

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2014～2016
課題番号：26670477
研究課題名(和文) GM-CSF産生Th細胞の分子制御メカニズム解明への挑戦

研究課題名(英文) Regulation of GM-CSF-producing Th cells

研究代表者
廣田 圭司(Hirota, Keiji)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：90631250
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、活性化Th細胞のGM-CSF産生制御に関わる特異的な表面分子としてTNFRSF18を同定した。TNFRSF18シグナル経路の活性化により、生体内エフェクター/メモリーTh細胞からのGM-CSF産生が増強され、このシグナルカスケードがGM-CSF産生制御に関わる鍵となる分子機構であることを見いだした。また、TNFRSF18シグナルは炎症組織Th細胞からのGM-CSF産生を増強し実験的自己免疫性脳脊髄炎発症に関わることを見いだした。従って、これらの分子機構を治療標的にした免疫制御法開発に向けて有用な知見がえられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified TNFRSF18 as a specific surface molecule for the regulation of GM-CSF by activated Th cells in vitro. The activation of TNFRSF18 signaling also induced GM-CSF production from effector/memory Th cells in vivo, indicating that this signal cascade is a key molecular pathway to specifically enhance production of GM-CSF. Furthermore, TNFRSF18-deficient mice were resistant to the development of experimental autoimmune encephalomyelitis, accompanying impaired production of GM-CSF by tissue infiltrating pathogenic Th cells. Thus, targeting this molecular pathway may be useful for a therapeutic means to prevent or treat the autoimmune disease.

研究分野：免疫学

キーワード：サイトカイン ヘルパーT細胞 GM-CSF

1. 研究開始当初の背景

造血因子である GM-CSF は、顆粒球細胞やマクロファージなどの細胞分化・増殖に関わり、血球系細胞のみならず非血球系細胞からも産生される。その中でも、T 細胞が代表的な GM-CSF 産生細胞であり、T 細胞受容体刺激に加え副刺激やサイトカイン刺激などさまざまな微小環境因子に応答して GM-CSF 産生は制御されている。現在、癌化学療法副作用である骨髄抑制や白血球減少の治療薬として GM-CSF 製剤が臨床応用されている一方、関節リウマチや多発性硬化症などの慢性炎症性疾患の炎症局所において高い GM-CSF 産生と病態慢性化機構の関連が疑われている。近年、自己免疫疾患の動物モデルを用いた研究から、GM-CSF 産生自己反応性 Th 細胞が病原惹起能の高い Th サブセットであること、加えてそのエフェクター機能はサイトカイン IL-1,IL-23 及び転写因子である Ror γ 1 によって制御されていることが報告された (Codarri et al. *Nature Immunology* 2011; El-Behi et al. *Nature Immunology* 2011)。また、我々の開発した IL-17 細胞系譜レポーターマウスを使った研究報告からも、GM-CSF 産生 Th サブセットはエフェクター機能発揮に IL-17 産生炎症性 Th 細胞と共通した上記のサイトカインや転写因子を必要とするだけでなく、実際 IL-17 産生炎症性 Th サブセットに起源を持つ細胞群であることが明らかとなっている (Hirota et al. *Nature Immunology* 2011)。しかしながら、GM-CSF 産生 Th 細胞のエフェクター機能制御に関する詳細なメカニズムは明らかになっていない。

GM-CSF 欠損マウスはさまざまな自己免疫疾患の動物モデルにおいて強い疾患抵抗性を示すことから、GM-CSF 産生機構の分子基盤の解明は、自己免疫疾患の新規概念の提唱に結びつくだけでなく、それらを分子標的とする創薬シーズ発掘につながる可能性がある。

2. 研究の目的

GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor) は古くから造血因子として知られているサイトカインの一つであるが、近年 GM-CSF 産生 T ヘルパー (Th) 細胞が関節リウマチや多発性硬化症の動物モデルにおいて病因惹起性の Th サブセットであることが明らかになってきた。しかしながら、Th 細胞が産生する GM-CSF の制御機構については不明な点が多く、その制御機構の分子基盤の解明は免疫難病である自己免疫疾患の予防・治療法開発という観点において重要課題である。我々は、細胞表面受容体シグナルと GM-CSF 産生制御という視点から、特異的に GM-CSF 産生を制御する分子シグナルを探索する。本研究では、この分子シグナルの下流制御分子の同定及び Th サブセット特異的な影響、さらに、生体内で

このシグナルを阻害したときの自己免疫疾患発症の有無に焦点を絞り研究を進展・展開する。

Th 細胞の GM-CSF 産生制御機構の分子基盤を解明することにより、将来、これらの創薬シーズを進展させ、免疫難病などの治療法が待たれている疾患に対する新規の予防・治療法の開発に結びつけたい。

3. 研究の方法

(1) ナイーブ Th 細胞表面に発現する副刺激分子の機能をスクリーニングし、GM-CSF 産生制御に関わる特異的分子をフローサイトメトリーを用いて解析した。また、同定した TNFRSF18 シグナルの分化後エフェクター Th 細胞に対する影響について解析をおこなった。加えて、GM-CSF の主要な産生細胞群である IL-17 産生 Th17 細胞および生体内エフェクター Th 細胞に対する TNFRSF18 シグナルの作用を評価した。

(2) 試験管内で TNFRSF18 シグナルを受けた活性化 Th 細胞の網羅的な遺伝子プロファイル解析を行った。具体的には、セルソーターを用いて純化したナイーブ Th 細胞を固相化 CD3/CD28 によって活性化し、アゴニスティック抗 TNFRSF18 抗体添加の有無によって、GM-CSF 産生能の異なる活性化 Th 細胞をえる。これらの細胞群から mRNA を抽出し、マイクロアレイを用いて変動遺伝子の同定を行った。また、別系として同様に純化した Th 細胞を野生型または TNFRSF18-リガンド欠損マウスから調整した抗原提示細胞と共培養後、TNFRSF18 とそのリガンドの相互作用の有無によって GM-CSF 産生能の異なる活性化 Th 細胞を純化し、同様に遺伝子プロファイルを解析した。これら二つの独立した系を用いることで候補分子を絞りこみ、変動の大きい遺伝子については個別に定量的 PCR 法で実験結果の検証をおこなった。

(3) 病態モデルの実験のため、TNFRSF18-リガンド欠損マウスの BALB/c, BL/6 背景へのバッククロスをおこなった。野生型および TNFRSF18-リガンド欠損マウスを用いて自己免疫疾患モデルを誘導後、GM-CSF 産生能と疾患感受性について細胞・個体レベルでの影響について検証をおこなった。誘導したモデルは、GM-CSF 産生自己反応性 Th 細胞の関与が確立されている自己免疫性関節炎 (Sakaguchi N et al. *Nature* 2003, Hashimoto M et al. *J Exp Med* 2010) と実験的自己免疫性脳脊髄炎である。疾患惹起後、所属リンパ節の GM-CSF 産生 Th 細胞の分化レベルや GM-CSF 産生能を、それぞれフローサイトメトリーと ELISA によって評価し、生体内での免疫応答時に TNFRSF18 とそのリガンドの相互作用が GM-CSF 産生 Th 細胞のエフェクター能獲得に必要なシグナルであることを明らかにする。

4. 研究成果

(1) ① GM-CSF 産生 Th 細胞の分化を誘導する特異的副刺激シグナル(Tnfrsf18)の同定

GM-CSF 産生制御に関わる特異的副刺激分子のスクリーニング (TNFRSF18, CD2, CD27, CD30, CD150, DR3, OX-40) をおこなった結果、TNFRSF18 シグナルをアゴニスティック抗体で刺激することにより GM-CSF 産生が特異的に増強した。即ち、単純な副刺激による活性化レベルの上昇のみではエフェクターサイトカインである GM-CSF 産生に影響は与えず、TNFRSF18 シグナルによって GM-CSF 制御に直接かかわる分子機構の活性化が示唆された。

② TCR 強刺激による GM-CSF 産生細胞分化の増強

GM-CSF 産生の調節機構の一つとして TCR シグナル強度を同定した。ナイーブ細胞からエフェクター細胞への分化過程において、TCR シグナル強度の差異が T ヘルパー細胞の分化に影響を与える。そこで、T 細胞活性化に関わる刺激の中で、TCR と CD28 シグナルの強度を変化させた条件を検討し GM-CSF 産生能を解析した。細胞内染色によって単細胞が産生する炎症性サイトカインをフローサイトメトリーで解析したところ、TCR 強刺激によって GM-CSF のみならず IL-3 の発現上昇が誘導されることを見いだした。GM-CSF と IL-3 を共産生する Th サブセットは、これまで提唱されている Th1, Th2, Th17 サブセットとはエフェクターサイトカインの発現パターンが異なっており、サイトカイン産生パターンから特に骨髄系細胞の分化・成熟化を誘導するユニークな Th サブセットであると考えられる。

③ 既存の GM-CSF 産生 Th17 サブセットに対する TNFRSF18 シグナルの影響

試験管内での Th17 誘導条件において、TNFRSF18 シグナルは Th17 細胞からの GM-CSF 発現上昇を強く抑制した。TNFRSF18 刺激から分化する GM-CSF 産生細胞は Th17 関連サイトカインを全く産生しない。従って、従来考えられてきた Th17 細胞が産生する GM-CSF 発現機構とは異なった制御機構が存在することが示唆された。さらに、Th17 細胞における TNFRSF18-GM-CSF 産生軸の抑制メカニズムの一つとして、Th17 細胞培養に添加している TGF-β が主要な役割を果たすことを見出した。

④ 生体内エフェクター/メモリー Th 細胞に対する TNFRSF18 シグナルの影響

生体内から CD44^{high} エフェクター/メモリー Th 細胞をフローサイトメトリーを用いて純化後、TNFRSF18 による再刺激を行った。活性化細胞からの IL-17 産生能に変化は見られなかったが、GM-CSF 産生を有意に上昇させた。上記の結果は、ナイーブ Th 細胞と分化後エ

フェクター Th 細胞両方に対して特異的であり共通のメカニズムを有した GM-CSF 制御機構の存在を示唆しており、GM-CSF を治療標的にした免疫制御法開発に向けた有用な知見である。

⑤ 生理的条件下における TNFRSF18 シグナルによる GM-CSF 産生制御

TNFRSF18 欠損マウスの抗原提示細胞を用いて活性化 Th 細胞の GM-CSF 産生能を試験管内試験で測定した。TNFRSF18 をアゴニスティック抗体刺激した時と同様に、TNFRSF18 欠損抗原提示細胞との共培養条件下では Th 細胞からの GM-CSF 産生能が有意に減少していた。また、TNFRSF18 を高発現する細胞として腹腔 B1 細胞を同定した。これらの結果から、生体内に TNFRSF18-リガンドを高発現する細胞が組織特異的に分布しており、免疫反応時にこれらの細胞と Th 細胞との相互作用が GM-CSF 産生に関わる鍵となり、時空間的制御機構の存在が強く示唆された。

⑥ TNFRSF18 発現細胞は制御性 T 細胞の抑制能を減弱する

生体内で TNFRSF18 を高発現する腹腔 B1 細胞を抗原提示細胞に使い制御性 T 細胞の抑制能を評価した。興味深いことに、TNFRSF18 の高発現はエフェクター Th 細胞の GM-CSF 産生に関わるのみならず、制御性 T 細胞の抑制能を有意に減弱し、エフェクター細胞の増殖・活性化を促進した。これらの結果から、B1 細胞が抗原提示細胞として関わる免疫反応では、非常に強い免疫応答と GM-CSF 産生が強く増強することが示唆された。これまで B1 細胞は一部自己免疫疾患の自己抗体産生に関わることが報告されていることから、TNFRSF18 が病因惹起能の一つの因子であることが示唆された。

(2) TNFRSF18 シグナルカスケードの下流分子の探索

Th 細胞を試験管内で抗 TNFRSF18 抗体及び TNFRSF18 欠損抗原提示細胞を用いて刺激後、TNFRSF18 依存性の遺伝子発現変化をマイクロアレイを用いて網羅的に解析した。両条件ともに遺伝子発現の重なる TNFRSF18 シグナル経路に依存した分子候補として 72 遺伝子を同定した。定量的 PCR 法を用いて検証作業を終了し、これら候補分子が直接的に GM-CSF 産生に関わるかどうかについて遺伝子の強制発現実験およびノックダウン実験をおこない検討作業を継続している。さらに、これらのアッセイ系から同定した分子に関しては Crispr/Cas9 法を用いた遺伝子改変マウス作製に進み、生体内での重要性についても引き続き検討をおこなっていく。

(3) TNFRSF18 欠損マウスは実験的自己免疫性脳脊髄炎に抵抗性を示す

生体内における TNFRSF18 シグナルによる自

己免疫疾患惹起能を調べるため、野生型と TNFSF18 欠損マウスを用いて自己免疫病モデルを誘導し病態と炎症組織に浸潤した細胞機能について解析をおこなった。自己免疫性関節炎および実験的脳脊髄炎ともに GM-CSF 依存性の病態を呈するが、自己免疫性関節炎の重症度スコア比較では有意な差が見いだせなかった。一方、TNFSF18 欠損マウスにおいて実験的脳脊髄炎の有意な重症度の低下が観察された。臨床的な表現型と一致して、組織に浸潤しているエフェクター細胞の GM-CSF 産生能を含む機能低下も確認できた。従って、TNFSF18 シグナルはエフェクター T ヘルパー細胞の機能を修飾し、自己免疫病の病態に重要な役割を果たすことを明らかにできた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- 1) Kitagawa Y, Ohkura N, Kidani Y, Vandenberg A, Hirota K, Kawakami R, Yasuda K, Motooka D, Nakamura S, Kondo M, Taniuchi I, Kohwi-Shigematsu T, Sakaguchi S. Guidance of regulatory T cell development by Satb1-dependent super-enhancer establishment. *Nat Immunol.* 18, 173-183. (2017) doi: 10.1038/ni.3646. (査読有)
- 2) Maeda Y, Kurakawa T, Umemoto E, Motooka D, Ito Y, Gotoh K, Hirota K, Matsushita M, Furuta Y, Narazaki M, Sakaguchi N, Kayama H, Nakamura S, Iida T, Saeki Y, Kumanogoh A, Sakaguchi S, Takeda K. Dysbiosis contributes to arthritis development via activation of autoreactive T cells in the intestine. *Arthritis Rheumatol.* 68, 2646-2661 (2016). doi: 10.1002/art.39783. (査読有)
- 3) Ito Y, Hashimoto M, Hirota K, Ohkura N, Morikawa H, Nishikawa H, Tanaka A, Furu M, Ito H, Fujii T, Nomura T, Yamazaki S, Morita A, Vignali D, Kappler J, Matsuda S, Mimori T, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Detection of T-cell responses to a ubiquitous cellular protein in autoimmune disease. *Science.* 346:363-8. (2014) doi: 10.1126/science.1259077. (査読有)
- 4) Di Meglio P, Duarte JH, Ahlfors H, Owens ND, Li Y, Villanova F, Tosi I, Hirota K, Nestle FO, Mrowietz U, Gilchrist MJ, Stockinger B. Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor Dampens the Severity of Inflammatory Skin Conditions. *Immunity.* 40:989-1001. (2014) doi: 10.1016/j.immuni.2014.04.019. (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

- 1) Keiji Hirota: An inflammatory cellular network of autoimmune Th17 cells, GM-CSF-producing ILCs and synoviocytes in the development of autoimmune arthritis, Keystone symposia, Immune Regulation in Autoimmunity and Cancer, March 26 - 30, 2017, Whistler, Canada
- 2) Keiji Hirota: Th17 cells orchestrate an inflammatory circuit in the development of autoimmune arthritis, World Immune Regulation Meeting X, 16 - 19 March 2016, Davos, Switzerland
- 3) Keiji Hirota: Generation of highly self-reactive T helper cells in SKG autoimmune arthritis, 第10回 研究所ネットワーク国際シンポジウム、2015年7月23日-24日、北海道
- 4) Keiji Hirota: T cell-dependent IgA responses by plastic Th17 cells, IMMUNOLOGY 2014, The American Association of Immunologists Annual Meeting, May2-6, 2014. Pittsburgh, Pennsylvania, USA.

〔図書〕(計 5 件)

- 1) 廣田圭司 「自己免疫性関節炎を惹起するヘルパーT サブセットと認識自己抗原」: 慢性炎症性疾患の新たな展開; 最新医学、最新医学社、2320-2325、7 1 巻 2016 年
- 2) 廣田圭司 「自然リンパ球の機能と腫瘍形成」: がん免疫療法のメカニズム解明と臨床への展開; がんと免疫、南山堂、37-41、2015 年 10 月 15 日発行
- 3) 廣田圭司、橋本求、坂口志文 「関節リウマチの病態形成に関与する T 細胞クローンの同定と新規自己抗原 RPL23A」: 感染・炎症・免疫、4 5 巻 3 号 67-70、Autumn 2015
- 4) 廣田圭司 「Th17 細胞の機能制御と自己免疫疾患」: 実験医学 増刊、羊土社、3 3 巻 1 2 号 (増刊) 1877-1881、2 0 1 5 年
- 5) 廣田圭司 「腸管パイエル板における IgA 産生に関与する T 細胞」: 臨床免疫・アレルギー科、科学評論社、61 巻 6 号 694-699、2014 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣田 圭司 (Keiji HIROTA)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・

准教授

研究者番号：90631250