な免疫寛容機構のうち、我々が同定した機構を詳細に解明し、自己免疫疾患の治療やがん免疫療法の強化に役立てることを目的としている。特に末梢組織で機能する免疫寛容機構が抗原特異的に機能し、自己反応性T細胞を除去することを明らかにし、その仕組みの一端として、制御性T細胞が発現するOX40という分子が重要であることを明らかにした。さらに、この機構は繰り返し機能する際には、より効率良く病的T細胞を除去でき、免疫寛容機構の記憶の存在が示唆された。さらに、コレステロール代謝に関連する分子に関して、がん免疫のブレーキ役となる分子を同定した。本成果は、難治性疾患やがんの治療に役立つことが期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ヒト自己免疫疾患で標的とされている自己抗原に対する抗原特異的な末梢性免疫寛容機構の一端をマウスモデルで明らかにできた点が、人工的に作成された従来の自己免疫モデルでの成果と大きく異なる。特に、今回明らかにできた制御性T細胞が発現するOX40分子が重要な分子であった点は、今後の免疫疾患治療戦略上、有益な成果であったと考えられた。また、本研究を通じて、免疫制御機構とコレステロール代謝の接点を明らかにできた。従来知られてこなかった、コレステロール代謝を利用した免疫制御機構を明らかにでき、今後の疾患制御法開発の戦略に新たな研究領域を確立できたことは、学術的にも大きな意義があった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the various immune tolerance mechanisms that we have identified and to use them to treat autoimmune diseases and to enhance cancer immunotherapy. In particular, we have shown that the immune tolerance mechanism functioning in peripheral tissues operates in an antigen-specific manner to eliminate autoreactive T cells, and that the molecule OX40, which is expressed by regulatory T cells, is important as a part of this mechanism. Furthermore, this mechanism was able to eliminate pathological T cells more efficiently when functioning repeatedly, suggesting the existence of a memory of immune tolerance mechanisms. Furthermore, we identified cholesterol metabolism-related molecules that act as brakes on cancer immunity. These results were expected to be useful for the development of the treatment in intractable diseases and cancer.

研究分野：皮膚免疫

キーワード：免疫寛容 免疫制御 T細胞 天疱瘡 自己免疫疾患

1. 研究開始当初の背景

角化細胞に発現する細胞接着分子デスモグレイン 3 (Dsg3) は、自己免疫性水疱症である尋常性天疱瘡 (PV) の標的自己抗原である。PV では、抗 Dsg3 抗体により角化細胞の細胞接着が障害され、全身皮膚や口腔粘膜に水疱・びらんをきたす。

自己抗体の産生に重要な自己反応性 T 細胞の意義を明らかにするため、我々はマウスの系においてすでに、Dsg3 特異的 T 細胞受容体トランスジェニック (Dsg3H1) マウスの作成を行ってきた。この Dsg3H1 マウスの解析の中で、生理的表皮自己抗原 Dsg3 に対する免疫寛容機構の存在を明らかにした。つまり、Dsg3 特異的 T 細胞は Dsg3 非存在下では T 細胞が分化し存在しえるが、Dsg3 存在下では胸腺で完全に消失した。この事は Dsg3H1 マウスが免疫寛容機構の存在を知るためのツールとして有用であることを意味する。これを利用し、我々はさらに Dsg3 に対する T 細胞末梢免疫寛容機構が存在することを胸腺移植や養子移入の実験系を駆使して明らかにしている。つまり、養子移入のモデルでは野生型マウスに Dsg3 特異的 T 細胞 (H1) を移入すると、この免疫寛容機構によりリンパ節で自律的に“分裂”した後に 14 日間で“消失”するという末梢免疫寛容機構を明らかにしていた (図 1)。本研究では、この実験システムを利用し、さらに免疫寛容機構の知見を深めることを試みた。

一方、我々は免疫制御作用をもつ IL-27 と TGF- β を同時に CD4⁺ T 細胞に作用させると、コレステロール 25-水酸化酵素 (cholesterol 25-hydroxylase; Ch25h) が強力に誘導されることを明らかにしてきた。Ch25h はコレステロールを 25-水酸化コレステロール (25OHC) に変換する酵素である。Ch25h+CD4⁺ T 細胞は細胞内のコレステロールを利用し、25OHC を生成し分泌する。25OHC は強力なコレステロール合成阻害作用をもつため、分泌された 25OHC は周囲の T 細胞に作用しコレステロール合成を阻害し、細胞内コレステロールが枯渇する結果、周囲 T 細胞に細胞死が誘導される。このような新たな機能分子の T 細胞での発現を確認することで、免疫系とコレステロール代謝の接点の存在とその重要性を明らかにしてきた。本研究においても、コレステロール代謝と免疫機能の関連性について、新たな知見を深めることを試みた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、末梢組織において病態に直接関与する T 細胞が除去される機序を明らかにすることである。特に、自己抗原特異的な末梢免疫寛容機構とコレステロール代謝に着目した免疫制御の解析を通じて、自己免疫疾患・悪性腫瘍における新たな治療標的を同定し、将来の応用を目指して、基礎データを蓄積することである。

3. 研究の方法

本研究は(1)Dsg3 に対する末梢性免疫寛容機構の解析と(2)コレステロール代謝を利用した免疫制御機構の解析の大きく二つに分けて行っていく。

(1) Dsg3 に対する末梢性免疫寛容機構の解析

① Dsg3 に対する末梢性免疫寛容機構の責任分子の同定

我々は先行研究において Dsg3 特異的 TCR トランスジェニックマウス (Dsg3H1 マウス) を作成しており、このマウスから Dsg3 特異的 CD4 T 細胞 (Dsg3H1 T 細胞) を準備することができる。Dsg3H1 T 細胞は *Rag2*^{-/-} マウスに移入すると、Dsg3 を発現する角化細胞を直接傷害し、自己免疫性皮膚炎を生じる。しかし、この Dsg3H1 T 細胞を野生型マウスに移入すると皮膚リンパ節において分裂し、14 日以内に消失する (図 1)。この末梢での抗原特異的な自己反応性 T 細胞クローンの除去機構における責任細胞と責任分子を、この実験系と各種遺伝子改変マウスを用いて解析し、同定した。

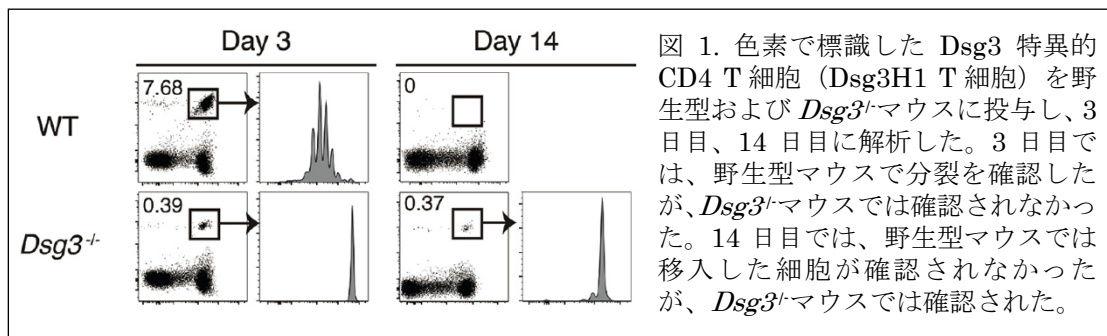


図 1. 色素で標識した Dsg3 特異的 CD4 T 細胞 (Dsg3H1 T 細胞) を野生型および *Dsg3*^{-/-} マウスに投与し、3 日目、14 日目に解析した。3 日目では、野生型マウスで分裂を確認したが、*Dsg3*^{-/-} マウスでは確認されなかった。14 日目では、野生型マウスでは移入した細胞が確認されなかったが、*Dsg3*^{-/-} マウスでは確認された。

② Dsg3 に対する末梢性免疫寛容機構における記憶機能の同定
 免疫寛容機構における記憶機能、すなわち同じ自己反応性 T 細胞が繰り返し発生する際に、初回に機能した免疫寛容機構が、二回目以降により効果的に機能を発揮するという仕組みについては、知られていない。そこで、我々は、Dsg3 に対する末梢免疫寛容機構の実験系を利用して、免疫寛容機構の記憶機能の存在について検討を行なった。

(2) コレステロール代謝を利用した免疫制御機構の解析

① Ch25h 発現 CD4 T 細胞の自己免疫における役割の解明

Ch25h 発現 CD4 T 細胞の自己免疫疾患における役割を検討するため、*Ch25h*^{-/-}マウスと Dsg3H1 マウスを交配し、*Ch25h*^{-/-}-Dsg3H1 マウスを作成した。このマウスから *Ch25h*^{-/-}-Dsg3H1 T 細胞を単離し、これを *Rag2*^{-/-}マウスに移入することにより、自己免疫性皮膚炎を生じさせる。この時、コントロールの Dsg3H1 T 細胞による皮膚炎の程度と比較することで、Ch25h 分子の自己免疫性皮膚炎における役割を評価した。また、自己免疫性皮膚炎モデルは Th1 細胞により誘導されるモデルであると考えられているが、Th1 細胞の分化にとって重要な転写因子である T-bet と Ch25h 分子の発現の関係性についても T-bet 欠損マウスを用いて検討をした。

② コレステロール代謝関連分子の癌免疫における役割の解明

我々の先行研究からコレステロール代謝が免疫系において重要な役割を持っていることが示唆されたため、あるコレステロール代謝分子における癌免疫の役割について、従来型の KO マウスおよびコンディショナル KO マウスを用いて解析を進めた。また同分子の発現をすでに公開されているヒト癌組織のトランスクリプトームデータを再利用することで解析し、マウスだけでなく、ヒトにおける同分子の重要性を評価した。

4. 研究成果

(1) Dsg3 に対する末梢性免疫寛容機構の解析

① Dsg3 に対する末梢性免疫寛容機構の責任分子の同定

Dsg3H1 T 細胞が 14 日以内で消失する機構の詳細を明らかにするために、免疫寛容に関連する分子として Aire および PD-1 に着目し、野生型マウスのかわりに、*Aire*^{-/-}マウスおよび抗 PD-1 中和抗体処理をした野生型マウスに Dsg3H1 T 細胞を投与した。その結果、両マウスにおいても Dsg3H1 T 細胞は 14 日以内で消失し、両分子は本免疫寛容機構にとって重要でないことが明らかになった。

一方、末梢における免疫寛容に重要であることが知られている Foxp3⁺制御性 T 細胞 (Treg) の本免疫寛容機構への関与を検討するため、Treg を除去できる遺伝子改変マウスを用いて検討した。その結果、Treg を除去したマウスにおいて Dsg3H1 T 細胞は 14 日以内に消失することなく分裂・活性化し、自己免疫性皮膚炎を誘導した (図 2)。

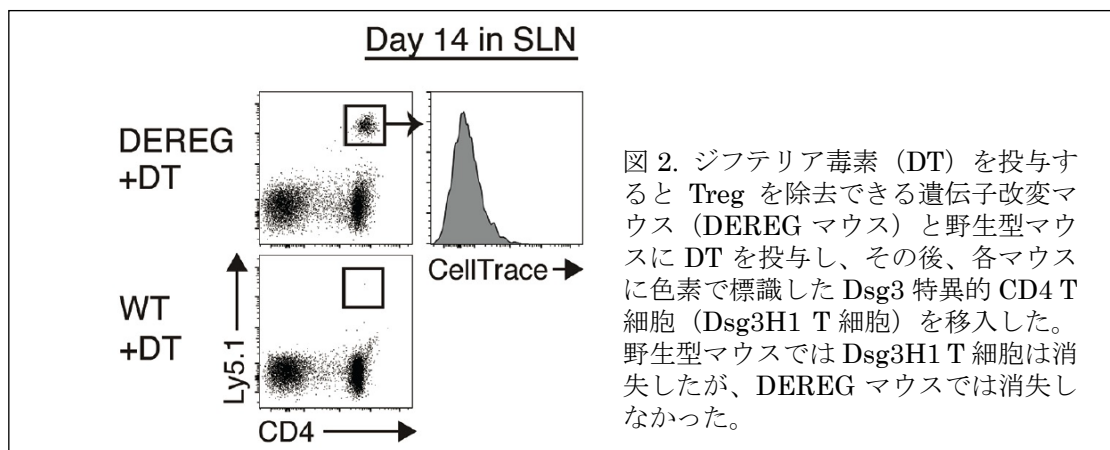


図 2. ジフテリア毒素 (DT) を投与すると Treg を除去できる遺伝子改変マウス (DEREG マウス) と野生型マウスに DT を投与し、その後、各マウスに色素で標識した Dsg3 特異的 CD4 T 細胞 (Dsg3H1 T 細胞) を移入した。野生型マウスでは Dsg3H1 T 細胞は消失したが、DEREG マウスでは消失しなかった。

しかし、Foxp3 遺伝子に変異 (R397W 変異) をもつ Foxp3 変異マウスに Dsg3H1 T 細胞を移入した場合には野生型と変わらず Dsg3H1 T 細胞は消失した。このことから、Treg 細胞に発現する遺伝子のうち、Foxp3 遺伝子によって制御される遺伝子は本免疫寛容機構には関係がないことがわかった。この知見から、Treg 特異的に発現する遺伝子において Foxp3 遺伝子と無関係に発現が誘導される遺伝子の一つとして OX40 遺伝子が責任候補分子として同定された。実際に Treg 特異的に OX40 遺伝子を欠損させると、Dsg3H1 T 細胞は消失せずに、自己免疫性皮膚炎を誘導した (図 3)。

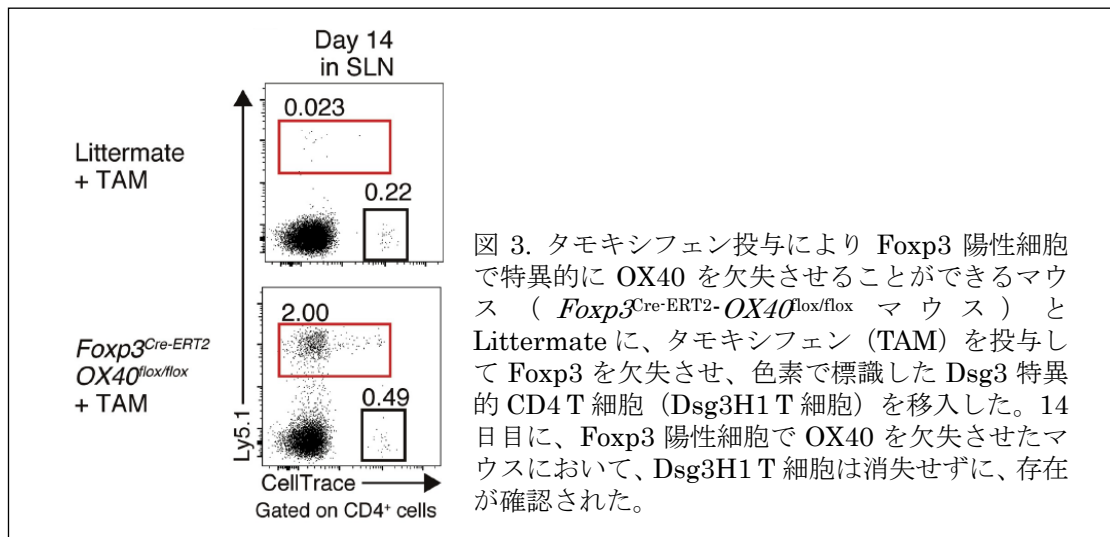


図 3. タモキシフェン投与により *Foxp3* 陽性細胞で特異的に *OX40* を欠失させることができるマウス (*Foxp3^{Cre-ERT2}-OX40^{lox/lox}* マウス) と Littermate に、タモキシフェン (TAM) を投与して *Foxp3* を欠失させ、色素で標識した *Dsg3* 特異的 CD4 T 細胞 (*Dsg3H1* T 細胞) を移入した。14 日目に、*Foxp3* 陽性細胞で *OX40* を欠失させたマウスにおいて、*Dsg3H1* T 細胞は消失せずに、存在が確認された。

以上のことから、*Dsg3* 特異的 T 細胞クローンを末梢組織において除去する機構として、Treg の *OX40* 分子が非常に重要であることが明らかになった。

② *Dsg3* に対する末梢免疫寛容機構における記憶機能の同定

Dsg3H1 T 細胞が末梢組織で消失する機構に関し、本機構が二回目に発動する際に、より効率よく機能するかどうかを検証するため、*Dsg3H1* T 細胞を野生型マウスに投与し消失したマウスに、投与 60 日後に再び *Dsg3H1* T 細胞を投与し、その消失の状態を検証した。その結果、1 回目投与時には、消失まで 14 日程度観察期間が必要であったが、2 回目投与は 12 時間ですでに消失を確認できた (図 4)。

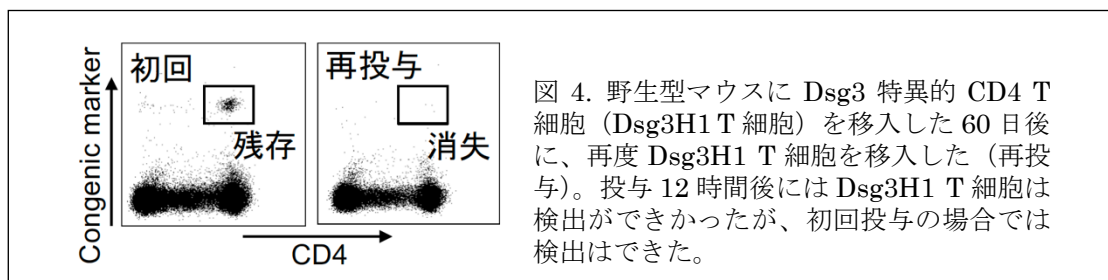


図 4. 野生型マウスに *Dsg3* 特異的 CD4 T 細胞 (*Dsg3H1* T 細胞) を移入した 60 日後に、再度 *Dsg3H1* T 細胞を移入した (再投与)。投与 12 時間後には *Dsg3H1* T 細胞は検出ができなかったが、初回投与の場合には検出はできた。

このことから、*Dsg3H1* T 細胞に対する末梢免疫寛容機構に対して、2 回目以降には迅速に寛容機構が機能することが確認された。さらに、この免疫寛容機構にとって重要な細胞集団を確認するため、投与後 CD3 抗体を投与し、CD3 陽性細胞集団を除去すると、2 回目投与時の迅速な細胞の消失は解除された。以上の結果から、末梢免疫寛容機構の記憶機能には、CD3 陽性細胞集団が関与していることが推察された。

(2) コレステロール代謝を利用した免疫制御機構の解析

① *Ch25h* 発現 CD4 T 細胞の自己免疫における役割の解明

TCR 刺激下で *IL-27* と *TGF-β* を同時に作用させると、*Ch25h* 発現 CD4⁺ T 細胞が誘導できることを示してきた。この *Ch25h* 発現 CD4⁺ T 細胞は *Ch25h* の代謝産物である 25OHC を分泌する。25OHC が活性化免疫細胞の細胞死を誘導することから、*Ch25h* 発現 CD4⁺ T 細胞は免疫に何らかの影響を与えることが推察された。そこで、*Ch25h^{+/+}* マウスと *Dsg3H1* マウスを交配し、*Ch25h^{+/+}-Dsg3H1* T 細胞を準備し、これを *Rag2^{-/-}* マウスに移入後、自己免疫性皮膚炎を誘導し皮膚炎の程度を観察することで、T 細胞が発現する *Ch25h* の免疫学的役割を検討した。その結果、*Dsg3H1* T 細胞において *Ch25h* を欠損すると、皮膚炎の程度が悪化し、炎症細胞浸潤の程度が増悪することがわかった (図 5)。これらの結果から、*Ch25h* 発現 CD4⁺ T 細胞は免疫制御機能を有することがわかった。

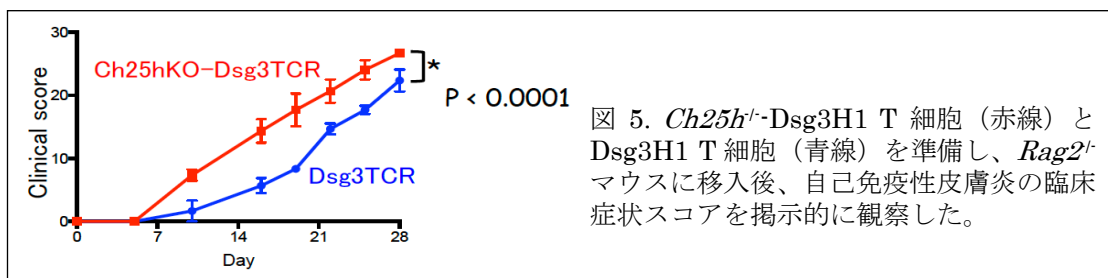


図 5. *Ch25h^{+/+}-Dsg3H1* T 細胞 (赤線) と *Dsg3H1* T 細胞 (青線) を準備し、*Rag2^{-/-}* マウスに移入後、自己免疫性皮膚炎の臨床症状スコアを掲示的に観察した。

② コレステロール代謝関連分子の癌免疫における役割の解明

我々の先行研究からコレステロール代謝と免疫との密接な関係を明らかにすることができた。今回、あるコレステロール代謝に関連する分子（コレステロール代謝関連分子）に着目し、この KO マウスを用いて、癌免疫との関連性について、検討を行った。従来型の KO マウスと野生型マウスに MC38 がん細胞を皮下接種し、抗 PD-L1 抗体あるいはアイソタイプ抗体で処置し、腫瘍量を経時的に観察した。その結果、抗 PD-L1 抗体で完全に消失しなかった腫瘍が、KO マウスにおいては、消失することがわかった。次に同分子の Venus レポーターマウスを作成し、皮下腫瘍モデルにおいて Venus 陽性細胞の出現を評価した。その結果、主に、マクロファージに Venus 陽性細胞の出現が確認された。そこで、LysM-Cre マウスを交配してマクロファージ特異的に同分子を欠損させたコンディショナル KO マウスを用いて、検討をさらに行った。MCA205 がん細胞株を皮下接種したモデルにおいては、抗 PD-1 抗体の抗腫瘍効果が、WT マウスに比較して増強していた。

すでに公開されているデータセットを利用し、ヒトがん組織に浸潤する免疫細胞における同分子の発現状況の評価した。その結果、ヒト肺癌及びメラノーマ組織の浸潤細胞の単細胞 RNA シーケンス結果を解析すると、確かに、同分子を発現する細胞集団が確認された。またメラノーマにおける浸潤マクロファージに発現する同分子の発現レベルは免疫チェックポイント阻害剤奏功群で低かった。以上の結果から、同分子はある種のがんにおいて、腫瘍免疫を抑制する分子として働いていることが、マウスおよびヒトデータから示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takahashi H., Nomura H., Iriki H., Kubo A., Isami K., Mikami Y., Mukai M., Sasaki T., Yamagami J., Kudoh J., Ito H., Kamata A., Kurebayashi Y., Yoshida H., Yoshimura A., Sun H. W., Suematsu M., O' Shea J. J., Kanno Y., Amagai M.	4. 巻 6
2. 論文標題 Cholesterol 25-hydroxylase is a metabolic switch to constrain T cell-mediated inflammation in the skin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciimmunol.abb6444	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Iriki Hisato, Takahashi Hayato, Wada Naoko, Nomura Hisashi, Mukai Miho, Kamata Aki, Ito Hiromi, Yamagami Jun, Matsui Takeshi, Kurebayashi Yutaka, Mise-Omata Setsuko, Nishimasu Hiroshi, Nureki Osamu, Yoshimura Akihiko, Hori Shohei, Amagai Masayuki	4. 巻 118
2. 論文標題 Peripheral tolerance by Treg via constraining OX40 signal in autoreactive T cells against desmoglein 3, a target antigen in pemphigus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2026763118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Zhao W.L., Ishii K., Egami S., Xu Z., Funakoshi T., Takahashi H., Tanikawa A., Ishiko A., Amagai M., Yamagami J.	4. 巻 36
2. 論文標題 Analysis of clinical characteristics, prognosis and antibody pathogenicity of pemphigus patients positive for anti desmoglein IgG autoantibodies in remission: a retrospective cohort study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology	6. 最初と最後の頁 271 ~ 278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdv.17770	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nomura Hisashi, Wada Naoko, Takahashi Hayato, Kase Yuko, Yamagami Jun, Egami Shohei, Iriki Hisato, Mukai Miho, Kamata Aki, Ito Hiromi, Fujii Hideki, Ishikura Tomoyuki, Koseki Haruhiko, Watanabe Takashi, Yamada Taketo, Ohara Osamu, Koyasu Shigeo, Amagai Masayuki	4. 巻 208
2. 論文標題 IgM to IgG Class Switching Is a Necessary Step for Pemphigus Phenotype Induction in Desmoglein 3-Specific B Cell Receptor Knock-in Mouse	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 582 ~ 593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2100781	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Isami Koichi, Amagai Masayuki, Takahashi Hayato	4. 巻 101
2. 論文標題 Simultaneous detection of mouse Foxp3 and cytosolic fluorescent protein by a modified intracellular staining protocol	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 147 ~ 149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2020.10.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Mukai M, Takahashi H, Amagai M
2. 発表標題 IFN γ signaling plays both pro-inflammatory and immunoregulatory roles depending on the cell types in mouse dermatitis model
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shohei Egami, Takashi Watanabe, Ayano Nomura-Fukushima, Hisashi Nomura, Hayato Takahashi, Jun Yamagami, John R Stanley, Osamu Ohara, Masayuki Amagai
2. 発表標題 Autoantigen-specific B cells targeted single-cell RNA-seq reveals the functional heterogeneity in pemphigus patients
3. 学会等名 The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miho Mukai, Hayato Takahashi, Masayuki Amagai
2. 発表標題 IFN-gamma signaling is pro-inflammatory in T cells but immunoregulatory in non-T and B cell population in interface dermatitis model
3. 学会等名 The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miho Mukai, Hayato Takahashi, Masayuki Amagai
2. 発表標題 Immunoregulatory roles of IFN-gamma signaling in non-T and B cell population is important for suppression of interface dermatitis in mouse
3. 学会等名 2021 Society for Investigative Dermatology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Aki Kamata, Hayato Takahashi, Hiroki Yoshida, Jun Yamagami, Masayuki Amagai
2. 発表標題 IL-27 plays an important role in anti-desmoglein 3 antibody production in pemphigus vulgaris mouse model.
3. 学会等名 The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鎌田亜紀, 高橋勇人, 吉田裕樹, 伊藤宏美, 山上淳, 天谷雅行
2. 発表標題 天疱瘡モデルマウスの抗デスモグレイン3抗体産生においてIL-27p28は重要な役割を果たす
3. 学会等名 第41回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hisato Iriki, Hayato Takahashi, Naoko Wada, Shohei Hori, Masayuki Amagai
2. 発表標題 T cell-mediated, OX40-dependent peripheral tolerance to autoantigen, desmoglein 3
3. 学会等名 77th Annual Meeting, Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	谷口 智憲 (Yaguchi Tomonori) (40424163)	京都大学・医学研究科・特定講師 (14301)	
研究分担者	船越 建 (Funakoshi Takeru) (80365353)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授 (32612)	
研究分担者	山上 淳 (Yamagami Jun) (80327618)	東京女子医科大学・医学部・准教授 (32653)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	National Institutes of Health		