

令和 5 年 10 月 25 日現在

機関番号：82506

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07616

研究課題名（和文）抗原が同定困難な病態においても応用可能な抗原特異的な免疫抑制療法の開発

研究課題名（英文）Antigen specific immunosuppression for autoimmune diseases

研究代表者

大矢 佳寛 (Oya, Yoshihiro)

独立行政法人国立病院機構（千葉東病院臨床研究部）・その他部局等・室長

研究者番号：60507218

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：T細胞受容体の遺伝子改変動物より作成したリンパ球に認められていた抗原特異的な免疫抑制が、非改変動物においても認められるか否かを明らかにするため、抗原刺激後のT細胞レセプターの多様性を解析した。結果、単一の抗原刺激においても、T細胞レセプターの多様性は保持されていた。多抗原と、単一抗原によるリンパ球刺激を比較したところ、いずれの刺激においても、複数のリンパ球集団による増殖を認めた。各IL-2、ATRAの有無、併用条件において、Foxp3細胞の誘導条件を解析したところ、両者は抗原特異的細胞誘導の増殖速度においても促進していることが示され、それぞれ独立な経路により促進していることが推定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己免疫疾患に対する治療に用いられる免疫抑制剤。

今なお残る副作用は、感染症の発症や発癌のリスクであり、いまだ解決に至っていない。目的としない免疫応答へは影響を与えずに、目的とする免疫応答のみを抑制する方法を見出した本研究の成果は、これらの問題点を解決する治療法を提供すべく、さらなる臨床応用に向けて、遺伝子改変動物を用いずにリンパ球を用意し、免疫抑制機能を有する細胞に誘導する手法に主軸を移し、基盤となる細胞応答の研究を行っている。

研究成果の概要（英文）：To determine whether the antigen specific immune suppression observed in T cell receptor transgenic animal is still observed in non-transgenic animal, TCR repertoire was analyzed. Multi-variety of TCR was maintained by single antigen stimulation. Both multi-antigen and single antigen stimulation proliferated multiple populations of T cells. ATRA and IL-2 augmented the induction of Foxp3 positive cell generation independently, suggesting utilizing different pathways.

研究分野：リンパ球

キーワード：免疫抑制療法 膠原病 自己免疫疾患 リンパ球

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患は、自己の抗原に対する免疫応答の異常な活性化状態であると考えられている。近年の免疫学の発展は、種々の免疫抑制剤を生み出し、自己免疫疾患に対する治療法にも多くの選択肢をもたらした。しかし、これらの状況においてもなお残る副作用は、意図しない免疫応答の抑制である。感染症の発症や発癌のリスクは現行の免疫抑制剤の抱える不可避の問題であり、いまだ解決に至っていない。本研究者は抗原特異性についての解析を通して、目的としない免疫応答へは影響を与えずに、目的とする免疫応答のみを抑制する方法を見出した。従来の免疫抑制剤を用いた治療は、標的とする抗原のみならず非特異的に免疫応答を抑制する。そのため、易感染性のリスクをもたらし、抗がん免疫能も低下は発がんのリスクを上昇させる。従って、臨床現場では、易感染性のリスクを最小限にし、目的の免疫応答だけをコントロールするための慎重な用量調整、試行錯誤が必須となる。しかし、標的とする抗原をみの抑制する治療法が開発されれば、易感染性、がん免疫の低下を引き起こさずに安全に自己免疫疾患の治療が可能となる。自己免疫疾患においては抗原が明らかでない疾患がほとんどであり、これらにおいても応用可能な治療手段の構築が急務である。

2. 研究の目的

これまで、抗原特異的な免疫抑制機序の研究には、T細胞受容体の遺伝子改変動物より準備されたリンパ球から作成されたリンパ球が抗原特異的なリンパ球として用いられてきた。本研究では、さらなる臨床応用に向けて、遺伝子改変動物を用いずにリンパ球を用意し、免疫抑制機能を有する細胞に誘導する手法に軸を移す。一般にヒトを含む獲得免疫を有する脊椎動物においては、T細胞受容体遺伝子再構成のメカニズム(PNAS 1976,(73) 3628-32)が発動されるため、T細胞は極めて多種多様な種類の認識能を有する受容体を発現する細胞の集団から構成される。自己免疫疾患において異常活性化しているリンパ球はこれら多種多様な認識能を有するT細胞受容体を発現したリンパ球であると考えられ、これらの性質を有するリンパ球による免疫応答機序は、従来の遺伝子改変動物より準備されたリンパ球から得られた知見(Nat.Immunol. 2019,(20) 218-231)とは全く別の機序を有すると考えられ、改めて意図する抗原を標的とした治療が可能であるのかを明らかにする必要がある。

3. 研究の方法

T細胞受容体の遺伝子改変動物より作成したリンパ球を用いる場合、単一の抗原でリンパ球を刺激または抑制する場合、単一のT細胞受容体を発現したリンパ球集団が増殖/抑制されるため、それぞれのリンパ球の抗原への認識強度、細胞内シグナル強度は一定であり、応答後の細胞内シグナルも同一の挙動を示すと推定される。しかし一方で、遺伝子非改変動物から得られたリンパ球を用いた場合、単一の自己抗原を刺激抗原として用いた場合でも、与えられた抗原刺激シグナル、抑制シグナルは多種多様な認識能を有するT細胞受容体を発現するリンパ球によりそれぞれ認識され、結果、T細胞受容体により細胞内に伝達されるシグナルも様々な強弱のパターンとなると想定される。その結果、多種多様な認識能を有する細胞の集団が、同一の挙動を示すのか、あるいは、別々の挙動を示すのか、さらには単一の抗原認識能を有する細胞のみが選択され均一に増殖/抑制の挙動を示すのか明らかでない。

(1) C57BL/6 マウスより採取したリンパ球より CD4 陽性 T 未応答細胞を回収し、(別系統マウスの樹状細胞)による抗原刺激を与え、増殖したリンパ球の表面 T 細胞受容体鎖の発現頻度解析を行う。つぎに、単一の抗原刺激により単一の細胞集団が選択され増殖するのであれば、免疫抑制も先行研究の結果に沿った抗原特異的な応答をすると想定され、同様の結果が得られると期待できるが、仮に多種の認識能を保持した細胞集団が増殖する場合、先行研究と同様の結果を示すとは言えなくなる。そこで、刺激に用いた抗原が多様な抗原性を有していたために多様な細胞集団が誘導されたとする仮説が成り立つ。そこで、刺激に用いる抗原に単一抗原を用いた場合、誘導されるリンパ球に、多様な細胞集団が見出されるかを調べる。次に、その増殖した細胞の多様性の内容は、刺激の前後で変化するのか、また、刺激抗原の種類により多様性の内容に固有の変化が生じるのかを明らかにする。

(2) C57BL/6 マウスより採取したリンパ球より CD4T 未応答細胞を回収し、(2種類の別系統マウスの樹状細胞)と共培養し、増殖したリンパ球の表面 T 細胞受容体鎖の発現頻度解析を行い、2群の差異を検討する。多種多様な認識能を有するT細胞受容体を発現したリンパ球を同時に刺激を与えた際、刺激抗原により弱く刺激される細胞、強く刺激される細胞、様々な応答をする細胞が同時に刺激される。これら細胞同士の相互作用により、強く刺激される細胞が、弱くしか刺激されない細胞、もしくは刺激されない細胞により受ける影響、また、弱くしか刺激されない細胞、もしくは刺激されない細胞が、共存する強く刺激される細胞により受ける影響を、明らかにする必要がある。これは、適切な刺激応答をする細胞をいかなる環境で、標的抗原に応答させるべきか、という条件設定に関わる基盤条件となる。

次いで細胞表面に発現するT細胞受容体の多様性はこの治療用細胞の細胞作成において、いかなる影響を与えるのかについて解析する。

(3) 治療用細胞の細胞作成の効率化

自己免疫疾患の治療において治療用細胞の細胞作成の効率化は実用化にむけた課題の一つである。刺激、回収、培養条件を比較し、多様性を有する細胞集団を同一空間内で刺激し活性化を維持したリンパ球を回収するための至適条件を探索した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子非改変動物から誘導される抑制性細胞の特性

遺伝子非改変動物である C57BL/6 マウスのリンパ球より作成された未応答細胞は、別系統マウス樹状細胞の抗原刺激により増殖し、増殖したリンパ球の T 細胞受容体の発現頻度解析の結果、複数種 鎖の同時増加を認めた (Fig. 1A)。このことは、与えた抗原刺激に複数のエピトープが含まれ、多数の種類のリンパ球集団が抗原特異的に応答した結果と解釈された。そこで、抗原種を減らし、単一アミノ酸置換蛋白を表面抗原として増殖したリンパ球について同様の表面 T 細胞受容体の発現頻度解析を実施した。増殖したリンパ球の 鎖構成は複数から成り、抗原がアミノ酸置換の単一抗原において、応答するリンパ球集団は依然として幅広い多様性を保持していた (Fig. 1B)。このことより、抗原認識能も応答性の弱いものから強いリンパ球まで幅広く存在していることが示唆された。T 細胞受容体の遺伝子非改変動物から誘導される抑制性細胞は常に多様性を保持しており、抗原の種類によらず、仮に抗原が単一抗原であっても単一細胞の選択は生じないことが示唆された。

Fig. 1A

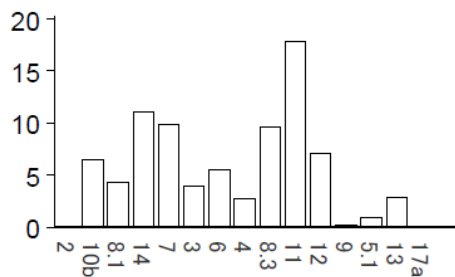


Fig. 1B

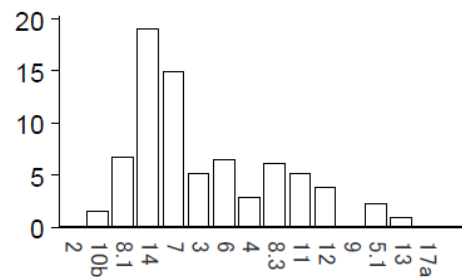


Fig. 1 リンパ球の T 細胞受容体の発現頻度解析

番号： 鎖番号、別系統の抗原刺激(A)、単一アミノ酸刺激(B)による抗原刺激 7 日後でのリンパ球発現受容体 (%) / CD4 陽性細胞。n = 3

(2) 抗原の構成による活性化するリンパ球の細胞集団に関わる因子の検討

(1)の結果より、T 細胞受容体の遺伝子非改変動物から誘導される抑制性細胞は抗原が単一であっても単一細胞の選択は生じないことが示唆された。そこで、細胞の多様性の内容は刺激の前後で変化するのか否かを検討するため、C57/BL6 マウス由来の未刺激 CD4 T 細胞を別系統マウス樹状細胞の抗原刺激により、刺激前と刺激後の T 細胞受容体構成を比較した。Fig 2A は、横軸に、頻度増加量：刺激後頻度 (%) - 刺激前頻度 (%) を示し、縦軸に、刺激後増加比率：刺激後頻度 (%) / 刺激前頻度 (%) を各 鎖ごとの分布を示す。左に分布するものほど差分が増加した因子であり、上に分布するものほど増加比率が高い因子であることを示す。すなわち、左上に分布した因子が、特に抗原刺激に強く応答した因子であることを示す。図に示される通り、複数の種類の T 細胞レセプターが抗原特異的に反応しており、多様性を保持したリンパ球集団が刺激されたことを示している。次に、単一抗原で刺激した場合のリンパ球多様性の変化を調べた (Fig. 2B)。複数因子の増多を来しており、単一抗原による抗原刺激は、多様性を保持したリンパ球の増加を来し、自己免疫疾患の原因が仮に単一アミノ酸置換などによる変異であったとしても、それにより惹起される抗原特異的な免疫応答は、複数のリンパ球集団による増殖となり発現することが示された。

Fig. 2A

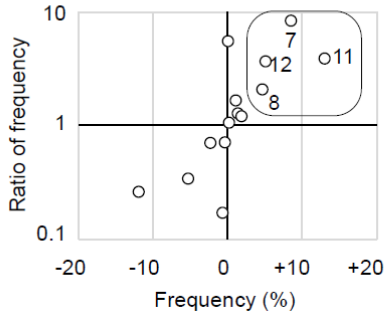


Fig. 2B

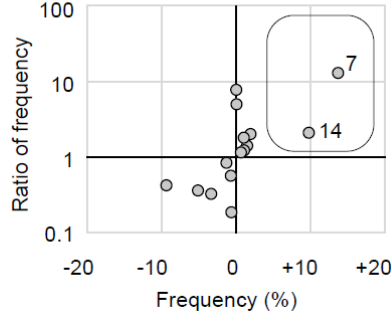


Fig.2 活性化リンパ球のT細胞受容体構成の変化 #: 鎖番号、別系統の抗原刺激(A)、単一アミノ酸刺激(B)による刺激前と刺激7日後でのリンパ球発現受容体の比較。n = 3,

(3) 治療用細胞の作成に関わる因子の解析

未応答細胞から Foxp3+ 治療用細胞の至適誘導条件を解析した。自己免疫疾患の治療に期待できる Foxp3 陽性細胞の産生方法として、TGFb の他、IL-2, ATRA(all-trans-retinoic-acid) の有用性が報告されている。産生効率への影響を調べるため、各 IL-2、ATRA の有無、併用条件において、Foxp3 陽性率/計 CD4+T 細胞の割合、細胞増殖速度($10^6/\text{day}$)を測定した。結果、TGFb 単独での産生は認められるが、TGFb のみに比して、ATRA の添加により Foxp3+陽性率 8%と約2倍に改善。増殖速度も1.5倍ほどの増加を認めた。さらに、IL-2 の添加により陽性率は20%程度へと著明に増加。ATRA と IL-2 の併用は、相加的であり、28%前後を認めた。以上の結果より、ATRA と、IL-2 は抗原特異的細胞誘導の増殖速度においても促進していることが示され、それぞれ独立な経路により促進していることが推定された。今後、さらなる関連分子、サイトカインの検討を進めると同時に、分子メカニズムについて解析を行う予定である。

Fig. 3A

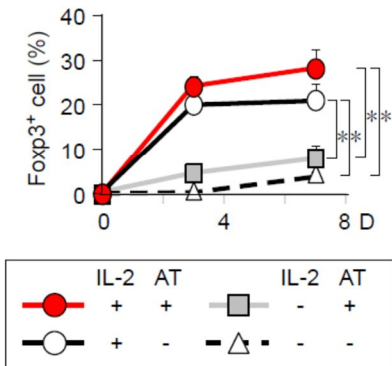


Fig. 3B

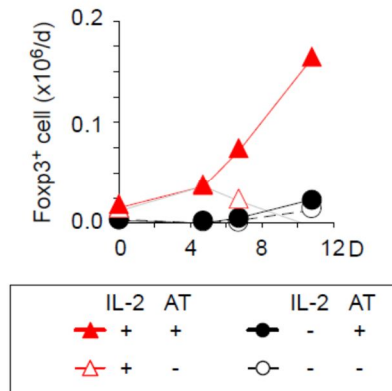


Fig. 3, Foxp3 細胞への誘導に関わる各因子の影響 (A) Foxp3 陽性細胞率/ CD4 陽性細胞) ならびに (B) 細胞増殖速度($10^6/\text{day}$)に関わる IL-2、ATRA の影響。n = 3, *p < 0.001

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshihiro Oya, Hidekazu Futami, Takuya Nakazawa, Kazuyuki Ishijima, Keiko Umemiya, Fumiyo Takizawa, Naoki Imai, Hiroshi Kitamura, Ryutarō Matsumura	4. 巻 15
2. 論文標題 Tubulointerstitial nephritis and uveitis syndrome following meningitis and systemic lymphadenopathy with persistent Toxoplasma immunoglobulin M: a case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Med Case Rep.	6. 最初と最後の頁 482-496
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13256-021-02909-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sohei Makita, Hiroaki Takatori, Ayako Matsuki, Hirotohi Kawashima, Arifumi Iwata, Shigeru Tanaka, Daiki Nakagomi, Yoshihiro Oya, Ryutarō Matsumura, Tomohiro Tamachi, Akira Suto, Kotaro Suzuki, Koichi Hirose, Hiroshi Nakajima	4. 巻 5
2. 論文標題 T-bet and STAT6 Coordinately Suppress the Development of IL-9-Mediated Atopic Dermatitis-Like Skin Inflammation in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Invest Dermatol	6. 最初と最後の頁 1274-1285
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2020.08.029	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9件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoshihiro Oya, Hidekazu Futami, Takuya Nakazawa, Ryutarō Matsumura, Hiroshi Nakajima, Ethan Shevach
2. 発表標題 Antigen specific suppression made on DC by Foxp3 Treg is not irreversible
3. 学会等名 The 65th Annual General Assembly and Scientific Meeting of the Japan College of Rheumatology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshihiro Oya, Hidekazu Futami, Takuya Nakazawa, Ryutarō Matsumura, Hiroshi Nakajima, Ethan Shevach
2. 発表標題 Antigen specific Treg suppression can be mediated just by dendritic cells
3. 学会等名 The 70th Annual Meeting of Japanese Society of Allergology
4. 発表年 2021年

1 . 発表者名 Yoshihiro Oya, Ryutaro Matsumura, Hiroshi Nakajima, Ethan Shevach
2 . 発表標題 Recruitment of Foxp3 Treg is not sufficient to suppress target inflammation
3 . 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 Oya Yoshihiro, Futami Hidekazu, Nakazawa Takuya, Matsumura Ryutaro, Nakajima Hiroshi, Shevach Ethan
2 . 発表標題 Effector T cells are able to proliferate in the presence of activated non-congnate Foxp3+ Treg cells
3 . 学会等名 JSA/WAO Joint Congress 2020-10 (国際学会)
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Oya Yoshihiro, Futami Hidekazu, Nakazawa Takuya, Matsumura Ryutaro, Nakajima Hiroshi, Shevach Ethan
2 . 発表標題 Antigen specific suppression can be mediated through Antigen presenting cells in the absence of Treg cells
3 . 学会等名 The 64th Annual General Assembly and Scientific Meeting of the Japan College of Rheumatology
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Yoshihiro Oya, Hidekazu Futami, Takuya Nakazawa, Ryutaro Matsumura, Hiroshi Nakajima, Ethan Shevach
2 . 発表標題 Antigen-specific Foxp3+ Tregs suppress cognate antigen response but not suppress non-cognate antigen response.
3 . 学会等名 The 63th Annual General Assembly and Scientific Meeting of the Japan College of Rheumatology
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshihiro Oya, Hidekazu Futami, Takuya Nakazawa, Ryutaro Matsumura, Hiroshi Nakajima, Ethan Shevach
2. 発表標題 Foxp3+ Tregs suppress cognate antigen response but not suppress non-cognate antigen response
3. 学会等名 The 68th Annual Meeting of Japanese Society of Allergology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshihiro Oya, Ryutaro Matsumura, Hiroshi Nakajima, Ethan Shevach
2. 発表標題 Antigen-specific Foxp3+CD4+ Tregs suppress T cell response to cognate antigen but not suppress T cell response to non-cognate antigen in vivo
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshihiro Oya
2. 発表標題 Treg mediate antigen specific suppression by capturing peptide-MHC from dendritic cell
3. 学会等名 The 301st Basic Research Joint Meeting (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 インビトロでの制御性T細胞の特異性評価方法	発明者 大矢 佳寛	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、51901097199	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 インビトロでの制御性T細胞の特異性評価方法	発明者 大矢 佳寛	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、51901097199	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------