

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 3 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590317

研究課題名(和文)RXRアゴニストを用いた免疫制御療法の開発

研究課題名(英文)Development of novel immunotherapies using retinoid X agonists

研究代表者

竹内 一 (Takeuchi, Hajime)

徳島文理大学・薬学部・准教授

研究者番号：00421298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：レチノイン酸受容体(RAR)からのシグナルはT細胞の分化を制御する。RARはRXRとヘテロ二量体から形成するが、RXRからのシグナルがT細胞分化に与える影響は不明である。今回我々はRXRシグナルが制御性T細胞(Treg)とTh17細胞の分化に与える影響を検定した。

RXRアゴニストは、in vitroではTregへの分化を促進しTh17細胞への分化を抑制することが示された。また、in vivoでもRXRアゴニストは同様の効果を示した。さらにTh17細胞が原因となって発症する自己免疫病マウスにRXRアゴニストを投与したところ、比較対照群に比べ有意に発症を遅延させることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Retinoic acid (RA) enhances TGF-beta-dependent differentiation of Foxp3+ inducible regulatory T cells (iTreg) and inhibits Th17 differentiation by binding to the retinoic acid receptor (RAR). It remained unclear if RXR-mediated stimulation affected the iTreg and Th17 differentiation. We found here that the RXR agonists augmented the ability of RA or the RAR agonist to enhance CD4+CD25- T cells to acquire Foxp3 expression and suppressive function.

RXR agonists alone suppressed ROR-gamma-t mRNA and IL-17 expression. The combination of an RXR agonist and RA additively suppressed Th17 differentiation when the concentration of RA was low. Accordingly, continuous treatment with an RXR agonist ameliorated experimental autoimmune encephalomyelitis. These results suggest that RXR stimulation enhances RAR-dependent and independent modulation of Foxp3+ iTreg and Th17 differentiation, respectively.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：RXRアゴニスト Th17 制御性T細胞 レチノイン酸

1. 研究開始当初の背景

制御性 T 細胞(Treg)による自己免疫疾患の治療は、動物実験では効果をあげており、臨床試験もすでに始まっている。この新しい治療法は、これまで対応が難しかった難治性疾患にも効果が上がることが期待されているが、すでにいくつかの問題点も明らかになりつつある。

まず、治療には純度の高い Treg が大量に必要とされる。Treg には胸腺で発生・分化する自然発生型 Treg(nTreg)と、ナイーブ CD4+T 細胞から末梢組織で分化する誘導型 Treg (iTreg) の二種類が存在する。このうち nTreg は、免疫制御能は高いものの末梢組織や in vitro で増殖させることが難しく、治療を目的として大量に用意するのが困難である。

この nTreg 使用上の問題点を解決するためには、nTreg に高い組織特異性を付与する方法が考えられる。狙った組織に効率よく nTreg を移入させることが出来れば、治療に必要な細胞数を大幅に減らせるはずである。そうなれば、少ない細胞数でも治療効果が期待され、患者の身体的な負担や医療コストの抑制にもつながる。これまでに我々の研究室では、レチノイン酸(RA)が T 細胞および B 細胞に対し小腸ホーミング特異性を付与する因子であることを明らかにした(Iwata et al. *Immunity* 21, 527-538, 2004; Mora et al. *Science* 314, 1157-1160, 2006)。RA はナイーブ T 細胞と同様に、nTreg に対しても小腸ホーミング受容体の発現を促し、小腸への移行を促進する。しかしナイーブ T 細胞の場合と異なり、RA 単独刺激による小腸ホーミング受容体 CCR9 の発現誘導効率は約 20%未満と決して高くは無い(Menning et al. *Eur. J. Immunol.* 40, 2539-2548, 2010; Takeuchi et al. *J. Immunol.* 185, 5289-5299, 2010; Karlsson et al. *Methods Mol. Biol.* 677, 47-61, 2011)。このような低効率の誘導条件下では、nTreg 移入は小腸の急性炎症には抑制効果があっても、より実際の疾患に近い慢性炎症には効果が見られなかった(Menning et al. *Eur. J. Immunol.* 40, 2539-2548, 2010)。最近我々は、RA 刺激にレチノイド X 受容体(RXR)刺激を加えることで、約 60%の nTreg に CCR9 の発現を誘導することに成功した(Takeuchi et al. *J. Immunol.* 185, 5289-5299, 2010)。この RXR 刺激を使って誘導された小腸型 nTreg であれば、慢性炎症にも治療効果が見られる可能性がある。したがって本研究ではまず、この RXR 刺激を用いて作製された小腸型 nTreg を使って、クローン病動物モデルである SAMP1/Yit マウスに移入実験を行い、強い組織ホーミング特異性を与えることで治療効果の改善をもたらすことが可能であるかについて検討する。

iTreg は、nTreg に比べ免疫制御活性はやや低いものの、抗原提示によりナイーブ CD4+T 細胞を活性化させる際に TGF- β を添

加すれば in vitro で作りだすことが出来、さらに分化の過程で細胞数を増やすことができるため、移入や末梢組織での分化誘導による治療に用いることが容易である。実際、iTreg を炎症抑制や自己免疫疾患の治療に利用しようとする試みはすでに行われている。しかしこれまでの報告では、ヒトにおける疾患治療では期待された結果が得られていないことが多い。この原因として、(1)iTreg の免疫制御能が体内では抑制されて働かないこと(Korn et al. *Nat. Med.* 13, 423-431, 2007)、(2)iTreg の形質が安定しておらず、周囲の環境、特にサイトカインの影響を受けて、別のサブタイプへと変化してしまうこと(Koenen et al. *Blood* 112, 2340-2352, 2008)、(3)患者由来の iTreg は健常人由来のものに比べ、免疫制御活性が低いこと(Viglietta et al. *J. Exp. Med.* 199, 971-979, 2004; Lindley et al. *Diabetes* 54, 92-99, 2005)、などが指摘されている。

近年、iTreg 分化誘導系に、RA を加えることで iTreg 分化を促進できることが報告された(Mucida et al. *Science* 317, 256-260, 2007; Benson et al. *J. Exp. Med.* 204, 1765-1774, 2007)。RA を添加して作られた iTreg は、従来のもより免疫制御活性が高く、形質もより安定的であることが報告されている(Wang et al. *J. Immunol.* 183, 4119-4126, 2009)。このことは、RA が iTreg の機能を強化し、上記の問題点を解決する上で有用な因子であることを示している。その一方で、RA 処理の限界もまた指摘されている。TGF- β +RA で高効率に iTreg へ分化誘導できるのは、ナイーブ T 細胞だけで、エフェクター/メモリー T 細胞は RA 添加に対してほとんど反応を示さないこと、さらにエフェクター/メモリー T 細胞が混入しているとこれらの細胞が様々なサイトカインを分泌することで、RA の働きを阻害し、周囲のナイーブ T 細胞の Treg への分化効率が低下することも明らかになった。

現在我々は、この誘導系に RXR アゴニストを添加することで、iTreg を非常に効率よく誘導できることを示す予備の実験結果を得ている。また RXR アゴニスト刺激による iTreg の誘導は、エフェクター/メモリー T 細胞の混入やサイトカインの影響にも抵抗性があることも示唆する結果も得られている。これらの結果から、RXR 刺激を組み合わせる誘導された iTreg(RXR-iTreg)は、RA による形質安定性と RXR 刺激によるサイトカイン抵抗性及び高効率分化誘導の利点を併せ持っていると推測される。これを踏まえて、本研究では RXR-iTreg を炎症性腸疾患および多発性硬化症モデルマウスに移入し、それらの発症の予防さらに症状の軽減や寛解導入が可能であるかどうかを検討する。

また、RXR アゴニストを直接投与することにより、in vivo で iTreg を効率よく誘導し症状を軽減できるならば、新たな治療薬の開発

にもつながることとなる。本研究では、この可能性についても検討するため、RXR アゴニストを疾患モデルマウスに投与し、疾患発症や症状の経過に与える影響を調べる。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 自然発生型制御性 T 細胞にレチノイン酸(RA)とレチノイド X 受容体(RXR)アゴニストを組み合わせた刺激を与えて、より強く小腸ホーミング特異性を付与し、効率的な炎症性腸疾患の治療方法を確立すること、(2) TGF-β+RA による誘導型制御性 T 細胞の分化誘導系に RXR アゴニストを加えることで、効率的に安定した形質を持つ Treg 分化誘導法を確立し、それを使って動物モデルにおける自己免疫病の治療を試みることを目的とする。

3. 研究の方法

RA と RXR アゴニストを組み合わせて nTreg に小腸ホーミング特異性を付与し、小腸型 nTreg を *in vitro* で作製する。この小腸型 nTreg を炎症性腸疾患モデルマウスに移入することで、RXR 刺激を加えた場合により効果的に病態の改善がみられるかどうかを調べる。

次に、TGF-β+RA を用いて iTreg の分化誘導する系に RXR アゴニストを加えて、*in vitro* で iTreg を安定的かつ高効率に誘導できる条件を検討する。同様に、RXR アゴニストが *in vivo* でも iTreg 分化を促進出来るかどうかについて、マウスに RXR アゴニストを投与する動物実験で確認する。

以上の結果に基づいて作製された iTreg を自己免疫病モデルマウスに移入し、あるいは RXR アゴニストを直接投与することで、それらの処置が病態の進行に与える影響を検定する。

4. 研究成果

(1) 小腸ホーミング特異性を付与した nTreg の炎症性腸疾患発症効果の検討

SAMP1/Yit マウスを用いた自然発症型炎症性腸疾患モデルマウスに、RA/RXR 刺激を与えた nTreg を移入し、発症までの期間を測定した。無刺激群や RA 単独刺激群と比較して RA/RXR 刺激群では、発症までの期間に有意な差は見られなかった。

(2) RXR 刺激による Treg/Th17 分化誘導への影響の検定

RXR 刺激が Treg 分化誘導に影響を与えるかどうかを調べるため、マウス CD4+CD25-T 細胞を単離し、TGF-β 存在下で活性化させて Treg への分化を誘導する実験系を用いた。この系に RA または RXR アゴニスト単独、さらに RA と RXR アゴニストを同時に添加し、Foxp3 の発現を指標として、Treg への分化に与える影響を検定した。その結果、RXR アゴニスト単独刺激でも Treg への分化誘導を促

進したが、RA と組み合わせることにより相乗的に分化誘導を促進することが明らかとなった。また、マウスナイーブ CD4+T 細胞を TGF-β と IL-6 存在下で活性化させて Th17 細胞へ分化誘導する実験系に RXR アゴニストを添加して分化に与える影響を検定した。その結果、RXR 刺激によって Th17 細胞への分化は抑制された。また RXR アゴニストと他の核内受容体のアゴニストを組み合わせて刺激したところ、RAR 刺激だけではなく、LXR 刺激とも相加的な抑制効果を示した。

次に、*in vivo* においても RXR アゴニストが同様の効果を示すことが出来るかどうかを調べた。まず、RXR アゴニストを用いることにより *in vivo* で Th17 への分化に影響を与えるかどうかを検定した。主に Th17 細胞が原因となって発症する実験性自己免疫性脳脊髄炎(EAE)マウスに、RXR アゴニストであるトリプチルスズ(TBT)を経口投与し、経過を観察した。その結果、TBT 投与群では、比較対照群に比べ有意に発症を遅延させることに成功した。また、TBT 投与をされた EAE マウスの所属リンパ節中の T 細胞を解析したところ、比較対照群と比べ Th17 の比率が有意に低下していた。これらの結果から、RXR アゴニストの投与により、*in vivo* での Th17 細胞分化が抑制できることが示唆された。

また、卵白アルブミン(OVA)-特異的な T 細胞受容体をもつナイーブ T 細胞を移入し、OVA を腹腔内注射することによって抗原感作させる実験モデルを使い、RXR アゴニストである PA024 が Treg 分化に与える影響を検定した。その結果、PA024 投与群では、脾臓において移入されたナイーブ T 細胞が Foxp3 陽性に転じる割合が有意に高いことが確認された。このことは、RXR アゴニストの投与によって、生体内で Treg への分化が促進される可能性を示唆している。

以上の結果から、RXR アゴニストは *in vivo* でも T 細胞の分化に影響を与え、その投与により生体内での免疫制御を行うことで、疾患治療への応用が可能であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1. Takeuchi, H., Yokota-Nakatsuma, A., Ohoka, Y., Kagechika, H., Kato, C., Song S.Y., Iwata M. (2013). Retinoid X receptor agonists modulate Foxp3+ regulatory T cell and Th17 cell with differential dependence on retinoic acid receptor activation. *J Immunol* 191, 3725-3733

[学会発表](計 4 件)

1. 竹内一、横田彩、大岡嘉治、岩田誠「制

- 御性 T 細胞分化における RXR シグナルの影響」、第 40 回日本免疫学会
2. 竹内二、中妻彩、大岡嘉治、影近弘之、岩田誠「Amplification of retinoic acid-dependent induction of Foxp3⁺ regulatory T cell differentiation by retinoid X receptor agonists and organotins」、第 41 回日本免疫学会
 3. Takeuchi, H., Yokota-Nakatsuma, A., Ohoka, Y., Kagechika, H., Song, S-Y., Iwata, M.「Characterization of the role of retinoid X receptor signaling in the differentiation of Th17」、第 42 回日本免疫学会
 4. 竹内二、中妻彩、大岡嘉治、影近弘之、宋時榮、岩田誠「制御性 T 細胞分化における RXR シグナルの影響」、第 24 回日本レチノイド研究会

〔図書〕(計 0 件)

〔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

徳島文理大学香川薬学部衛生薬学講座ホームページ

<http://kp.bunri-u.ac.jp/kph/index-14.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 一 (TAKEUCHI, Hajime)

徳島文理大学・香川薬学部・准教授

研究者番号：00421298

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：