

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860745

研究課題名(和文) 自己反応性T細胞の新規分化経路の自己免疫制御における役割の解明

研究課題名(英文) The characterization and role of the novel differential pathway of autoreactive T cells in immunological tolerance.

研究代表者

赤平 理紗 (Akahira, Lisa)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70725192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000 円

研究成果の概要(和文)：全身性核内自己抗原に反応し機能的Foxp3を欠くRDBLSfマウスを作製し、出現してくる自己反応性T細胞の挙動の解析によりトレランスの新規経路について解明した。この新規経路の自己反応性T細胞の検討をしたところ、PD-1やCD200などの一部表面分子と転写因子Bcl-6やHeliosの発現、IL-21産生やB細胞の抗体産生誘導能などの機能面では共通点を有しているが、自己抗原認識、従来のTfh細胞マーカーであるCXCR5が陰性、胸腺分化の点が異なっておりnatural TAH細胞(naturally occurring autoreactive B cell-helper T細胞)と位置づけた。

研究成果の概要(英文)：Clonal deletion and Foxp3+ regulatory T cell lineage commitment are well-known as the fate of autoreactive thymocytes. However, other pathways have not been fully clarified yet. On the other hand, the mechanism of autoantibody production in human disease remains incompletely understood. Here, we show that autoreactive CD4+ T cells can differentiate into naturally occurring autoreactive B cell-helper T (natural TAH) cells, which are rendered anergic in vivo, in the thymus of gene-manipulated and wild-type mice. Natural TAH cells are defined as IL-21-producing Bcl-6+Helios+ Foxp3-PD-1+CD200+CXCR5-CD4+ T cells, and promote B cells to produce immunoglobulin. Although Bcl-6 is required for generation of natural TAH cells, they can be distinguished from traditional follicular helper T cells in self-reactivity, CXCR5 expression, and ontogeny. This new differential pathway into natural TAH cells might be a key regulator of autoimmune disease with autoantibodies.

研究分野：臨床免疫

キーワード：自己反応性T細胞 免疫学的寛容 胸腺

1. 研究開始当初の背景

膠原病では全身性自己免疫が病因に関わっており、自己反応性 T 細胞の制御機構の理解は病態解明や治療に重要である。生体は様々な外来抗原への反応を可能にするため、多様な T 細胞受容体および B 細胞受容体を作り出す獲得免疫を持っている。一方、自己反応性リンパ球が同時に出現するリスクが常に内在している。しかし、通常自己免疫疾患を発症せずにいられるのは、T 細胞や B 細胞のような抗原特異的認識系を有する獲得免疫系が自己抗原に対して反応しなくなる状態、すなわちセルフトレランスを誘導、維持できているからである。トレランスは、主に胸腺における全身性自己抗原に対する中枢性 T 細胞トレランスと末梢自己抗原や食事抗原などに対する末梢性 T 細胞トレランスに分類される。これまで明らかになっているセルフトレランスのメカニズムとして、Burnet の提唱した clonal selection theory として知られる自己反応性 T 細胞が胸腺において negative selection により除去される clonal deletion の機構と Sakaguchi, S.(2000)、Kawahata, K.(2002)らが解明した主に自己反応性 T 細胞と考えられている Foxp3⁺制御性 T 細胞(Treg 細胞)への分化とそれによる制御が知られている。

これまで Recombination-activating gene2 (Rag2) を欠損したマウスに Ovalbumin(OVA)に特異的な T 細胞受容体をもつ transgenic マウス (DO11.10) を交配し、さらに全身の核内に OVA を発現する Ld-nOVA マウスと交配して RDBLSf マウスを作成し、全ての T 細胞が全身性自己抗原反応性で機能的 Foxp3 を欠くマウスで検討を行った。その結果、皮膚以外に臓器障害をおこさないことが判明し、また中枢性 T 細胞トレランス機序に基づき胸腺で自己反応性 T 細胞が IL-21 を産生する T 細胞に分化することが明らかになった。

しかし、既知の clonal deletion と Foxp3⁺制御性 T 細胞への分化以外の制御抑制機能としての本細胞の生理的意義と病的意義には不明な点も多く、そのメカニズムの検討、解析が期待されていた。

2. 研究の目的

- ① これまでの研究で、中枢性 T 細胞トレランスの新規機序として自己反応性 T 細胞の新規サブセットが明らかになったが、本細胞の特徴的表面分子、マスター遺伝子、主要産生サイトカインに関して検討を重ねる。
- ② 樹立した遺伝子改変マウスモデルを用いて、本細胞の機能面での検討を行い本細胞の意義を解明する。
- ③ 本細胞が特殊な遺伝子改変マウスだけではなく、野生型マウス (WT) やヒトにおいても存在することを明らかにし、生体的意義に関して検討する。

3. 研究の方法

1) マウスの準備：

Scurfy BALB/c マウス、Foxp3-GFP BALB/c マウス、TCR α 欠損 BALB/c マウスは各々 Scurfy C57BL/6 マウス、Foxp3-GFP C57BL/6 マウス、TCR α 欠損 C57BL/6 マウスと BALB/c マウスを 6 世代以上交配させて作製した。また、Ld-nOVA トランスジェニックマウスは、Ld class I プロモーター、ヒト E μ エンハンサー下に核移行シグナルを付加したニワトリ卵白アルブミン(OVA)を組み込んだベクターを用いて当研究室にて作製されており (Kawahata, K. ら 2002)、Ld-nOVA BALB/c マウスは Ld-nOVA C57BL/6 マウスと BALB/c マウスを 8 世代以上掛け合わせて作製する (Kawahata, K. ら 2002)。
尚、全ての T 細胞が全身性自己抗原反応性となり機能的に Foxp3 欠損を欠損した遺伝子改変マウス RDBLSf マウスは、背景で記載したように作製されている。Bcl-6 欠損マウスは徳久先生 (千葉大学大学院医学研究院分化制御学教室) より提供して頂き準備した。

2) 解析：

特徴的な表面分子・転写因子の同定

マイクロアレイの結果、IL-21, Helios, PD-1, CD200, ICOS が RDBLSf マウスの脾臓の T 細胞で非常に強く発現しており特徴的発現遺伝子と考えられたため、RDBLSf マウスの脾臓、胸腺から T 細胞を MACS システムを用いて分離し Flow cytometry で表面分子、マスター遺伝子、サイトカインなどを解析した。

DBL マウスにおける本細胞の分化と自己反応性に関して

本細胞が Rag2 と機能的 Foxp3 を欠く特殊な条件下のみで生じるのか検討する為、核内自己抗原反応性 T 細胞を有するが Rag2 が存在し TCR 改変も生じ Treg 細胞も存在する DBL マウスで評価した。

本細胞の抗体産生誘導能

RDBLSf マウスの T 細胞を WT マウスの B 細胞と共培養して ELISA を用いて抗体産生誘導能を検討した。B 細胞が存在しつつ本細胞の多い TCR α 欠損 DBL マウスで Flow cytometry や免疫蛍光法によって検討した。また同マウスを用いて、total IgG 及び OVA 特異的 IgG 産生を ELISA で測定し、抗核抗体の力価も評価した。

本細胞の増殖・制御機能

in vitro ではチミジンをを用いた細胞増殖アッセイで増殖能を評価した。また in vivo では Thy1.1⁺RDBLSf マウスおよび Thy1.2⁺RDBLSf マウス由来の OVA 反応性 TCR をもつ CD4⁺T 細胞を混合した後 CFSE ラベルし、核内に OVA を発現している Ld-nOVA マウスに移入した後、各々の分裂能を Thy-1 のアロタイプの違いを利用して、CFSE の蛍光強度にて評

価した。

WT マウスにおける検討

Flow cytometry や RT-PCR 法により WT マウスの脾臓、胸腺において本細胞の特徴的表面分子やマスター遺伝子、サイトカインの発現を評価した。

4. 研究成果

1) 新規分化経路の特徴の確認

RDBLSf マウスの系で出現してきた自己反応性 T 細胞は自己抗原により胸腺で誘導され、表面分子は CD200、PD-1、ICOS、転写因子として Bcl-6、Helios が特徴的であり主要サイトカインは IL-21 であることが、Flow cytometry の解析により明らかになった。Follicular helper T 細胞 (Tfh 細胞) と共通する点が多く、Tfh 細胞類似の新たなサブセットと考えられたが、CXCR5 が陰性である点が従来の Tfh 細胞と異なっていた。

核内自己抗原反応性 T 細胞を有するが Rag2 が存在し TCR 改変も生じ Treg 細胞も存在する DBL マウスで評価したところ、PD-1⁺Helios⁺Foxp3⁺CD4⁺T 細胞が出現し IL-21 を産生していた。また、DBL マウスでは PD-1⁺Foxp3⁺CD4⁺T 細胞が Treg 細胞より自己反応性の強い population から出現していることが判明した。本細胞が自己反応性 T 細胞である点も従来の Tfh 細胞と異なる。

さらに、DBL マウスの胸腺で CD4 single positive T 細胞に IL-21 産生細胞が存在し、また胸腺を欠く n/nDBL マウスの末梢には本細胞が出現しなかったことから、胸腺由来であることが判明しており、この点も従来の Tfh 細胞との相違点であった。

2) 抗体産生誘導能

RDBLSf マウスの PD-1⁺CD200⁺CD4⁺T 細胞は IL-21 産生能を持ち、表面マーカーの一部と転写因子が従来の Tfh 細胞と共通していたことから、WT マウスの B 細胞と共培養して抗体産生誘導能を持つかどうか ELISA を用いて検討した。RDBLSf マウスの CD4⁺T 細胞は、RDOSf マウスの CD4⁺T 細胞、WT マウスの Tconv 細胞、WT マウスの Treg 細胞と比較しクラススイッチ後の IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgA の抗体産生誘導能が高いことが確認された。

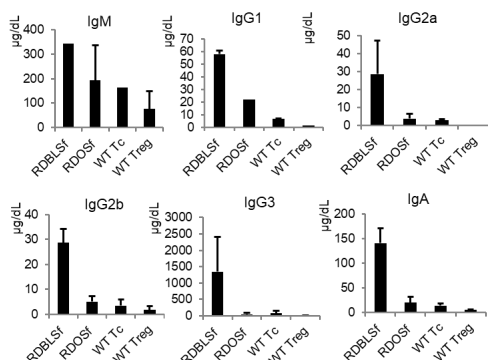


図 1: RDBLSf マウスの CD4⁺T 細胞は RDOSf マウスの CD4⁺細胞や WT マウスの Tc, Treg 細胞と比較して免疫グロブリン産生能が高い。

また、培養 2 日目の培養細胞の遺伝子発現を RT-PCR 法により検討したところ、RDBLSf マウスの CD4⁺T 細胞と共培養した時は WT マウスの Treg 細胞や Tconv 細胞と共培養した時よりもクラススイッチ誘導に必要な AID が強く発現していることから本細胞の抗体産生誘導能は支持される。この新規サブセットが抗体産生誘導能を持ち、1) から胸腺由来の自己反応性 T 細胞であることを合わせて、naturally occurring autoreactive B cell-helper T cells (natural T_{AH} 細胞) と呼ぶこととした。DBL マウスより自己反応性が強い TCRα 欠損 DBL マウスでは、DBL マウスより natural T_{AH} 細胞を多く有することがわかり、また ELISA で測定した total IgG 及び OVA 特異的 IgG 産生、抗核抗体の力価に関しても、TCRα 欠損 DBL マウスにおいて亢進していた。

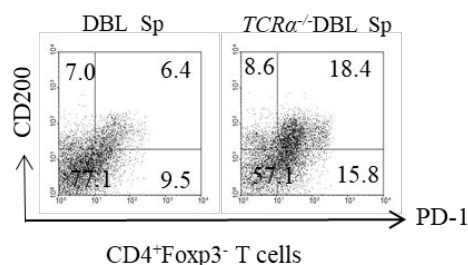


図2-1:DBL マウスより自己反応性が強い TCR α^{-/-}DBL マウスの脾臓では、natural T_{AH} 細胞が増加していた。

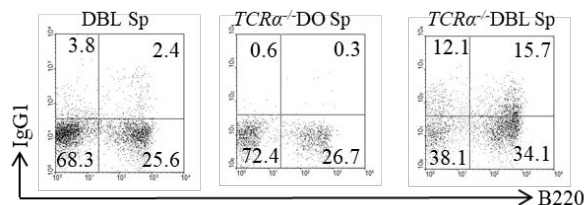


図 2-2: DBL マウス、TCR α^{-/-}DO マウスに比べ TCR α^{-/-}DBL マウスでは B 細胞の IgG1 の産生も高い。

3) 制御機能

本細胞は in vitro ではチミジンをを用いたアッセイで抑制能が認められず、仮説に反する結果であったが、RDBLSf マウスの T 細胞の生体内での増殖能を調べるため、免疫原性を持たない Thy1 のシステムを用いて実験を行った。

移入後 4 日での flow cytometry による解析結果では、Thy1.2⁺RDBLSf マウス由来の CD4⁺T 細胞は Thy1.1⁺RDOSf マウス由来の

CD4⁺T 細胞と比較して、CFSE の蛍光強度が高いままで分裂が進んでおらず増殖していないことが示された。同時に、移入した OVA 反応性 TCR をもつ T 細胞を KJ1-26 で染色し追跡したところ、Thy1.1⁺KJ1-26⁺ の Thy1.1⁺RDOSf マウス由来の T 細胞が 91.5%であったのに対して、Thy1.1-KJ1-26⁺ の T 細胞すなわち Thy1.2⁺RDBLSf マウス由来 T 細胞が 6.4%となっており、移入時は 1:1 の同率で移入していることから、in vivo で RDOSf マウス由来の T 細胞は増殖しており RDBLSf マウス由来の T 細胞は増殖能が低いことが判明した。RDBLSf マウス由来の T 細胞は、サイトカイン産生などの機能は有しているが増殖に関しては anergy である状態、すなわち split anergy であることは再確認された。

4) Bcl-6 欠損マウスの解析

従来の Tfh 細胞が Bcl-6 をマスター遺伝子としていることから、新規の natural T_{AH} 細胞に関しても発現が確認されている Bcl-6 が重要な転写因子と考えられるため、Bcl-6 欠損マウスの脾臓、胸腺における natural T_{AH} 細胞を flow cytometry で解析した。その結果、Bcl-6 欠損マウスでは natural T_{AH} 細胞がほとんど消失していた。

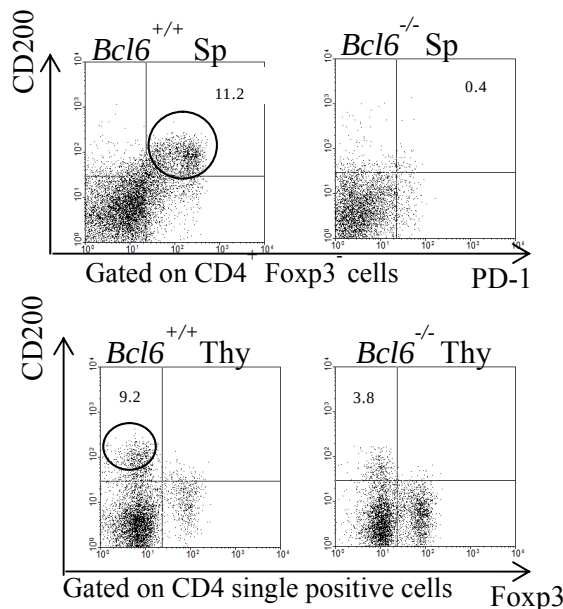


図 3: Bcl-6^{+/+}マウスと Bcl-6^{-/-}マウスの脾臓由来の細胞を flow cytometry にて比較検討したところ、Bcl-6^{-/-}マウスの脾臓では PD-1⁺CD200⁺ Foxp3⁺CD4⁺T 細胞すなわち natural T_{AH} 細胞が消失している。また Bcl-6^{+/+}マウスと Bcl-6^{-/-}マウスの胸腺由来の細胞から flow cytometry にて比較検討したところ、Bcl-6^{-/-}マウスの胸腺では CD200⁺Foxp3⁺ single positive T 細胞は著減していた。

5) WT マウスにおける解析

natural T_{AH} 細胞が特殊な遺伝子改変マウスだけではなく、野生型マウス (WT) にも存在するかどうかを確認するため、flow cytometry や RT-PCR 法にて解析を行った。NKT 細胞との相違を CD1d/α-ガラクトシルセラミドの四量体分子で染色することによって確認しながら、natural T_{AH} 細胞が WT マウスの末梢で出現していることが flow cytometry にて確認された。

また、Foxp3 を GFP にて可視化した WT マウスである Foxp3-GFP BALB/c マウスの脾臓、胸腺において Treg 細胞、PD-1 陰性の Tconv 細胞、Foxp3⁺PD-1⁺CD4⁺T 細胞 (natural T_{AH} 細胞) を flow cytometry で sorting し、RT-PCR 法により本細胞に特徴的である IL-21、Helios、Bcl-6 の発現を比較検討した結果、WT マウスの脾臓では natural T_{AH} 細胞で IL-21、Helios、Bcl-6 の発現を強く認め、一部 Treg 細胞でも Helios と Bcl-6 の発現を若干認めた。WT マウスの胸腺でも natural T_{AH} 細胞で IL-21、Helios、Bcl-6 の発現を強く認め、他 Treg 細胞や Tconv 細胞では認めなかった。

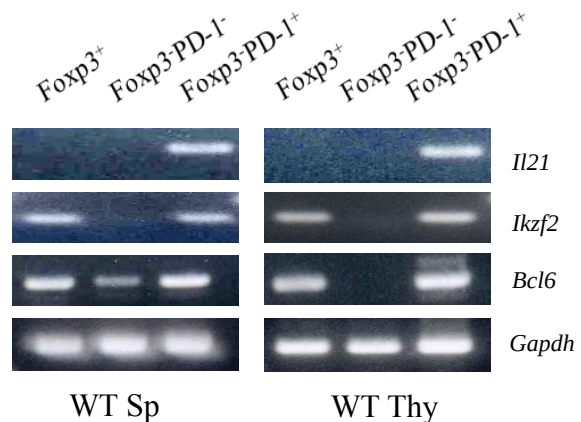


図 4: WT マウスの脾臓、胸腺において Foxp3⁺CD4⁺T 細胞(Treg)、Foxp3⁺PD-1⁺CD4⁺T 細胞(Tconv)、Foxp3⁺PD-1⁺CD4⁺T 細胞(natural T_{AH} 細胞)を flow cytometry の sorting 機能を用いて分離し、各々RT-PCR を行い IL21(IL-21)、IKZF2(Helios)、Bcl6(Bcl-6) の発現を比較検討したところ、natural T_{AH} 細胞では IL21(IL-21)、IKZF2(Helios)、Bcl6(Bcl-6)の発現が高かった。

以上より、WT マウスでも natural T_{AH} 細胞の存在が示唆された。しかしながら、WT マウスでの natural T_{AH} 細胞の絶対数は少なく、WT マウスでの本細胞の機能的な評価は実施できていない。

健常ヒトの末梢でも flow cytometry にて表面分子、転写因子が一致する natural T_{AH} 細胞が存在していることが示されているが、生理的意義としての自然抗体形成への関与までの検討は不十分である。自己免疫制御における役割、自己抗体産生への関与としての病的意義、そのバランスの検討には課題が残されているが、関節リウマチにおいて natural T_{AH} 細胞の特徴と一致するような PD-1^{high}CXCR5⁺T 細胞が増加している報告 (Nature. 2017;542(7639):110-114, Trends in Immunology. 2017;38(12):875-878,) や SLE において natural T_{AH} 細胞と類似する IL-21-producing CXCR5⁺CD4⁺T cells が認められるという報告 (J Rheumatology. 2012;39:1819-1828) もあり、引き続き実験系を維持し、ヒトの自己免疫疾患における natural T_{AH} 細胞の役割を明らかにするため、解析研究を継続したい。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤平 理紗 (AKAHIRA LISA)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70725192