

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591282

研究課題名（和文） ヒト制御性T細胞への分化誘導や抑制機能を高める生理活性物質の解析と治療への応用

研究課題名（英文） Analysis of the bioactive molecules that enhance the induction and suppressive properties of human regulatory T cells and application to therapy

研究代表者

長谷川 均 (HASEGAWA HITOSHI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40164826

研究成果の概要（和文）：生理活性脂質や核内受容体リガンドライブラリーからヒト制御性 T 細胞への分化誘導や抑制機能が增强する生理活性物質を 14 種類単離した。これらのうち、PPAR アゴニストは、誘導型制御性 T (iTreg) 細胞の Foxp3 の発現を增强させ、抑制機能を高めた。このことは PPAR アゴニストが DNA methyltransferase 発現を著しく低下させ、Foxp3 プロモーター領域および CNS3 領域の脱メチル化を促進させることによることが示唆された。さらに TSA や ATRA と併用すると相乗効果がみられた。一方、LPC がヒト内在性制御性 T 細胞(nTregs)の抑制機能を增强させることを見出した。lysophosphatidylcholine (LPC)が、nTregs からの TGF-beta の産生を亢進することにより、nTregs の Foxp3 の発現が增强し、抑制機能が亢進した。これらの物質を用いることで、ヒト Treg 細胞の制御が可能になり、自己免疫疾患の治療への応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We screened 14 kinds of the molecules that enhanced the induction and suppressive function of human regulatory T cells (Treg) from lipid and nuclear receptor ligand libraries. Of these, PPAR agonists increased suppressive function and expression of Foxp3 in induced Tregs (iTregs). PPAR agonist-treated iTregs increased demethylation level of the Foxp3 promoter region and CNS3. Moreover, TSA and ATRA enhanced iTregs generation synergistically with PPAR agonists. On the other hand, lysophosphatidylcholine (LPC) enhances Foxp3 expression and the suppressive function of nTregs through TGF-beta1 produced by nTregs themselves. These agents increased Treg differentiation and induction and may be beneficial for the treatment of human autoimmune diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：Regulatory T cells, Foxp3, lipids, Peroxisome proliferator-activated receptor

1. 研究開始当初の背景

免疫系には免疫抑制機能に特化した制御性 T

細胞 (Treg) が存在し、自己免疫などの病的な免疫応答を抑制して免疫恒常性の維持に重要な役割を果たしている。転写因子 Foxp3 は Treg の特異的のマーカーであるが、Foxp3 の誘導メカニズムは十分解明されていない。ヒトナイーブ T 細胞から TGF- $\beta$  で誘導される誘導性 Treg 細胞 (iTreg 細胞) の Foxp3 の発現は、低レベルでかつ一過的であり、この発現細胞は抑制機能を持たない。そこで我々は、Foxp3 の発現を増強させ、安定させる物質があれば、生体への投与で自己免疫疾患や炎症の抑制のみならず、培養下でも抗原特異的な制御性 T 細胞を人為的に末梢 T 細胞から安定に誘導でき、様々な自己免疫疾患を抗原特異的に治療することが可能になる。また、制御性 T 細胞の分化誘導を促進させる生理活性物質を網羅的に解析することは、Foxp3 の誘導メカニズムだけでなく、これらの物質が豊富に存在する臓器局所での免疫制御の解明の糸口になる。

## 2. 研究の目的

ヒト nTreg 細胞や iTreg 細胞の Foxp3 の発現を増強させ、安定させる物質を生理活性脂質や核内受容体リガンドからスクリーニングし、抑制機能を持つヒト Treg 細胞への誘導が可能かどうかを検討し、これらのヒト Treg 細胞への抑制機能増強機序について解析することを目的とする。

## 3. 研究の方法

まず、ヒト nTreg 細胞や iTreg 細胞の Foxp3 の発現を増強させ、安定させる物質を生理活性脂質や核内受容体リガンドからスクリーニングし、14 種類を単離し (表 1)、これらのうち、PPAR agonists と LPC について解析した。

Table 1 Screening of lipids and nuclear receptor ligands that up-regulate Foxp3 expression

•Lysophosphatidylcholine(LPC)
•Ciglitazone
•5,8,11,14-Eicosatetraynoic acid
•Bezafibrate
•Clofibrate acid
•Gemfibrozil
•GW7647
•N-Oleylethanolamide
•9,10-Octadecenoamide
•AGC
•13(S)-HODE
•12(S)-HHT
•Estrone
•17 $\beta$ -Estradiol

## 4. 研究成果

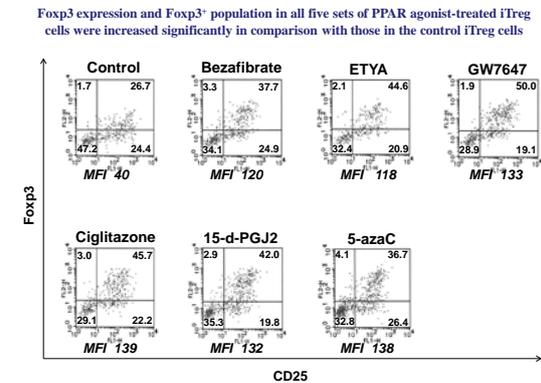
### A. PPAR $\alpha$ および $\gamma$ アゴニストによるヒト制御性 T 細胞への分化誘導機序

(1) まず、nTreg 細胞に対する PPAR アゴニストの影響について検討した。その結果、5 種類すべての PPAR アゴニストは、nTreg 細胞の Foxp3 の発現と抑制機能に影響を与えなかった。

細胞の Foxp3 の発現と抑制機能に影響を与えなかった。

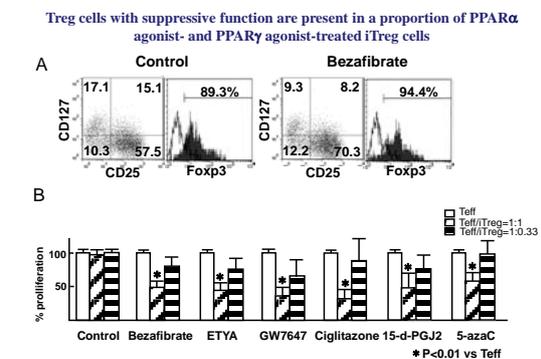
(2) iTreg 細胞に対する PPAR アゴニストの影響について検討した結果、PPAR $\alpha$  と  $\gamma$  アゴニストを投与した群では、コントロール群と比較して、5 種類とも Foxp3 の発現増強がみられた (図 1)。

### 図 1 PPAR アゴニストで誘導した iTreg 細胞に Foxp3 が高発現で維持される分画がある



機能的には、TGF- $\beta$  のみで誘導したコントロール iTreg 細胞は抑制機能がないが、PPAR アゴニスト投与群では、5 種類とも抑制機能があり、PPAR アゴニストは抑制機能を持つ iTreg 細胞を誘導することが明らかになった (図 2)。また、3 種類の PPAR $\alpha$  と 2 種類 PPAR $\gamma$  では抑制機能に差は認められなかった。

### 図 2 PPAR アゴニストで誘導した iTreg 細胞は抑制機能を持つ



(3) Foxp3 の発現に重要な役割を演ずるプロモーター領域および CNS3 領域のメチル化状態について検討した。nTreg 細胞では、両領域はほとんど脱メチル化されており、一方、ナイーブ T 細胞と TGF- $\beta$  のみで誘導したコントロール iTreg 細胞は、ほとんどメチル化された状態であったが、PPAR アゴニスト投与群は有意に脱メチル化されていた (図 3, 4)。

(4) 次に、DNA メチル化の維持や安定に重要な働きを示す DNMT の発現について検討した。3 種類すべての DNMT1, 3a, 3b の発現は、PPAR

アゴニスト投与群では著しく低下した (図 5)。

図 3 PPAR アゴニスト投与によって Foxp3 プロモーター領域は有意に脱メチル化される

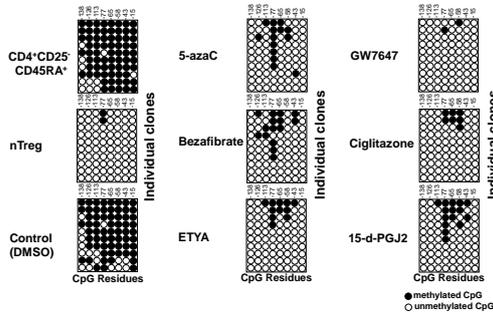


図 4 PPAR アゴニスト投与によって Foxp3 遺伝子のイントロン 1 内に存在する CNS3 領域は有意に脱メチル化される

DNA methylation of the first intronic CNS3 region was markedly decreased in PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  agonist-treated iTreg cells

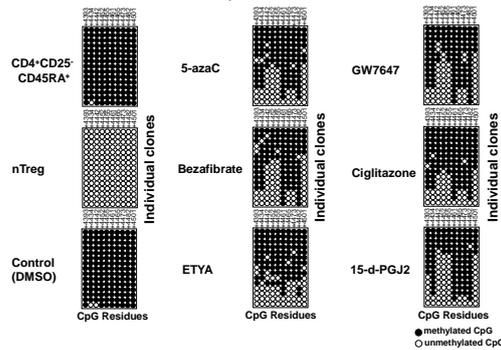
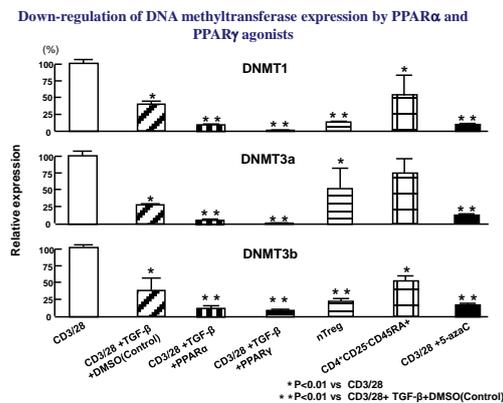


図 5 PPAR アゴニストは TGF-beta と協調して CD4 陽性 T 細胞の DNA methyltransferases の発現をほぼ完全に抑制する

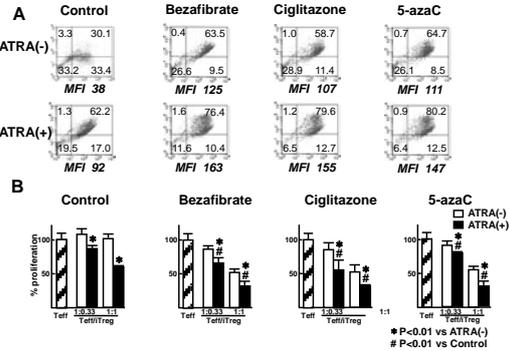


(5) TSA あるいは ATRA と PPAR アゴニストを併用すると、相乗効果にて iTreg 細胞の抑制機能が增强することが明らかになった (図

6)。

図 6 ATRA と PPAR アゴニストは相乗的に iTreg 細胞の誘導を亢進させる

Enhancement of Foxp3 expression and suppressive function of PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  agonist-treated iTreg cells with ATRA



(6) nTreg 細胞と iTreg 細胞に PPAR アゴニストを投与しても、TGF- $\beta$  と IL-10 の産生增强は認められなかった。

### 結論

ヒトのナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞を TGF- $\beta$  で誘導した iTreg 細胞は抑制機能を持たないが、PPAR $\alpha$  および  $\gamma$  アゴニストを添加した iTreg 細胞は抑制機能を持つようになった。この抑制機能の獲得は、TGF- $\beta$  と協調して PPAR アゴニストが DNMT 発現を抑制することによって、Foxp3 遺伝子プロモーターおよび CNS3 領域の脱メチル化が促進され、Foxp3 の発現が維持されることによる。Treg 細胞の機能の增强が報告されている TSA や ATRA と併用すると PPAR アゴニストは更に iTreg 細胞の抑制機能を亢進させた。

### B. LPC によるヒト nTreg 細胞の抑制機能の增强効果

(1) まず、nTreg 細胞に対する LPC の影響について検討した。その結果、LPC を添加すると、nTreg 細胞の Foxp3 の発現增强が認められ、抑制機能も增强した。この抑制機能增强効果は、抗 TGF-beta 抗体を加えると消失したが、抗 IL-10 抗体添加では消失しなかった (図 7)。

(2) さらに、LPC 添加後の nTreg 細胞のサイトカインの産生について検討した。LPC 処理 nTreg 細胞の TGF-beta1 の発現は遺伝子レベルおよび蛋白レベルともコントロールと比較して有意に增强していた。一方、IL-10 に関しては変化がなかった (図 8、9)。以上より、LPC を介した nTreg 細胞の Foxp3 の発現および抑制機能の增强は、TGF-beta1 の産生によることが示唆された。

図7 LPCはnTreg細胞のFoxp3の発現および抑制機能を増強させる

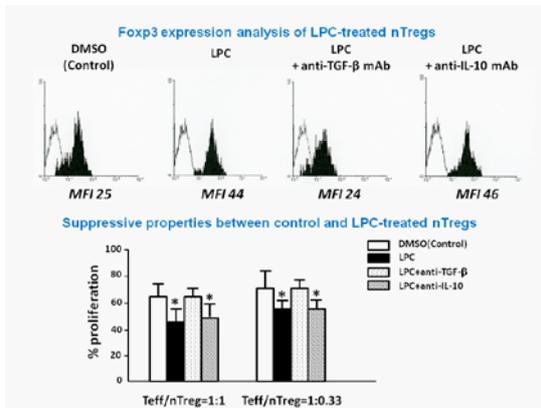


図8 LPCはnTreg細胞からのTGF-beta1の産生を増強させる

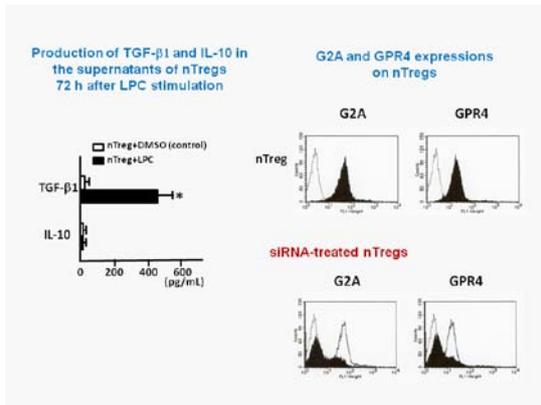
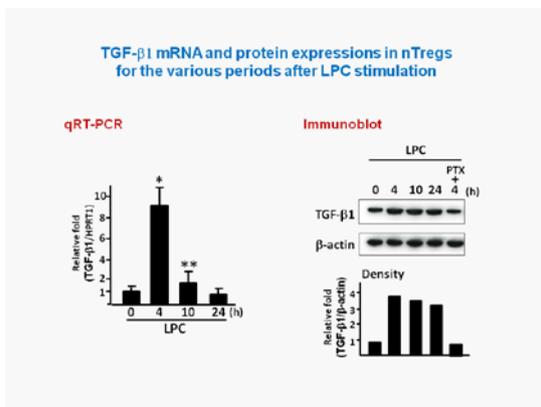


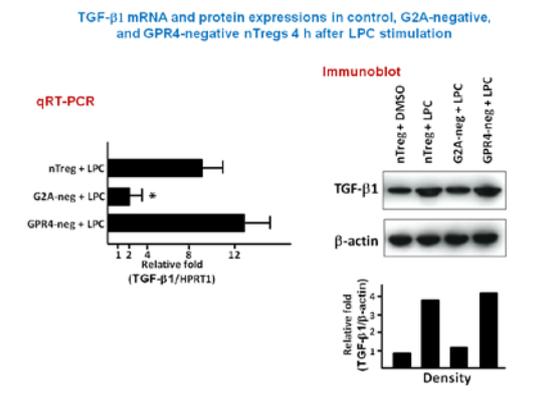
図9 LPCはnTreg細胞のTGF-beta1の遺伝子レベルおよび蛋白レベルの発現を増強させる



(3) 次に、LPCを介したnTreg細胞内シグナルについて解析した。LPCのレセプターとして今までG2AとGPR4の報告があるが、最近ではG2Aの方が示唆されている。図8で示して

いるように、nTreg細胞では、G2AおよびGPR4両方とも表面に発現されている。これらのレセプターとの結合を阻止する抗体がないため、siRNAを用いたノックダウン法を用いた。図8のようにG2AまたはGPR4をノックダウンしたnTreg細胞を作成し、LPC刺激後のこれらの細胞のTGF-beta1の発現を比較した。その結果、LPCはnTregs上のGPR4ではなく、G2Aを介して、TGF-beta1の発現を増強することが明らかになった(図10)。

図10 LPCはnTregs上のGPR4ではなく、G2Aを介して、TGF-beta1の発現を増強する



(4) LPC-G2Aを介したTGF-beta1の発現の増強に、MAPKsが関与するかどうか検討した。図11に示しているように、control nTreg細胞とGPR4-neg nTreg細胞は、LPC添加5分後より、ERK, p38, JNKのリン酸化(活性化)が認められた。一方、G2A-neg nTreg細胞は、LPC添加しても、ERK, p38, JNKのリン酸化(活性化)が認められなかった。また、SP600125(JNK阻害剤)を加えた時のみ、TGF-beta1の発現が低下したことより、MAPKsのうち、LPC-G2Aを介したTGF-beta1の発現の増強には、JNKが重要な働きをすることが示唆された(図12)。

図11 LPC-G2Aを介したTGF-beta1の発現の増強に、MAPKsが関与する

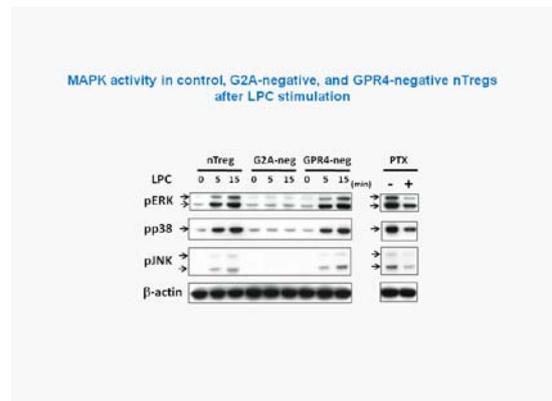
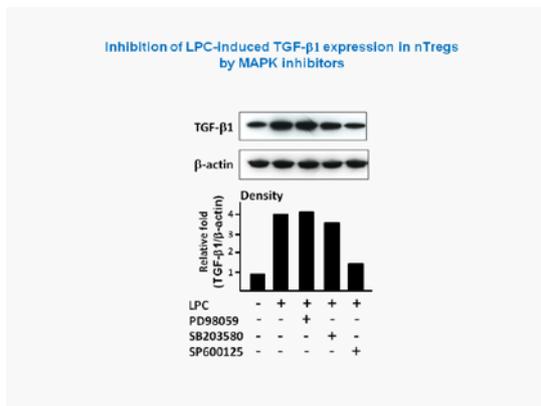


図 12 MAPKs のうち、LPC-G2A を介した TGF-beta1 の発現の増強には、JNK が重要な働きをする



### 結論

LPC は、nTregs からの TGF-beta1 の産生を亢進することにより、nTregs の Foxp3 の発現が増強し、抑制機能が亢進した。ノックダウンの実験から、LPC は nTregs 上の GPR4 ではなく、G2A を介して MAPKs (特に JNK) を活性化し、TGF-beta1 の産生を亢進した。LPC は末梢循環に多量に存在し、nTregs の維持や機能に関与している。また、RA などの慢性炎症部位では、LPC は蓄積し、炎症の増強に関与していると考えられているが、局所に nTregs が充分存在すると、炎症を抑制するホメオスタシスの役割を演ずるかも知れない。

以上より、これらの物質を用いることで、ヒト Treg 細胞の制御が可能になり、さらに抗原特異的ヒト Treg 細胞の作成も可能になり、自己免疫疾患の治療への応用が期待できる。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

- (1) Hasegawa H, Lei J, Matsumoto T, Onishi S, Suemori K, Yasukawa M. Lysophosphatidylcholine enhances the suppressive function of human naturally occurring regulatory T cells through TGF-β production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 415: 526-531, 2011.
- (2) Lei J., Hasegawa H, Matsumoto T, Yasukawa M. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha and

gamma agonists together with TGF-beta convert human CD4+CD25- T cells into functional Foxp3+ regulatory T cells.

*J. Immunol.* 185: 7186-7198, 2010.

(3) Murakami Y, Tanimoto K, Fujiwara H, An J, Suemori K, Ochi T, Hasegawa H, Yasukawa M. Human herpesvirus 6 infection impairs Toll-like receptor signaling. *Virology* 10;7:91, 2010.

(4) Nakatani K, Yoshimoto S, Iwano M, Asai O, Samejima K, Sakan H, Terada M, Hasegawa H, Nose M, Saito Y. Fractalkine expression and CD16+ monocyte accumulation in glomerular lesions: association with their severity and diversity in lupus models. *Am J Physiol Renal Physiol.* 299: F207-216, 2010.

〔学会発表〕 (計 8 件)

- (1) Hasegawa H, Lei J, Matsumoto T, Onishi S, Suemori K, Yasukawa M. Lysophosphatidylcholine enhances suppressive function of human naturally occurring regulatory T cells through TGF-β production. 75th Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology. Nov 8, 2011, Chicago, USA.
- (2) Matsumoto T, Hasegawa H, Lei J, Onishi S, Suemori K, Yasukawa M. Analysis of the bioactive molecules that promote the induction of human tolerogenic dendritic cells. 75th Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology. Nov 7, 2011, Chicago, USA.
- (3) 長谷川均、金 磊、松本卓也、大西佐知子、末盛浩一郎、安川正貴。ヒト制御性T細胞の誘導におけるPPARアゴニストとTSAまたはATRAの併用による相乗効果。第55回日本リウマチ学会総会。神戸。2011年7

月19日。

(4) 松本卓也、長谷川均、金 磊、大西佐知子、末盛浩一郎、安川正貴。ヒト免疫寛容樹状細胞の誘導を促進させる生理活性物質の探索。第55回日本リウマチ学会総会。神戸。

2011年7月18日。

(5) Hasegawa H, Miyazaki T, Lei J, Matsumoto T, Nose M, Yasukawa M. Antagonist of CXCL16 ameliorates the progression of vasculitis in arteritis-prone Mch5/lpr mice. 19th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages. May 26, 2011, Osaka, Japan.

(6) Hasegawa H, Lei J, Matsumoto T, Yasukawa M. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  and  $\gamma$  agonists together with TGF- $\beta$  convert human CD4+CD25- T cells into functional Foxp3+ regulatory T cells. 74<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology Nov 9, 2010, Atlanta, USA.

(7) 金磊、長谷川均、松本卓也、河野政志、安川正貴。PPAR $\alpha$ および $\gamma$ アゴニストによるヒト制御性T細胞への分化誘導機序。第54回日本リウマチ学会総会。神戸。2010年4月23日。

(8) 長谷川均、金磊、河野政志、松本卓也、安川正貴。PPAR $\alpha$ および PPAR $\gamma$ アゴニストはヒト制御性T細胞への誘導や機能を増強する。第39回日本免疫学会総会。大阪。2009年12月3日。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願なし。取得なし。

〔その他〕  
なし。

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 均 (HASEGAWA HITOSHI)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：40164826