

制御性T細胞を用いた自己免疫の抑制に関する研究

研究分担者 坂口 志文
京都大学再生医科学研究所所長・教授

A. 研究目的

正常個体中には、免疫抑制に特化した CD4+T 細胞である制御性 T 細胞が末梢 CD4+T 細胞の 10%程度存在する。制御性 T 細胞の欠損あるいは機能不全は自己免疫病の原因となり、また制御性 T 細胞は自己免疫反応を強く抑制する。このことから、制御性 T 細胞は様々な免疫疾患の病態に関与している可能性が高く、その機能の評価および抑制機能の制御を明らかにすることは、自己免疫疾患の診断・治療に大きく貢献することが期待される。本分担研究では、制御性 T 細胞の免疫抑制機能の分子メカニズムに着目して研究することで、自己免疫状態における制御性 T 細胞の機能評価方法の確立および制御性 T 細胞の機能制御による自己免疫反応の制御法開発を目指す。

B. 方法

制御性 T 細胞の免疫抑制機能において中心的な分子である転写因子 FoxP3 と膜タンパク CTLA-4 のはたらきを解析することにより、免疫抑制機能の分子メカニズムを明らかにする。制御性 T 細胞は特異的に FoxP3 を発現し、制御性 T 細胞の表現型および抑制機能は FoxP3 によって制御されている。すなわち、FoxP3 の分子レベルでの働きが明らかになれば、制御性 T 細胞の機能を動的にとらえることが出来ると考えられる。このために、我々は FoxP3 の転写因子 Runx1 などの結合因子を同定し、その分子メカニズムをこれまでに明らかにしてきた。また、制御性 T 細胞の免疫抑制機能においては膜タンパクのはたらきも重要であり、特に CTLA-4 は制御性 T 細胞の機能に必要であることをこれまでにみいだしてきた。

本分担研究では、まず(1) FoxP3/Runx1 による遺伝子制御の全体像の解明、および(2) CTLA-4 による免疫抑制機能の分子メカニズムの解析による制御性 T 細胞の免疫抑制機能の解明を目指す。このために、Runx1 欠損および、Runx タンパクと heterodimer を形成してターゲット遺伝子の転写制御をする CBF β (core-binding factor- β)欠損マウス、制御性 T 細胞特異的 CTLA-4 欠損マウスを用いる。分子メカニズムの更なる解明のために、ヒトの細胞を用いた RNA 干渉や、これらのノックアウトマウス・ノックダウン細胞を用いたマイクロアレイ解析などを行う。

C. 結果

制御性 T 細胞特異的 Cre 発現マウスを用いて Treg 特異的に Runx1 および CBF β を欠損させ Runx 複合体の機能を阻害すると、ノックアウト制御性 T 細胞の免疫抑制機能は減弱し、マウスはリンパ増殖症・自己免疫病・高 IgE 血症を発症した。また、ヒト制御性 T 細胞における Runx1 ノックダウンによっても制御性 T 細胞の免疫抑制機能は減弱した。CBF β 欠損制御性 T 細胞のマイクロアレイ解析により、Runx 複合体による遺伝子制御を解析し、多くの免疫関連分子の制御異常をみいだした。また、制御性 T 細胞特異的 CTLA-4 欠損マウスも自己免疫病となり、CTLA-4 欠損制御性 T 細胞は、免疫抑制機能が減弱していた。CTLA-4 欠損制御性 T 細胞のマイクロアレイ解析も行っている。

D. 考察

Runx 複合体による転写レベルでの抑制機能の制御と、CTLA-4 発現にもとづいた膜周辺での抑制機能の制御において特徴的な遺伝子制御を明らかにする事により、制御性 T 細胞の免疫抑制機能の本態にせまれると考えられる。

E. 結論

制御性 T 細胞による免疫抑制機能には、転写レベルでは Runx 複合体の機能が必須であり、膜タンパクとしては、CTLA-4 が必須であることが明らかになった。これらの分子の制御メカニズムの解明は、制御性 T 細胞の分化・抑制機能の解明につながると考えられた。

核内受容体をターゲットとした新規自己免疫疾患制御法の探索に関する研究

分担研究者 山村 隆

国立精神神経センター神経研究所免疫研究部・部長

研究協力者 大木 伸司

国立精神神経センター神経研究所免疫研究部・室長

A. 研究目的

私達は以前より、核内受容体をターゲットとした新規自己免疫疾患制御法の探索をすすめている。これまでに、多発性硬化症 (MS) 患者末梢血 T 細胞で高発現しているオーファン核内受容体 NR4A2 が病原性 T 細胞の炎症性サイトカイン産生に重要な働きをすることを報告し、またレチノイン酸受容体をターゲットに、合成 RAR アゴニスト Am80 による Th17 細胞分化の阻害を介した疾患制御の可能性を報告してきた。本年は、新たな自己免疫モデルとして実験的自己免疫性ブドウ膜炎 (EAU) を導入し、Am80 の効果を実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) と比較検討した。

B. 方法

C57BL/6J(B6) マウスに MOG₃₅₋₅₅ ペプチド、あるいは hIRBP₁₋₂₀ ペプチドを免疫することで、EAE あるいは EAU を誘導した。0.5%カルボキシメチルセルロースに懸濁した Am80 を、免疫時 (予防的プロトコール) あるいは発症時 (治療的プロトコール) から隔日で経口投与 (3 mg/kg) した。所属リンパ節細胞または脾臓細胞の抗原特異的 T 細胞増殖とサイトカイン産生を、処理群毎に比較した。炎症局所 (中枢神経あるいは眼球) に浸潤した炎症性細胞を回収し、IL-17 などの炎症性サイトカインおよび ROR γ t/Foxp3 などの T 細胞分化特異的転写因子の発現レベルを比較した。

C. 結果

Am80 の経口投与により、予防的プロトコールおよび治療的プロトコールの双方で、EAE に対する病態改善効果が得られた。このとき CNS 浸潤 T 細胞の IL-17 産生と ROR γ t 発現は、Am80 投与により有意に減少したが、Foxp3 の発現増加は認められなかった。興味深いことに、CNS 浸潤細胞の IL-17 産生と ROR γ t 発現はずっと抑制され続けていたにも関わらず、EAE 後期には Am80 投与群と非投与群の効果の差がなくなる傾向が認められた。このとき Am80 の投与群では、CNS 浸潤細胞の IL-10 産生が有意に抑制されており、Am80 の効果の消失に関わる可能性が考えられた。さらに CNS 中の IL-10 は、ROR γ t/Foxp3 両陽性のユニークな細胞集団が産生することが示された。一方、Am80 は EAU に対しても予防的、治療的病態改善効果を示した。EAU では、Am80 投与後に眼球浸潤細胞の IL-17 産生と ROR γ t 発現は減少し、Foxp3 発現は著増した。Am80 の継続投与により眼球浸潤細胞の IL-10 産生抑制が認められたが、EAU 病態が増悪することはなかった。

D. 考察

MS に限らず様々な自己免疫疾患において、Th17 細胞が病原性 T 細胞として病態形成に関与することが知られている。Am80 は、標的臓器浸潤細胞の ROR γ t 発現と IL-17 産生を著しく抑制し、EAE と EAU の双方で顕著な病態改善効果を示した。EAE では Am80 により浸潤 T 細胞の ROR γ t 発現が有意に減少する一方で、Foxp3 発現は増加しなかったのに対し、EAU では投与群の浸潤 T 細胞における Foxp3 の著しい発現誘導が認められた。さらにいずれのモデルにおいても、Am80 の継続投与による顕著な IL-10 産生抑制が認められ、EAE 後期では Am80 の効果が消失したが、EAU では実験期間を通じて病態抑制効果の減弱は認めなかった。よって Am80 は、複数の自己免疫疾患モデルに共通して Th17 細胞機能抑制による病態改善効果を示したが、Treg 細胞誘導能は病態モデルによって異なっており、また IL-10 産生抑制による投与効果の減弱を考慮する必要があると考えられた。Am80 の臨床応用に際しては、Th17 細胞だけでなく、Treg 細胞、IL-10 産生などの複数の作用点を勘案して、各疾患に適したプロトコールを選択する必要があると考えられた。

E. 結論

Am80 の経口投与により、Th17 細胞機能抑制効果を介した EAE および EAU の病態改善効果が得られた。Am80 が、種々の自己免疫疾患に対する新規治療薬として適用できる可能性が示された。

IL-17 産生 NKT 細胞を介した関節炎の制御

分担研究者 住田 孝之

筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻臨床免疫学 教授

研究協力者 吉賀 洋平、瀬川 誠司、後藤 大輔

筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻臨床免疫学

A. 研究目的

natural killer T (NKT)細胞は NK マーカーと T 細胞抗原受容体(TCR)を併せ持つユニークな細胞群である。その TCR α 鎖はマウスでは TCRV α 14、ヒトでは TCRV α 24 の均一な遺伝子を有する。CD1d 分子上に発現した糖脂質を抗原として認識し、INF- γ および IL-4 を産生する。代表的な糖脂質は、合成 α -galactosylceramide (α -GC)であり、自然に存在する抗原は iGb3 などである。関節リウマチにおける NKT 細胞の役割は未だ明らかにされていない。本研究の目的は、関節リウマチにおける NKT 細胞の機能を明らかにすることである。

B. 方法

1) C57BL/6(B6)マウスバックグラウンドの TCRV α 14J α 281 遺伝子ノックアウトマウス(NKT KO マウス)を用いて、コラーゲンタイプ II (CII) を CFA をアジュバントとして二回免疫することにより関節炎(CIA)の誘導を試みた。2)NKT KO マウスから所属リンパ節細胞より採取したリンパ球を用いて、CII に対する Th1、Th2、Th17 細胞由来サイトカインの産生を ELISA 法および細胞内サイトカイン産生検出法により検討した。3)NKT KO マウス由来の脾細胞を用いて α -GC で *in vitro* で刺激して IL-17 産生細胞について ELISA 法およびフローサイト法で検討しコントロールの B6 マウスと比較した。4) α -GC で刺激した NKT 細胞について、ROR γ T、IL-23R の発現について RT-PCR 法で検討した。5)IL-17 産生における IL-23 の関与を明らかにするために、APC (CD11c+細胞) と NKT 細胞 (CD3+CD1d+tet+) とを IL-23、 α -GC、IL-23+ α -GC と共培養し IL-17 の産生について ELISA 法で検討した。

C. 結果

1)NKT KO マウスにおいては、関節炎の頻度および関節炎スコアがともに B6 マウス (コントロールマウス) と比較して有意に低下していることが判明した。2)IFN- γ 、IL-4、IL-10 はコントロールと比べて有意差は認められなかったが、IL-17 の産生が NKT KO マウスにおいて有意に低下していた。3)NKT KO マウスにおいては、 α -GC による IL-17 の再生は全く認められなかった。一方、NKT 細胞自身が IL-17 を産生していた。4)NKT 細胞は、Th17 細胞と同様に ROR γ T および IL-23R を発現していた。5) α -GC 刺激による NKT 細胞からの IL-17 産生は IL-23 非依存的であることが判明した。

D. 考察と結論

NKT 細胞自身が α -GC 刺激により IL-17 を産生することが判明した。その機序は ROR γ T を介しているが、IL-23 には非依存的である。CIA において、NKT 細胞は自らおよび Th17 細胞を介して IL-17 を産生し関節の増悪に関わっていることが明らかにされた。今後、IL-17 産生 NKT 細胞の抗原特異的制御法を確立し CIA のあらたな治療戦略の開発を目指す。

免疫抑制性分子を強制発現させたアロES細胞由来の樹状細胞によるアロ移植臓器に対する
免疫寛容の誘導に関する研究

分担研究者 千住 覚

熊本大学大学院医学薬学研究部 免疫識別学分野 准教授

研究協力者 平田 真哉

熊本大学大学院医学薬学研究部 免疫識別学分野 助教

研究協力者 西村 泰治

熊本大学大学院医学薬学研究部 免疫識別学分野 教授

A. 研究目的

樹状細胞は免疫応答の制御において中心的な役割を演じている抗原提示細胞であり、免疫寛容の維持において重要な役割を担っていると考えられている。そこで我々は、免疫応答を人為的に制御する手法として、遺伝子改変により機能を人為的に修飾した樹状細胞を生体外で培養し、移入する細胞治療の開発を目指している。我々は、以前より、細胞治療に用いる樹状細胞のソースとしてES細胞を用いる方法を検討しており、マウスのES細胞から樹状細胞(ES-DC)を作製する方法を開発している。さらに、遺伝子改変により免疫抑制機能を有する分子を強制発現させたマウスES-DCをマウス個体へ投与することにより、免疫応答の抑制的制御を行い、自己免疫疾患(EAE)の予防あるいは治療が可能であることを報告している。移植医療においては、拒絶反応の克服が最大の課題であり、アロ移植臓器に由来するアロ抗原に対する免疫応答を制御する手法の開発が強く望まれる。本研究では、免疫抑制分子を発現するアロES-DCを用いることにより、当該アロ抗原に対する免疫寛容を誘導し、当該アロ移植臓器の生着促進が可能であるかどうかを検討することを目的とした。

B. 方法

ストレプトゾトシンによって糖尿病発症を誘導したCBAマウス(H-2^d)の腎被膜下に(CBA x C57BL/6) F1マウス(H-2^{b/h})に由来する膵島を移植し、その後、血糖値を連続的に測定して、一定レベル(300mg/dl)以下への血糖値のコントロールをもって移植片の生着を評価した。そして、膵島の移植に先行して、免疫抑制機能を有することが知られているTRAIL、PD-L1、あるいはTGF- β を強制発現させた、移植片と同一の遺伝的背景(H-2^{b/h})を有するES細胞由来のES-DCをレシピエントマウスの腹腔内へ投与(2.5x10⁶個/マウス)することにより、移植片由来のアロ抗原に対する免疫寛容を誘導し、膵島の生着期間を延長できるかどうか検討した。免疫抑制分子を発現する遺伝子改変ES-DCの作製は、我々が以前に報告した方法に基づいて行った。

C. 結果

TRAILを遺伝子導入したES-DCを先行投与したマウスにおいては、未治療コントロール群に比べて、アロ膵島移植後に血糖値が300mg/dl以下に保たれた期間、すなわち、移植膵島内の β 細胞が生産し機能する期間の延長が観察された。さらに、ES-DC-TRAILを投与した群では、末梢血中のCD4⁺T細胞中におけるFoxp3⁺制御性T細胞(Treg細胞)の割合の増加が認められた。一方、遺伝子改変を行っていないES-DC、あるいは、その他の免疫抑制分子を導入したES-DCの投与群では、移植膵島の生着期間の有意な延長は認められなかった。

D. 考察

今回検討した免疫抑制性分子中では、TRAILを発現させたES-DCのみが、アロ抗原に対する免疫寛容を誘導する効果を有していた。また、我々が、以前に実験自己免疫疾患モデル(EAE)を用いた研究において観察したように、TRAIL発現ES-DCによるアロ抗原に対する免疫寛容誘導には、制御性T細胞の誘導あるいは増殖促進が関与している可能性が示唆された。

E. 結論

マウスのアロ膵島移植モデルの実験系において、移植片と同一の遺伝的背景を有するアロES-DCにTRAILを強制発現させたものを移植前に投与することにより、アロ膵島に対する免疫寛容を誘導し、移植片の生着期間を延長できることが示された。

関節炎モデルおよびヒト膠原病における IL-17A/F の病態学的意義に関する研究

研究分担者 三森 経世
京都大学大学院医学研究科・臨床免疫学・教授
研究協力者 臼井 崇
京都大学大学院医学研究科・臨床免疫学・准教授

A. 研究目的

近年 IL-17 を産生する Th17 細胞の膠原病への関係が深く示唆されているが、それらの多くはモデル動物から得られたデータであり、ヒトにおけるデータはまだ少ない。例えば関節炎モデルマウスにおける IL-17 産生細胞の病態への関与は、様々な実験結果より明らかであるが、関節リウマチ (RA) 症例を用いた解析では否定的な報告もあり、まだ結論が出ていない。そこで我々は、関節炎モデルとしてコラーゲン誘導関節炎 (CIA) および SKG マウスの二つのモデルと、RA をはじめとする各種膠原病症例を用いて、IL-17A/F の発現およびその分布を詳細に比較することにした。

B. 方法

CIA および SKG マウスは関節炎誘導後、経時的に関節局所・所属リンパ節・脾臓より浸潤細胞を分離し、表面マーカーとともにサイトカインプロファイルを細胞内サイトカイン染色で解析した。膠原病症例は当科の保存血清を用いて、IL-17A および F を測定し、臨床パラメーターとの比較・統計学的解析を行った。また RA 患者からの末梢血単核球・関節液・手術時に得られる滑膜組織中の単核細胞も分離し、同様な解析を行った。

C. 結果

CIA マウス罹患関節局所からは、ほぼ純粋な IL-17 産生細胞のみが検出され、IFN- γ 産生細胞は非常に少数であった。さらには、この IL-17 産生細胞の大部分は Th17 細胞ではなく $\gamma\delta$ T 細胞であり、CCR6, ROR- γ t を Th17 細胞同様発現していた。しかし特異抗原である type-II collagen や TCR 刺激には低反応であり、IL-1b および IL-23 存在下で相乗的な IL-17 産生誘導を認め、Th17 細胞の反応性と逆であった。次に関節炎を誘導した SKG マウスの罹患関節局所を解析したところ、意外な事に CIA マウスと比較して IL-17 産生細胞はほぼすべて Th17 細胞であった。また IFN- γ 産生細胞の割合も CIA マウスと比較すると高い傾向を認めた。次に RA 症例から得られた、局所単核球サンプルを同様に解析したところ、IFN- γ 産生細胞が主であり IL-17 産生 $\gamma\delta$ T 細胞はほとんど検出されなかった。次に患者血清中の IL-17A/F を測定したところ、IL-17A は低値であり疾患活動性パラメーターや健常人・OA 患者を含めた疾患群間での有意差を認めなかったが、一方 IL-17F は膠原病 4 大疾患 (RA, SLE, PM/DM, SSc) すべてで健常人と比較して高値であり、特に RA でこの現象が顕著であった。血清 IL-17F 値は DAS28 や炎症マーカーと有意な相関は示さなかったが、個々の症例を生物学的製剤治療開始前後で経時的に解析すると、前値に比べ後値が 1/10 以下になった症例はほぼすべて EULAR 改善度が good response であったのに対し、moderate response 群では前値と後値の間に有意な低下を認めなかった。

D. 考察

今回行った罹患関節局所浸潤細胞解析により、マウスモデルとヒト RA だけでなく、マウス関節炎モデル間でも Th1/Th17 バランスが異なる病態であることが示唆された。さらに CIA マウスは IL-17 産生 $\gamma\delta$ T 細胞を増悪因子とする、かなり特殊なモデルであることが示唆され、創薬過程でこれを用いる場合には注意が必要であると考えられた。またヒト RA においては罹患関節局所でも、血清レベルでも IL-17A は低レベルであり、むしろ IL-17F が病態に関わっている事が示唆された。

E. 結論

マウス関節炎モデルとヒト RA の病態はかなり異なる可能性があり、RA の病態に IL-17A が関わっているという証拠は得られなかった。一方、IL-17F がその病態に深く関わっている可能性があり、新薬開発のターゲットに成り得ることが期待される。