

ヒト免疫疾患におけるLAG3陽性制御性T細胞に関する研究

分担研究者 藤尾 圭志 東京大学医学部アレルギー・リウマチ内科 講師
研究協力者 住友 秀次 東京大学医学部アレルギー・リウマチ内科 助教
仲地 真一郎 東京大学医学部アレルギー・リウマチ内科 大学院生

研究要旨 免疫応答を抑制する制御性T細胞サブセットとしてCD4陽性CD25陽性Foxp3陽性制御性T細胞(CD25⁺Treg)が知られているが、CD25⁺Tregを欠損すると1型糖尿病などの内分泌疾患や、腸炎、皮膚炎を呈するが、関節リウマチ(RA)、全身性エリテマトーデス(SLE)とは異なる表現型となる。分担研究者らはCD4陽性CD25陰性LAG3陽性Egr2陽性の新規制御性T細胞(LAG3⁺Treg)をマウスにおいて同定し、このLAG3⁺TregがIL-10を産生しつつB細胞の抗体産生を抑制すること、その機能欠損により全身性自己免疫疾患を呈することを見出した。このことから、LAG3⁺TregはB細胞の免疫応答と局所の炎症を抑制する、CD25⁺Tregと相補的な免疫寛容機構であると考えられる。本研究ではマウスで得られた知見をもとに、ヒトのCD4陽性CD25陰性LAG3陽性細胞を同定し解析した。1年目にヒト扁桃腺のCD4陽性CD25陰性LAG3陽性細胞のIL-10、Egr2、PD-L1の発現と、試験管内のB細胞による抗体産生の抑制活性、生体内での移植片対宿主病の抑制を確認した。2年目にはヒト扁桃腺のCD4陽性CD25陰性LAG3陽性細胞が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。また末梢血のCD4陽性CD25陰性LAG3陽性細胞の臨床データとの関連を検討し、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一方、SLEDAI、DAS28など疾患活動性との明らかな相関を認めなかった。3年目は末梢血のCD4陽性CD25陰性LAG3陽性細胞が、末梢血の濾胞性ヘルパー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が確認できた。以上の結果からヒトCD4陽性CD25陰性LAG3陽性細胞がマウスLAG3⁺Tregと類似していること、その減少が自己免疫疾患の発症の素因となっている可能性が考えられた。

A. 研究目的

免疫応答を抑制する制御性T細胞サブセットとしてCD4陽性CD25陽性Foxp3陽性制御性T細胞(CD25⁺Treg)が知られているが、このCD25⁺Tregは主にT細胞の免疫応答を抑制し、CD25⁺Tregを欠損すると1型糖尿病などの内分泌疾患や、腸炎、皮膚炎を呈するが、関節リウマチ(RA)、全身性エリテマトーデス(SLE)とは異なる表現型となる。このことはCD25陽性Treg以外の免疫寛容システムの異常がRAやSLEに参与している可能性を示唆している。分担研究者らは、CD4陽性CD25陰性LAG3陽性Egr2陽性の新規制御性T細胞(LAG3⁺Treg)をマウスにおいて発見し、このLAG3⁺TregがIL-10を産生するとともにFasとPD-L1依存性にB細胞の抗体産生を抑制し、その機能欠損により全身性自己免疫疾患を呈することを見出した。よって

LAG3⁺TregはB細胞の免疫応答と局所の炎症を抑制する、CD25⁺Tregと相補的な免疫寛容機構であると考えられる。本研究ではマウスで得られた知見をもとにヒトにおいても類似の表現型の細胞の機能を解析することを目的とした。

B. 研究方法

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。

(倫理面への配慮)

臨床検体を用いた研究計画については、東京大

学医学部倫理審査委員会の承認を受けた。すべての研究は各施設の遺伝子倫理委員会の審査を受け、承認を受けた研究計画に則って実施された。

(倫理面への配慮)

臨床検体を用いた研究計画については、東京大学医学部倫理審査委員会の承認を受けた。すべての研究は各施設の遺伝子倫理委員会の審査を受け、承認を受けた研究計画に則って実施された。

C. 研究結果

1年目にヒト扁桃腺の CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞の IL-10, Egr2, PD-L1 の発現と、試験管内の B 細胞による抗体産生の抑制活性、生体内での移植片対宿主病の抑制を確認した。2年目にはヒト扁桃腺の CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞が 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。また末梢血の CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞の臨床データとの関連を検討し、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一方、SLEDAI、DAS28 など疾患活動性との明らかな関連を認めなかった。3年目は末梢血の CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞が、末梢血の濾胞性ヘルパー 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が確認できた。

D. 考察

ヒト扁桃腺および末梢血の CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞とマウス CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 Egr2 陽性制御性 T 細胞の間に一定の類似性を認めた。ヒト末梢血の CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞は自己抗体産生の制御に寄与していると考えられ、この細胞集団が自己免疫疾患患者で減少していることは、病態との関連を示唆していると考えられる。

E. 結論

ヒト CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞が自己免疫疾患の病態に関与している可能性が考えられ、今後自己免疫疾患症例におけるさらなる解析が必要である。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Okamura T, Sumitomo S, Morita K, Iwasaki Y, Inoue M, Nakachi S, Komai T, Shoda H, Miyazaki JI, Fujio K, Yamamoto K. TGF- β 3-expressing CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells control humoral immune responses. *Nat Communications*. 2015 in press.

Shoda H, Fujio K, Sakurai K, Ishigaki K, Nagafuchi Y, Shibuya M, Okamura T, Yamamoto K. Autoantigen BiP-derived HLA-DR4 epitopes differentially recognized by effector and regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology*. 2015 in press.

Sumitomo S, Fujio K, Okamura T, Morita K, Ishigaki K, Suzukawa K, Kanaya K, Kondo K, Yamasoba T, Furukawa A, Kitahara N, Shoda H, Shibuya M, Okamoto A, Yamamoto K. Transcription factor early growth response 3 is associated with the TGF- β 1 expression and the regulatory activity of CD4-positive T cells in vivo. *J Immunol*. 2013;191:2351-9.

Sumitomo S, Fujio K, Okamura T, Yamamoto K. Egr2 and Egr3 are the unique regulators for systemic autoimmunity. *JAKSTAT*. 2013;2(2):e23952.

Iwasaki Y, Fujio K, Okamura T, Yanai A, Sumitomo S, Shoda H, Tamura T, Yoshida H, Charnay P, Yamamoto K. Egr-2 transcription factor is required for Blimp-1 mediated IL-10 production in IL-27 stimulated CD4(+) T cells. *Eur J Immunol*. 2013;43:1063-73.

Fujio K, Okamura T, Sumitomo S, Yamamoto K. Regulatory cell subsets in the control of autoantibody production related to systemic autoimmunity. *Ann Rheum Dis*. 2013 Apr;72 Suppl 2:ii85-9.

Okamura T, Fujio K, Sumitomo S, Yamamoto K. Roles of LAG3 and EGR2 in regulatory T cells. *Ann Rheum Dis*. 71 Suppl 2:i96-100, 2012.

Fujio K, Okamura T, Sumitomo S, Yamamoto K. Regulatory T cell-mediated control of

autoantibody-induced inflammation. Front Immunol. 3:28, 2012.

Okamoto A, Fujio K, Tsuno NH, Takahashi K, Yamamoto K. Kidney-infiltrating CD4+ T-cell clones promote nephritis in lupus-prone mice. Kidney Int. 82:969-79, 2012.

Fujio K, Okamura T, Sumitomo S, Yamamoto K. Regulatory cell subsets in the control of autoantibody production related to systemic autoimmunity. Ann Rheum Dis. 2012 Dec 19.

Iwasaki Y, Fujio K, Okamura T, Yanai A, Sumitomo S, Shoda H, Tamura T, Yoshida H, Charnay P, Yamamoto K. Egr-2 transcription factor is required for Blimp-1 mediated IL-10 production in IL-27 stimulated CD4(+) T cells. Eur J Immunol. 2013 Jan 25.

2. 学会発表

Keishi Fujio. TGF-beta3-expressing CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells control humoral immune responses. 第43回日本免疫学会学術総会 国際シンポジウム 平成25年12月12日

藤尾圭志 TGF-beta3産生によるCD4陽性CD25陰性LAG3陽性制御性T細胞のB細胞機能抑制 第79回日本インターフェロンサイトカイン学会(札幌)シンポジウム 2014年6月19日

Keishi Fujio, Tomohisa Okamura, Kaoru Morita, Mariko Inoue, Yukiko Iwasaki, Shuji Sumitomo, Shinichiro Nakachi, Kazuhiko Yamamoto. CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells and systemic autoimmunity. 第58回日本リウマチ学会(東京)国際リウマチシンポジウム 2014年4月25日

Keishi Fujio, Tomohisa Okamura, Shuji Sumitomo, Kaoru Morita, Mariko Inoue, Yukiko Iwasaki, Nakachi Shinichiro, Hirofumi Shoda, Kazuyoshi Ishigaki, Kazuhiko Yamamoto. The role of CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells in autoimmune diseases. 第42回日本免疫学会学術総会 国際シ

ンポジウム 平成25年12月11日

Keishi Fujio, Tomohisa Okamura, Shuji Sumitomo, Kaoru Morita, Mariko Inoue, Yukiko Iwasaki, Kazuhiko Yamamoto.

The B cell control by Egr2-expressing CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells.

2013 アジア国際自己免疫学会 平成25年11月21日

Keishi Fujio, Tomohisa Okamura, Shuji Sumitomo, Yukiko Iwasaki, Kazuyoshi Ishigaki, Akiko Okamoto, Kazuhiko Yamamoto. Egr2-mediated control of autoimmunity. JSCIR-MMGB 2013 symposium 平成25年5月21日

Yukiko Iwasaki, Keishi Fujio, Tomohisa Okamura, Atsushi Yanai, Shuji Sumitomo, Hirofumi Shoda, Kazuhiko Yamamoto. Novel IL-10 induction pathway mediated by Egr2 in IL-27-stimulated T cells. 第57回日本リウマチ学会学術集会 ワークショップ 平成25年4月20日
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

藤尾圭志、岡村僚久、住友秀次、岩崎由紀子、岡本明子、山本一彦
全身性エリテマトーデスと免疫制御細胞 第57回日本リウマチ学会学術集会 シンポジウム 平成25年4月19日

岡本明子、藤尾圭志、松本巧、岡村僚久、住友秀次、岩崎由希子、澁谷美穂子、庄田宏文、山本一彦
Tofacitinibは生体内でCD4陽性CD25陰性LAG3陽性制御性T細胞を誘導し、試験管内でCD4陽性T細胞のEgr2発現の誘導する 第56回日本リウマチ学会学術総会 ワークショップ 平成24年4月26日

藤尾圭志、岡村僚久、住友秀次、岩崎由希子、岡本明子、松本巧、山本一彦 制御性T細胞と自己免疫 第40回日本臨床免疫学会総会 シンポジウム 平成24年9月27日

岡本明子、藤尾圭志、松本巧、住友秀次、岡村僚久、山本一彦 Jak 阻害薬は生体内で CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞を誘導し、試験管内で CD4 陽性 T 細胞の Egr2 発現の誘導する 第 40 回日本臨床免疫学会総会 ポスター発表 平成 24 年 9 月 28 日

Okamoto Akiko, Fujio Keishi, Ishigaki Kazuyoshi, Okamura Tomohisa, Yamamoto Kazuhiko. Tofacitinib induces CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells in vivo and the expression of Egr2 in CD4+ T cells in vitro. 第 41 回日本免疫学会学術総会 平成 24 年 12 月 6 日

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし