

免疫疾患におけるT細胞サブセットの機能異常とその修復法の開発に関する研究

（研究代表者）

山本 一彦 東京大学大学院医学系研究内科学専攻アレルギー・リウマチ学 教授

（研究分担者）

保田 晋助 北海道大学大学院医学研究科 免疫・代謝内科学 講師

松本 功 筑波大学医学医療系内科膠原病・リウマチ・アレルギー 准教授

小竹 茂 東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター内科 准教授

桑名 正隆 日本医科大学アレルギー膠原病内科 教授

田村 直人 順天堂大学膠原病科 准教授

森尾 友宏 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 発生発達病態学 教授

上阪 等 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科膠原病・リウマチ内科学 教授

藤尾 圭志 東京大学大学院医学系研究科内科学専攻アレルギー・リウマチ学 講師

田中 良哉 産業医科大学医学部第一内科学講座 教授

川上 純 長崎大学第一内科 教授

研究要旨

ヒトの免疫系は多くの点でマウスの免疫系と似ているが、細部については差異があることから、マウスを中心とした動物モデルでの知見はヒトの免疫学に直接的に応用できない。しかし、分析の困難さから、マウスの免疫システムの理解と比べヒトの免疫系の理解は十分でない。これらのことから欧米を中心にヒト免疫学の充実が提唱されているが、我が国では本格的な取り組みは始まっていない。本研究では、獲得免疫の中心であるT細胞に焦点をあて、ヘルパー型T細胞、制御性T細胞などの機能的サブセットおよびその亜集団をヒトでどのように把握するか、各疾患でどのような異常が起こっているか、それを修復するにはどのような方向の治療が考えられるかなどについて、内科、小児科の研究者が疾患横断的に研究を進めることを目的としている。平成24年度は、ヒトの各T細胞サブセットの検出、機能異常の検出、各種治療薬の影響の検出などの多くの方法論や情報を共有し、平成25年および26年度には、実際の健常人および患者サンプルでの解析を進めた。

A. 研究目的

本研究の目的は、獲得免疫の中心であり免疫応答をコントロールするT細胞に焦点を当て、その機能的サブセットを末梢血リンパ球を中心としたヒトサンプルでどのように把握するか、健常人集団と比較して各疾患でどのような異常が起こり病態形成に繋がるのか、それを修復するにはどうしたら良いか、などに関して各分担研究者間で情報

交換を行いながら横断的に検討することである。

現在の免疫学研究はモデル動物であるマウスを中心に目覚ましい進展を遂げており、次々に新しい分子、細胞などが明らかになっている。しかし、マウスとヒトの免疫システムは似ているが完全に同じではない。実際に、マウスで明らかになった知見をそのままヒトの疾患研究に応用することは容易ではない。例えば、制御性T細胞の表面マ-

カーもマウスと同じではない。従って、ヒトとマウスの新しい情報を的確に把握しつつ、解析を進める必要がある。しかし、分析の困難さから、マウスの免疫システムと比べ、ヒトの免疫系の解析と理解は十分でない。これらのことからヒト免疫学の充実が提唱されており、諸外国では積極的な研究が開始されているが、我が国での具体的な取組はほとんどない。

このような状況を踏まえ、本研究では、今までヒトの免疫疾患領域で研究を進めてきた内科、小児科の研究者が、疾患横断的にヒトのT細胞に関して研究を進めることを目的とした。ヒトの各T細胞サブセットを如何に的確に検出するか、その機能を如何に解析するか、現在使用中や開発中の治療薬が試験管内や生体内でT細胞サブセットや遺伝子発現に如何に影響を及ぼすかなど多くの解決しなければならない問題がある。これらに関して、本領域に関する我が国の第一線研究者を分担研究者として集結し、多くの方法論や情報を共有し、議論を進めていくことで、我が国におけるヒト免疫学の端緒を開くことが目的である。

B. 研究方法

平成24年度には複数の研究会を開催し、共通の方法論の採用などの議論を行った。これをもとに平成25・26年度にはこれらを継続させながら、研究成果に関する議論を進めた。研究代表者の山本は、各研究者が使うヘルパー型T細胞、キラー型T細胞、制御性T細胞などのT細胞サブセットおよびそのナイーブ、メモリーなどの亜集団の分離・解析法に関して、Human Immunology Project Consortium(HIPC)の標準化法(Nat Rev Immunol.12:191, 2012)を参照しながら、健常人サンプルでの標準的な方法を試行し、スタンダードな方法として提示すること、各種治療薬の供給に関して、共通に使える試薬の整備などを継続的に行った。さらに関節リウマチ(RA)の免疫学的異常と臨床像との関連を明らかにするために、またリスク遺伝子であるHLA-DRB1,特に感受性アレルのShared epitope(SE)と免疫細胞との関連を明らかにするために、臨床所見・免疫細胞動態・

HLA-DRB1 遺伝子型との関連について、包括的な検討を試みた。

森尾分担研究者は、単一遺伝子異常による原発性免疫不全症における自己免疫疾患の発症機構とヘルパーT細胞(Th)サブセットの関与に関しての研究を進める為、10カラーFACSを用いた解析を行った。具体的にはリンパ球分画を大きく見るためのPBMCパネル(CD3/4/8/19/16/56/14/HLADR) T細胞を詳しく見るT1,T2,T3パネル、B細胞分画を見るB1,B3パネル、樹状細胞を見るDCパネルを設定し検討した。さらにB細胞受容体、T細胞受容体について、次世代シーケンサーを用いて解析を行った。

保田分担研究者は、T細胞の分化に重要であるが一部の膠原病患者T細胞で発現が低下しているRasGRP1蛋白およびの下流のシグナル分子に注目して、全身性エリテマトーデス(SLE)患者と健常人末梢血を比較した。具体的には末梢血よりT細胞を単離し、RNAを抽出、RasGRP1の上流であるGfi-1, また下流と考えられるDNMT1の発現を検討した。またRasGRP1のspray異常にかかわる可能性のあるspraying因子のASF/SF2についてもその発現を検討した。松本分担研究者は、動物モデルの関節炎発症早期の脾臓とRA患者CD4陽性T細胞に共通して高発現が認められるFormyl peptide receptor2(FPR2)とHCgp-39(human cartilage glycoprotein 39)に着目し、これらによるT細胞サブセットと自己免疫病態への関連を検討した。健常人、シェーグレン症候群患者及びRA患者から単離した末梢血単核球及びCD4⁺T細胞, CD11b⁺細胞におけるFPR2とHCgp-39の発現を比較検討し、さらにFPR2発現とESR,CRPとの関連を検討した。

小竹分担研究者は、病態形成の主役であるヘルパー型T細胞に関して、発症早期関節炎で未治療の患者の末梢血、関節液、滑膜組織におけるヘルパーT細胞(Th1, Th17)を解析した。桑名分担研究者は病態形成を抑制する制御性T細胞(Treg)に関して、CD4⁺Foxp3⁺細胞の多様性に着目し、SLE患者末梢血 CD4⁺Foxp3⁺T細胞の亜分画および病態に

おける役割を検討した。具体的には、CD4⁺Foxp3⁺細胞比率、Treg 特異的脱メチル化領域 (TSDR)、CD4⁺Foxp3⁺細胞の表面抗原とサイトカインを組み合わせて解析を行った。さらに末梢血 CD4⁺Foxp3⁺T細胞および CD4⁺Foxp3⁺CD49d⁺細胞の細胞比率、各種遺伝子発現を検討し、免疫抑制機能を調べる為、磁気ビーズおよびフローサイトメトリーによるソーティングで分離し、同種混合性リンパ球反応における抑制能を評価した。

田村分担研究者は、RA の T 細胞サブセット機能異常における PI3 キナーゼ経路の関与および阻害薬によるその是正について検討するため、健常人および RA 患者の末梢血から単核球を分離しアイソフォーム選択的もしくは非選択的 PI3K 阻害薬の存在下・非存在下にて、抗 CD3 抗体 + 抗 CD28 抗体、あるいは PMA + ionomycin で刺激した。刺激 5 時間後の CD4 陽性 T 細胞の刺激前後におけるサイトカインの発現をフローサイトメトリーにて解析した。さらに、24 時間後の培養上清中サイトカイン濃度をビーズアッセイ法にて測定した。また、これまで我が国で発症頻度が低いために検討がされてこなかった、強直性脊椎炎 (ankylosing spondylitis: AS) の末梢血単核球の検討を行った。さらにこの単核球を刺激し、サイトカイン産生細胞の頻度を細胞内染色で解析した。上阪分担研究者は、多発性筋炎・皮膚筋炎について、末梢血リンパ球分画異常の存在を明らかにすることを主目的とし、Flow cytometer による解析を行った。

藤尾分担研究者は、独自に見出した新規 LAG3 陽性制御性 T 細胞について、各種のヒト疾患の末梢血の LAG3 陽性制御性 T 細胞を FACS で解析、ソーティングで回収し遺伝子発現や機能を評価した。具体的には、健常人の末梢血および扁桃腺、RA、SLE 患者の末梢血において、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞を回収し、マウス CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞でみられる抗体産生抑制能・炎症抑制能について試験管内および生体内で解析した。また臨床所見・パラメータと CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞の関連を解析した。さらに、マウスでみられる抗体産生抑制能で重要な分子である TGF- β 3 について解析した。

田中分担研究者は、SLE における活性化 Tfh 細胞、B 細胞サブセットの質的異常を明らかにすることを目的とし、末梢血を採取し 8 カラーフローサイトメトリーを用いて、DC、T 細胞、B 細胞のサブセットの細分類を試み、各サブセット間および患者背景との相関を検討した。さらに、ヒト末梢血ナイーブ T 細胞を TCR 架橋と各種サイトカイン (IL-6, IL-12, IL-21, IFN- γ / γ など) で分化誘導させ、ケモカイン受容体、転写因子 Bcl-6、T-bet などの発現を検討した。川上分担研究者は、健常人の末梢血における CD52^{high} T 細胞が CD52^{low} T 細胞活性を抑制する機能を有する可能性が示唆されていることから (Nat Immunol. 2013:741-8.)、SLE における CD4⁺CD52⁺細胞の免疫調節に関する役割を検討した

C. 研究結果

山本研究代表者は Plasmablast, Tfh-Th17 細胞が自己抗体産生に関係していること、CD45RA⁺CXCR5⁺CCR6⁻CXCR3⁻細胞が疾患活動性と相関があること、早期未治療 RA 患者では免疫学的異常が顕著であることを示した。また、RA 患者の免疫担当細胞と HLA-DRB1 の疾患感受性遺伝子型 (SE)、ケモカイン受容体 CXCR4 との関連を検討した。SE 陽性 RA 患者では CD4⁺メモリー T 細胞比率が増加しており、この比率と T 細胞の DR 陽性率、抗 CCP 抗体値に正の相関がみられることを見出した。また CXCR4 は RA 患者 T 細胞では健常人に比して発現が亢進しており、CD4⁺メモリー T 細胞における陽性率は、B 細胞の DR 発現量、活動性指標の DAS28、RA に特異性の高い自己抗体である抗 CCP 抗体と正の相関があることを見出した。

森尾分担研究者は原発性免疫不全症に関しての解析を続け、原因遺伝子の同定された患者では、おおむね既報の通りであったため、疑い患者が紹介されてきたときのスクリーニング方法として、有効であることと考えた。一方、原因不明の患者が含まれている Common variable immunodeficiency (CVID) 患者でも、特徴的な分化異常を呈する患者が含まれていた。すなわち CVID 患者の中には T 細胞、B 細胞の分化障害から

自己免疫疾患を発症する例が存在した。そこで次世代シーケンサーにより T 細胞受容体 (TCR)、B 細胞受容体 (BCR) の解析を行い、CDR3 領域長、D・J 領域の利用率、J 領域における新しい配列の追加などを検討した。この結果、一部の患者に幾つかの領域における頻度の偏りなどを見出した。今後、こうした患者に対して機能解析を行い、また、全 exome 解析の結果も組み合わせ、原因遺伝子の同定につなげていく方向性が見出された。

保田研究分担者は SLE 患者 T 細胞における MAP キナーゼ経路を通じた DNA の低メチル化が病態形成に深く関わっていると考えられるので CD3 鎖のプライミングを制御している代表的な SR 蛋白である SRSF1 (SF2) の発現量を検討した。その結果、健常人と比較して SLE 患者 T 細胞では有意に低値であった。SLE 患者 T 細胞において MAP キナーゼ経路の上流に位置する RasGRP1 の発現低下やスプライスバリエーションの増加が認められるが、SF2 の発現量は正常にスプライスされた RasGRP1 の発現量、さらには DNA メチル化酵素である DNMT1 の発現量と相関していた。SLE 患者 T 細胞において、SF2 の低発現が RasGRP1 スプライス異常に関与し、この低下が疾患活動性と関連があること、ASF/SF2 の発現レベルは正常 RasGRP1、DNMT1 の発現レベルと強い正の相関があることから、結果的に DNA の低メチル化を来している可能性が示唆された。

松本分担研究者は、マウスにおける抗原誘発関節炎発症早期の T 細胞に高発現している FDR2 が、ヒトでも RA の CD4 陽性 T 細胞にコントロールと比較し高発現していることを見出し、またこの細胞は Th1 型の表現型であることを示した。FDR2 は健常人やシェーグレン患者と比較し RA 患者末梢血、特に CD4⁺T 細胞のみで高発現を認め、さらに CD4⁺細胞 FDR2 発現は、ESR と強い正の相関を示した。さらに FDR2 と同様な高発現している HCgp-39 が、ヒトでもコントロールと比較し RA の CD4 陽性 T 細胞に高発現していることを見出した。そして、HCgp-39 は CD25⁺Foxp3⁺Treg にのみ高発現していること、リコンビナント HCgp-39 は抗原特異的 T 細胞増殖や Th1, Th17 からのサイトカイン産生を著

明に抑制することを見出した。

小竹分担研究者は、発症早期関節炎 (RA) において、活性化 NK レセプターマーカーの CD161 が陽性のヘルパー T 細胞における Th1 の Th17 に対する比が RA は OA で有意に高かったことから、末梢血における CD161 陽性ヘルパー T 細胞の Th17 から Th1 への可塑性が病態に関与している可能性が示唆された。さらに、CD161 が陽性で CXCR3 陰性のメモリーヘルパー T 細胞が IL-17 産生細胞の 80% であることを見出した。

桑名分担研究者は、従来の検討から SLE 末梢血において Foxp3⁺胸腺由来 Treg (nTreg) が増加し、その比率は疾患活動性と相関すること報告している。しかし、最近 CD4⁺Foxp3⁺T 細胞の可塑性と多様性が示されていることから、SLE 患者末梢血 CD4⁺Foxp3⁺T 細胞の病態における役割を検討した。CD4⁺細胞中における Foxp3⁺T 細胞と nTreg の比率の増加は多発性硬化症や原発性免疫性血小板減少症患者でみられず SLE に特徴的であった。CD4⁺Foxp3⁺細胞分画の検討では、Foxp3⁺CD25⁺CD127^{low} や Foxp3⁺CD25⁺CD49d⁻などの免疫抑制能を有する Treg 分画は健常人と SLE で差はなく、CD4⁺Foxp3⁺CD127⁺/CD49d⁺細胞分画は SLE で増加していた。さらに、SLE 末梢血中の CD4⁺Foxp3⁺細胞は健常人に比べて IL-2 産生が低下し、IL-17 産生が増加していた。これらから CD4⁺Foxp3⁺CD49d⁺細胞では nTreg に由来する免疫抑制能は有するが、IL-17 を介して炎症病態を促進する可能性があることが示された。すなわち、活動期 SLE 末梢血で増加している nTreg は特有の表面マーカーとサイトカイン産生能を有する新たなサブセットであり、免疫炎症病態に関わる可能性が想定された。

田村分担研究者は、RA 患者末梢血単核球を刺激し、CD4 陽性 T 細胞における IL-17 および IFN の発現を解析したところ、PI3K 阻害薬添加により抑制され、さらに培養上清中のサイトカイン IL-17、IFN、IL-17、IL-6、TNF 産生も PI3K 阻害薬により抑制されることを見出した。これらの作用は、アイソフォーム選択的阻害薬のうち PI3Kd 選択的阻害薬で最も強かった。これらのことから、PI3K、特に PI3Kd は RA 患者における Th1, Th17 サイトカ

インの発現に関与しており、RAにおける治療標的となり得ることが示唆された。さらに、日本人で頻度が低く検討がほとんどされていない強直性脊椎炎の末梢血では、単球の比率が高く、NK細胞が低いことを見出した。またCD4陽性T細胞の中では、Th17の頻度が高く、Th1は低い傾向があり、CD8陽性T細胞でもIL-17の発現が亢進していることを明らかにした。

上阪分担研究者は、多発性筋炎・皮膚筋炎について、特に3徴候である皮膚傷害・筋傷害・肺傷害それぞれの有無に着目して解析したところ、間質性肺炎合併例において非合併例と比較してCD4優位であり、特にnaïve CD4 T細胞が多い傾向、Th2細胞優位の傾向を認めた。この結果により、筋傷害と肺傷害が異なる免疫異常に基づく可能性が考えられた。また、筋炎患者全体では、特にcentral memory CD4陽性細胞が多く、naïve CD8陽性細胞が少ない傾向を認めた。制御性T細胞は、健常人に比べて多い傾向を見出した。

藤尾研究分担者はヒトCD4陽性CD25陰性LAG3陽性の新規制御性T細胞がFas-FasLおよびPD-1-PD-L1依存性にB細胞のアポトーシスを誘導することを確認した。また臨床データとの関連を検討したところ、SLE, RAの末梢血でCD4陽性CD25陰性LAG3陽性細胞の割合の減少を認めたが、SLEDAI、DAS28など疾患活動性との明らかな相関を認めなかった。アバタセプト投与前後で検討したところ、アバタセプト投与後にヒトCD4陽性CD25陰性LAG3陽性細胞増加する傾向を認めた。一方、この新規制御性T細胞は、ヒトでも試験管内での濾胞性ヘルパーT細胞(Tfh)とB細胞の共培養による抗体産生を抑制することを見出した。さらにこの細胞は培養によりTGF- β 3を発現し、ヒトリコンビナントTGF- β 3は、ヒトB細胞の分裂および抗体産生を抑制することを明らかにした。

田中分担研究者はSLE患者の末梢血では活性化CD4⁺CD45RA⁺CXCR5⁺Tfh細胞とCD19⁺IgD⁻CD27⁺effector memory B細胞の割合が増加することから、免疫担当細胞の分化異常の存在を示した。また、CD4⁺CXCR5⁺CXCR3⁺のTfh/Th1細胞の可塑性を有する細胞が増加し、この亜集団がIFN産生を

介してCXCR5⁻CXCR3⁺memory B細胞を誘導することを明らかにした。

川上分担研究者は、SLEでは健常人や他のリウマチ性疾患に比べてCD4⁺CD52^{high}T細胞およびCD8⁺CD52^{high}T細胞の集団が少ないことを見出した。また、このCD52^{high}T細胞は従来の制御性T細胞(Treg)とは異なる抑制性T細胞の集団であることが示唆された。一方、SLEでは健常人や非SLE患者に比べてCD4⁺CD52^{low}細胞の出現がみられ、活動性と相関することから、病態形成に関与している可能性を見出した。これらのことはSLEの病態や治療標的因子を議論する上で重要な知見である。

また、山本研究代表者と住友秀次研究協力者、森尾分担研究者と今井耕輔研究協力者らが共同で、ヒト末梢血解析マニュアルを作成した。

(倫理面への配慮)

ヒトゲノムの収集ならびに情報の提供およびヒト末梢血の解析については、各施設の倫理委員会の承諾を得、臨床検体はインフォームドコンセントのもとに収集され、個人情報漏洩のないよう管理された。個人情報を伝達しないレトロスペクティブ観察研究やアンケート調査は、連結不能・完全匿名法とした。治験計画においてはGCP準拠とし、被験者への不利益を最小限にとどめ、被験者の得る利益を最大限にするよう配慮した。動物実験に際しては、各施設の倫理委員会により承認された実験計画書に基づいて実験を行った。

D. 考察

欧米では、ヒト免疫学充実の重要性は以前から指摘され、巨額の研究費による免疫担当細胞の網羅的遺伝子発現のデータベース構築などが行われている。一方、我が国ではこのような動きはなく、マウスを用いた基礎免疫学での国際的なリードと比較し、ヒト免疫学の研究は個々の研究者のレベルでは優れたものがあるものの、全体として満足すべきレベルではない。

本研究組織は、このような現状を改善し今後の突破口を切り開くべく、我が国の臨床免疫学領域の第一線で研究を行い、将来を担うことが期待さ

れている研究者を中心に構成されている。Human Immunology Project Consortium(HIPC) の提案するヒト末梢血細胞解析の標準化法(Nat Rev Immunol.12:191, 2012) も、実際に自らの研究室で動くことが判明し、マニュアルも作成したことから、本研究を進めることが、我が国の疾患免疫学の礎となり、新たな治療薬創出の為の直接的な研究成果とともに、将来的な免疫治療推進施策の拠点形成にも繋がると期待される。

E. 結論

本研究は、我が国におけるヒト免疫研究と疾患解析の研究体制の一つのモデルとなることが期待される。

F. 健康危機情報

特記事項無し