

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 9 月 30 日現在

機関番号：14501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893150

研究課題名(和文)トレランス誘導による自己抗原特異的な免疫抑制療法

研究課題名(英文) Establishment of autoantigen-specific immune suppressive therapy induced by self-tolerance

研究代表者

笠木 伸平 (Kasagi, Shimpei)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80457051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,000,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究では、1型糖尿病モデルマウスを用いて、GAD65に特異的な制御性T細胞を選択的に誘導することができ、また、長期的な寛解を得ることができた。抗CD20抗体+GAD65併用療法により得られる長期的な寛解にはTGF $\beta$ が関与していることまでは明らかにしたが、制御性T細胞やマクロファージなど、他の細胞が必須なのか、そもそもメカニズムは何なのかについては未だ十分に明らかにはなっていない。そのため、今後の課題として検討を継続していく。

研究成果の概要(英文)：Here we utilized Type 1 diabetes model mice and established autoantigen-specific immune suppressive therapy mediated by self-tolerance. Combination therapy of anti-CD20 antibody(B cell depletion therapy) followed by administration of self-peptide (GAD65) in NOD mice achieved long-term disease remission. We revealed that disease remission was achieved by selective induction of GAD65-specific regulatory T cells and, also, TGF $\beta$  was indispensable in this therapy. However, the mechanism still remains unclear and additional experiments are required to examine the role of macrophages and other immunoregulatory cells than regulatory T cells.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫寛容

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) 自己免疫疾患とは本来は異物を認識して排除する役割をもつ免疫機構が、自己の正常な組織に対しても攻撃を加えるようになった結果全身の臓器が障害される疾患である。本疾患に対してステロイドや免疫抑制剤による薬物療法が現在の治療の中心であるが、これらは、自己免疫異常のみならず、正常な感染免疫や腫瘍免疫をも抑制するため、感染症や悪性腫瘍の誘発等の副作用を有する。抗原特異的な免疫抑制療法(薬物療法)は、未だ確立されていないが、自己免疫異常を選択的に抑制し、感染免疫や腫瘍免疫には影響を与えにくいと考えられるため治療の副作用の軽減が期待される。
- (2) 抗CD3抗体療法によりT細胞はアポトーシス死するが、アポトーシス死したT細胞を体内のマクロファージ(MΦ)や樹状細胞(DC)が貪食すると大量のTGFβ(抗炎症性サイトカインのひとつ)が産生放出されること、MΦやDCから産生されたTGFβにより抗炎症作用をもつ制御性T細胞(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞)が誘導されることがこれまでに報告されている。(Nature Medicine 2008 (14) 528-535)
- (3) *In vitro*にてナイーブT細胞は抗原提示細胞による抗原提示、およびTGFβの存在下にて抗原特異的な制御性T細胞に分化する。(JEM 2003 (198) 1875-1886)

以上の研究背景を元に自己抗原特異的な制御性T細胞を*In vivo*で誘導する方法の仮説を立てた。(研究目的を参照ください)この方法が確立できたのであれば、他の抗原(感染抗原や腫瘍抗原など)に対する免疫反応には影響を与えないため、今後の臨床に対するインパクトは多大であると考えられる。

(4) 1型糖尿病モデルマウス(NOD 雌マウス)では免疫異常により、インスリン産生β細胞の機能が廃絶する。GAD<sub>65</sub>が1型糖尿病における自己抗原として知られている。

## 2. 研究の目的

本研究では自己抗原を利用した自己抗原特異的な制御性T細胞の誘導(*in vivo*)とその治療への応用を目指すものとした。具体的には、自己免疫疾患モデルマウスに対して、B細胞にアポトーシスを誘導する抗CD20抗体(薬剤名:リツキシマブ)を投与し、アポトーシス死したB細胞を体内のマクロファージ(MΦ)や樹状細胞(DC)が貪食すると大量のTGFβ(抗炎症性サイ

トカインのひとつ)が産生放出される微小環境を作り出す。それに引き続いて、自己抗原を投与することで自己抗原と大量のTGFβの存在下で自己抗原特異的な制御性T細胞の分化に有利な状況を作り上げることができれば目的を達成できると考えられた。すなわち、CD20抗体と自己抗原の併用療法で1型糖尿病モデルマウスにおいて、糖尿病の進行を防止できるかどうかについて検討を行った。

## 3. 研究の方法

Step 1) NOD 雌マウスに対して6週齢の時点で、GAD<sub>65</sub>+CFAで免疫し、新規に糖尿病を発症した時点(通常12週齢以降)でB細胞除去抗体である抗CD20抗体を投与する。

Step 2) Step1の抗体療法の施行翌日から低容量(5μg/マウス、腹腔内投与)を2週間にわたり隔日投与を行う。

Step 3) 一部のマウスに対しては、抗体療法の施行翌日から2日間連続して抗TGFβの中和抗体(anti-TGFβと表記)あるいはそのIsotype Controlの抗体(Control IgGと表記)を腹腔内投与した。

Step 4) マウスが23週齢に到達した時点で、マウスをsacrificeした。

この実験系において、抗体+自己抗原の併用療法でGAD<sub>65</sub>特異的な免疫反応が抑制され1型糖尿病の長期寛解が得られるかどうかについて検討を行った。週2回、定期的に血糖測定を行い、糖尿病の進行により極度の脱水となり補液でも生命の維持が困難と考えられたマウスに対しては安楽死させ、脾臓と膵臓リンパ節を回収した。これらの細胞を*In vitro*でGAD<sub>65</sub>抗原やTCRへの非特異刺激(抗CD3抗体で刺激)で再刺激し、GAD<sub>65</sub>特異的な免疫反応(細胞増殖能あるいはIFN-γ産生能)を、それぞれ、<sup>3</sup>H(サイミジン取り込み試験)やELISA法などで評価し比較した。

GAD<sub>65</sub>特異的なCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性T細胞の増加の有無は、直接標識できる抗体がないため、評価が困難であるが、下記の方法で代用した。すなわち、同じマウスの脾臓からCD4<sup>+</sup>T細胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞を磁気細胞分離装置とビーズを使って分離し、それぞれの分画から同数の細胞数を得て抗原提示細胞(マクロファージや樹状細胞)と抗原(GAD<sub>65</sub>抗原あるいは非特異抗原)の存在下で培養する。この時、GAD<sub>65</sub>特異的なCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性T細胞が脾臓で増加しているマウスにおいては、抗原提示細胞+GAD<sub>65</sub>抗原存在下で刺激したCD4<sup>+</sup>T細胞の増殖能やサイトカイン産生能はコントロ

ールと比べて有意に低下すると考えられるが、CD4+CD25+制御性 T 細胞を含まない CD4+CD25- T細胞を抗原提示細胞+ GAD<sub>65</sub> 抗原で刺激した場合には、コントロールと比べて差がなくなることが予想された。

#### 4. 研究成果

自己免疫のみを特異的に抑制する治療法を確立するため、型糖尿病モデルマウスを用いて、抗 CD20 抗体に引き続き、自己抗原 (GAD<sub>65</sub>) を投与することで GAD<sub>65</sub> に対する免疫反応のみを特異的に抑制し、かつ長期的な寛解が得られるかどうかを検討した。抗 CD20 抗体+ GAD<sub>65</sub> の併用療法をうけたマウス (aCD20+GAD<sub>65</sub> と表記) では長期的な寛解を得られたが、抗 CD20 抗体の単独療法をうけたマウス (aCD20 と表記) では短期的な寛解を得られた後に再発を認めた。GAD<sub>65</sub> のみを投与したマウス (GAD<sub>65</sub> と表記) と無治療のマウス (PBS と表記) の両群において、型糖尿病の発症率には差を認めなかった。以上より、型糖尿病の長期的な寛解には、抗 CD20 抗体と GAD<sub>65</sub> の両方が必要と考えられた。(図 1)

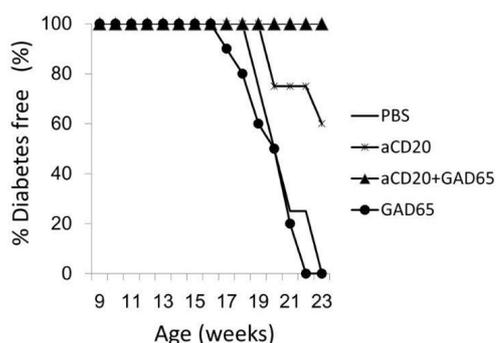


図 1 抗 CD20 抗体+GAD<sub>65</sub> 併用療法は糖尿病の進展を遅らせる

縦軸は%Diabetes Free(糖尿病でないマウスの割合)、横軸はマウスの週齢を示す。PBS,aCD20, aCD20+GAD<sub>65</sub>, GAD<sub>65</sub>:n=10。2 回の実験のうち代表的な 1 つを表示。

次に、抗 CD20 抗体+GAD<sub>65</sub> 併用療法は糖尿病の進展を遅らせる効果に TGFβ が関与しているかどうかを検討するために、抗体療法の施行翌日から 2 日間連続して抗 TGFβ の中和抗体 (anti-TGFβ と表記) あるいはその Isotype Control の抗体 (Control IgG と表記) を腹腔内投与した。その結果、抗 TGFβ の中和抗体により抗 CD20 抗体+GAD<sub>65</sub> 併用療法は糖尿病の進展を遅らせる効果が中和された。(図 2)

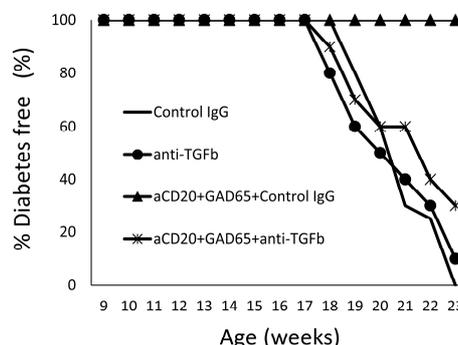


図 2 抗 CD20 抗体+GAD<sub>65</sub> 併用療法の糖尿病の進展を遅らせる効果に TGFβ が必須である。縦軸は%Diabetes Free(糖尿病でないマウスの割合)、横軸はマウスの週齢を示す。PBS,aCD20, aCD20+GAD<sub>65</sub>, GAD<sub>65</sub>:n=10。2 回の実験のうち代表的な 1 つを表示。

続いて、図 1 の実験系で併用療法と単独療法との 2 群間のマウスの脾臓細胞の機能を比較検討した。その結果、GAD<sub>65</sub> 特異的な免疫反応 (増殖能と IFN-γ 産生能) は、併用療法群では単独療法群と比較して有意に低下していた。(図 3) 一方で、自己抗原以外の非特異的な抗原 (抗 CD3 抗体を使用) に対する免疫反応は 2 群間で差を認めなかった。(データ未表示) 以上のことから、併用療法群では GAD<sub>65</sub> (自己抗原) 特異的な免疫反応が選択的に抑制されていると考えられた。

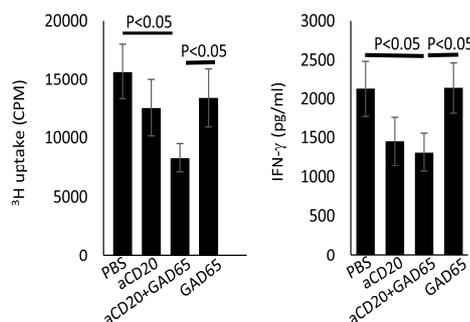


図 3 抗 CD20 抗体+GAD<sub>65</sub> 併用療法により GAD<sub>65</sub> 特異的な免疫反応は抑制される

各群のマウスから、脾臓を取り出し、GAD<sub>65</sub> で刺激を行い、脾細胞の増殖能と IFN-γ 産生能をそれぞれ、<sup>3</sup>H の取り込みと、細胞培養液中の IFN-γ 濃度を ELISA 法で測定した。2 回の実験のうちの代表的な 1 回を示す。(One way Anova 法で統計解析を行った)

次に制御性 T 細胞 (CD4 陽性 CD25 陽性) を選択的に脾臓 CD4 陽性 T 細胞から分離した場合と分離しなかった場合とで、自己抗原 (GAD<sub>65</sub>) 特異的、あるいは、非特異的な抗原に対する免疫反応に与える影響を検討した。

制御性 T 細胞を分離した後の細胞数は、分離する前と同等になるように調整を行った。すなわち、それぞれの分画から同数の細胞数を得て抗原提示細胞（マクロファージや樹状細胞）と抗原（GAD<sub>65</sub> 抗原あるいは非特異抗原）の存在下で培養した。その結果、併用療法群では、単独療法群と比較して自己抗原特異的な免疫反応（IFN- $\gamma$ 産生能）は、制御性 T 細胞の分離操作（操作前を CD4<sup>+</sup>、操作後を CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>と表記）後は操作前よりも著しく亢進した。一方で、抗原非特異的な免疫反応（抗 CD3 抗体で刺激）は、制御性 T 細胞の分離操作前後において、両群間で差を認めなかった。以上のことから、併用療法により自己抗原特異的な制御性 T 細胞が誘導されていると考えられた。（図 4）

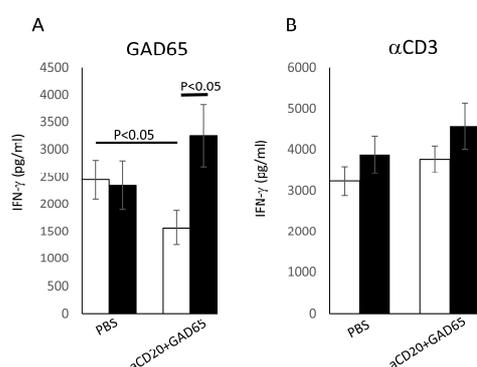


図 4 抗 CD20 抗体+GAD<sub>65</sub> 併用療法により GAD<sub>65</sub> 特異的な制御性 T 細胞が誘導される

(A,B)各群のマウスの脾臓から CD4<sup>+</sup> T 細胞 ( ) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 細胞( )を分離し、それぞれの分画から同数の細胞数を得て抗原提示細胞と GAD<sub>65</sub> 抗原(A)あるいは抗 CD3 抗体(B)の存在下で培養した。細胞培養液中の IFN- $\gamma$ 濃度を ELISA 法で測定した。2 回の実験のうちの代表的な1回を示す。(One way Anova 法で統計解析を行った。)

<今後の課題や問題点について>

今回の研究では、1 型糖尿病モデルマウスを用いて、GAD<sub>65</sub> に特異的な制御性 T 細胞を選択的に誘導することができ、また、長期的な寛解を得ることができた。抗 CD20 抗体+GAD<sub>65</sub> 併用療法により得られる長期的な寛解には TGF $\beta$ が関与していることまでは明らかにしたが、制御性 T 細胞やマクロファージなど、他の細胞が必須なのか、そもそもメカニズムは何なのかについては未だ十分に明らかにはなっていない。そのため、今後の課題として検討を継続していく。

## 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 3 件)

- 1) Manipulating regulatory T cells: a promising strategy to treat autoimmunity. Zhang D, Tu E, Kasagi S, Zanvit P, Chen Q, Chen W. Immunotherapy. 2015;7(11):1201-11.
- 2) Antibiotics in neonatal life increase murine susceptibility to experimental psoriasis. Zanvit P, Konkel JE, Jiao X, Kasagi S, Zhang D, Wu R, Chia C, Ajami NJ, Smith DP, Petrosino JF, Abbatiello B, Nakatsukasa H, Chen Q, Belkaid Y, Chen ZJ, Chen W. Nat Commun. 2015 Sep 29;6:8424. doi: 10.1038/ncomms9424
- 3) In vivo-generated antigen-specific regulatory T cells treat autoimmunity without compromising antibacterial immune response. Kasagi S, Zhang P, Che L, Abbatiello B, Maruyama T, Nakatsukasa H, Zanvit P, Jin W, Konkel JE, Chen W. Sci Transl Med. 2014 Jun 18;6(241):241ra78. doi: 10.1126/scitranslmed.3008895

〔学会発表〕(計 1 件)

第 43 回日本免疫学会学術集会(2014 年 12 月 10 日~12 日)(会場名:国立京都国際会館(京都府))

In vivo-generated antigen-specific regulatory T cells treat autoimmunity without compromising antibacterial immune response. (Oral Presentation)

〔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

笠木 伸平(KASAGI, Shimpei)

神戸大学医学部附属病院・検査部・特定助教  
研究者番号: 80457051

(2)研究分担者

なし

(3)研究協力者

Chen Wanjun

National Institute of Health, MD

研究者番号: なし