

Title	標的特定の制御性T細胞による過剰応答抑制
Sub Title	Suppression of aberrant immune responses by antigen specific regulatory T cells
Author	金森, 光広(Kanamori, Mitsuhiro)
Publisher	
Publication year	2018
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2017.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>制御性T細胞(Treg)は, 免疫応答を抑制するT細胞サブセットであり, 自己免疫疾患等の過剰な免疫反応を抑える目的での臨床応用が注目されている。本研究では分化したエフェクターT細胞を, 抗原特異性を保持したままTregへとリプログラミングする培養法を樹立した。このエフェクター由来のTregはマウス個体内で免疫抑制作用を示した。このリプログラミングには代謝の変化が重要であった。同じ手法にてヒトのエフェクターT細胞からもTregを誘導することに成功しており, 将来臨床応用に繋がるのが期待される。</p> <p>Regulatory T (Treg) cells are a suppressive subset of T cells. Many researchers are working on clinical application of Treg cells aiming for suppression of uncontrolled immune responses including autoimmunity. This study has established a culture method, by which effector T cells are reprogramed into Treg cells. Such effector-derived Treg cells showed a suppressive function in vivo in a mouse model. Metabolic shift was shown to be important for this reprograming. The same culture method was able to induce Treg cells from human effector T cells. Therefore, this study can lead to the clinical application of effector-derived Treg cells in the future.</p>
Notes	研究種目: 若手研究(B) 研究期間: 2016~2017 課題番号: 16K19108 研究分野: 免疫学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K19108seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19108

研究課題名(和文) 標的特定の制御性T細胞による過剰応答抑制

研究課題名(英文) Suppression of aberrant immune responses by antigen specific regulatory T cells

研究代表者

金森 光広 (Kanamori, Mitsuhiro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：00772336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：制御性T細胞(Treg)は、免疫応答を抑制するT細胞サブセットであり、自己免疫疾患等の過剰な免疫応答を抑える目的での臨床応用が注目されている。本研究では分化したエフェクターT細胞を、抗原特異性を保持したままTregへとリプログラミングする培養法を樹立した。このエフェクター由来のTregはマウス個体内で免疫抑制作用を示した。このリプログラミングには代謝の変化が重要であった。同じ手法にてヒトのエフェクターT細胞からもTregを誘導することに成功しており、将来臨床応用に繋がることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Regulatory T (Treg) cells are a suppressive subset of T cells. Many researchers are working on clinical application of Treg cells aiming for suppression of uncontrolled immune responses including autoimmunity. This study has established a culture method, by which effector T cells are reprogramed into Treg cells. Such effector-derived Treg cells showed a suppressive function in vivo in a mouse model. Metabolic shift was shown to be important for this reprogramming. The same culture method was able to induce Treg cells from human effector T cells. Therefore, this study can lead to the clinical application of effector-derived Treg cells in the future.

研究分野：免疫学

キーワード：エピジェネティクス リプログラミング 代謝 制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

(1)腸炎などの自己免疫疾患は、主に抗原特異的な T 細胞受容体 (TCR) を発現する T 細胞により引き起こされる。また白血病や悪性リンパ腫に対する主要な治療法である骨髄/幹細胞移植においては移植片対宿主病 (Graft Versus Host Disease; GVHD) という深刻なリスクを伴うが、これもアロ抗原を認識するドナー由来のアロ特異的 T 細胞によるものである。

(2)抗原の感作を受けていないナイーブ CD4 T 細胞は活性化していくつかのサブセットに分化する。上述のように、分化したエフェクター CD4 T 細胞は、適切な制御を受けなければ望まれない炎症を誘導する可能性がある。CD4 T 細胞サブセットの中でも、制御性 T 細胞 (Treg) はエフェクター T 細胞を抑制する機能をもつサブセットである。ナイーブ CD4 T 細胞を TGF-β 存在下で刺激することにより iTreg が誘導できる。過剰な免疫応答の抑制を目的とした Treg の臨床応用は世界中で追求されている課題である。

2. 研究の目的

自己免疫疾患や GVHD などで見られる過剰な免疫応答は早急に解決されるべき課題の一つである。そこで本課題では、炎症性のエフェクター CD4 T 細胞より人為的に Treg を誘導し、抗原特異的な免疫抑制療法樹立のための基礎を築くことを目的とした。抗原特異的 Treg による免疫抑制は、非特異的な免疫抑制剤と異なり、患者の正常な免疫機能を保持できる極めて副作用の少ない治療手段となることが期待される。

本課題では特に、Th1 サブセットを Treg にリプログラミングすることを目的とした。Th1 はエフェクター CD4 T 細胞サブセットの中でも極めて安定なサブセットであり、その安定性はエピゲノム修飾により担保されているものと考えられている。したがって Th1 のリプログラミングはエピゲノム領域の学術的な発展にも大きく寄与するものである。

3. 研究の方法

(1)マウス病態モデルを用いて、生体内での Th1R の炎症抑制能を検討する。リンパ球欠損マウスを用いた腸炎モデルおよび BALB/c 系統のマウスに B6 系統のマウス由来の細胞を移入することで誘導するアロ GVHD モデルを用いる。

(2)薬剤処理にて、Th1R の誘導効率の改善を試みる。ナイーブ CD4 T 細胞から Treg を誘導する際には、いくつか誘導効率や機能を良くする薬剤が報告がある。これらを Th1R の改良に応用できないか検討する。

(3)網羅的遺伝子発現解析およびクロマチン免疫沈降法 (ChIP) によるエピゲノム状態の解析を行う。マイクロアレイにて Th1R と iTreg の類似性を評価する。また ChIP にて

Foxp3 領域のエピゲノム修飾が、Th1R を誘導する過程でどのように変化するか解析する。

(4) TGF-β に対する感受性を解析する。Th1 から直接 Foxp3 発現が誘導されないメカニズムに迫るのが目的である。TGF-β の下流の Smad2/3 のリン酸化を指標に評価する。

(5)ウイルスベクターによる過剰発現系や CRISPR/Cas9 によるノックアウト解析を行う。方法(3)のマイクロアレイ解析にて、Th1R の誘導に重要と思われる遺伝子に着目する。これら遺伝子を、Th1R 誘導の過程で過剰発現あるいはノックアウトすることにより、Th1R 分化の分子メカニズムを解明する。

4. 研究成果

本研究課題の申請時点にて、すでに研究代表者らは Th1 から Foxp3 発現、すなわち Th1R を誘導する培養方法を樹立していた。具体的には、Th1 を、一旦 TCR 刺激を除いて休ませ (resting)、その後 TGF-β 存在下で刺激することによって Th1R は誘導される (図 1)。Th1R は試験管内の実験にて、T 細胞の増殖を抑制する能力を持つことを示している。

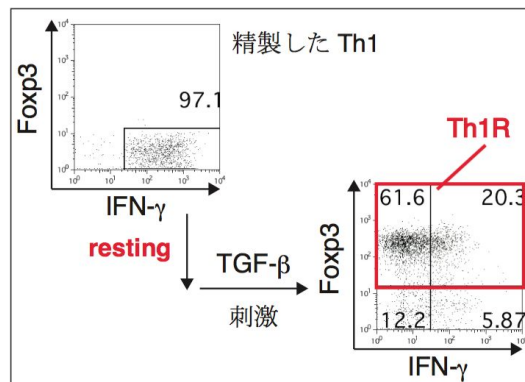


図 1 : resting による Th1R の誘導

(1)薬剤処理にて Th1R の改良を試みた。その結果、ビタミン A 代謝産物である all trans retinoic acid (ATRA) が IFN-γ 産生を抑え Foxp3 発現効率を上げた。またビタミン C が Foxp3 発現を安定化させた。ビタミン C による Foxp3 発現の安定化は、試験管内での培養とマウス個体に移入した場合の両方でみられた。ATRA とビタミン C 存在下で誘導した改良型 Th1R を A/C-Th1R と呼ぶ。特に ATRA はヒトの Th1R を誘導する際にも有用で、IFN-γ 発現の低いヒト Th1R が高い効率で誘導することができた。

(2)マイクロアレイのデータで PC 解析を行った。結果、Th1R の遺伝子発現パターンは元の Th1 から、より iTreg のそれに近い状態となっていた (図 2)。図中の Rested とは resting 後の細胞を指し、Th1+ TGF-β とは resting を介さずに Th1 を TGF-β 存在下で刺激した細胞である。すなわち Th1+ TGF-β は Foxp3 を発現しない細胞である。Th1+ TGF-β の細胞の遺伝子発現パターンは Th1 のそれとほとんど変化がなく、したがって resting によ

り Th1 が TGF- β に応答するようになることがこの網羅的遺伝子発現解析からも示唆された。

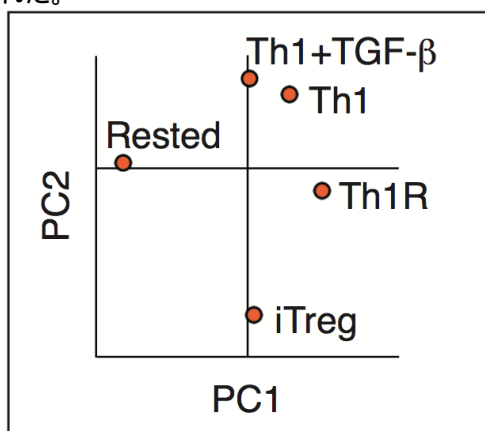


図 2 : マイクロアレイ ; PC 解析の結果

Foxp3 遺伝子座を対象に ChIP 解析およびメチル化解析も行った。その結果 Th1 では Foxp3 領域は抑制性的のエピジェネ修飾を受けていることが分かった。一方 Th1R では iTreg と同様にこの領域は活性型の修飾がされていた。非常に興味深いことに、この抑制性的の修飾は、resting では大きな変化が見られないことも示された。したがって当初はエピジェネの変化をきっかけに Th1 から Foxp3 が発現されるようになると予想していたが、resting 時にエピジェネティクスの変化に先立って Foxp3 発現を可能にするような別の変化が起こることが示唆された。また解析の結果、iTreg にて報告があるように、Th1R においてもビタミン C は Foxp3 遺伝子座の CNS2 領域のメチル化を外す作用があることが示された。既報と併せて考えると、ビタミン C による Foxp3 発現の安定化はこの CNS2 領域の脱メチル化に依るものと考えられる。

(3) 各 Th1R の誘導段階での TGF- β への感受性を調べるため、Smad2/3 のリン酸化を測定した。その結果ナイーブ CD4 T 細胞に比べて Th1 では予想どおり Smad2/3 のリン酸化が抑制されており、resting によってこれが回復することが示された。加えて Th1 では Smad3 の発現自体も低下することが分かった。マイクロアレイの結果から TGF- β の下流の遺伝子の変化も解析したところ、リン酸化の結果と一致して Th1 では TGF- β への応答性が低いことが示唆されていた。

(4) 結果(1)の、薬剤の効果を検討している過程にて、阻害剤 rapamycin 処理にて Th1 から直接 Foxp3 発現が誘導できることを見出した。rapamycin は代謝を司る mTORC1 の阻害薬である。T 細胞において mTORC1 は TCR 刺激によって活発になることは知られている。Resting (TCR 刺激無し)により Th1R が誘導できることと rapamycin の効果を併せて考えて、代謝の変化、すなわち mTORC1 の抑制によって Th1 より Foxp3 発現が可能になるのではないかという新たな仮説を立

てた。T 細胞分化と代謝の関係は当時から盛んに研究されており、Th1 を含むエフェクター T 細胞の分化には解糖系に依存した代謝が、Treg の分化にはミトコンドリアにおける酸化的リン酸化に依存した代謝がそれぞれ重要であることが報告された。また TCR 刺激の結果 mTORC1 を介して解糖系が活発に動くことも報告があった。これらを踏まえて Th1R 誘導の過程の代謝状態の変化を重点的に解析した。解析方法として、グルコース類似体の取り込みによる解糖系の評価や、蛍光試薬によるミトコンドリアの膜電位の測定、およびフラックスアナライザーによる直接的な解糖と酸化的リン酸化の測定を行った。その結果ナイーブ CD4 T 細胞 Th1 resting 後の細胞という培養過程において、主な代謝経路が酸化的リン酸化 解糖系 再び酸化的リン酸化という変化をすることが明らかとなった。rapamycin 処理による Th1 から Foxp3 誘導と対をなす実験として、resting 中に酸化的リン酸化の阻害剤を加えた。すると予想通り Th1R の誘導効率は大きく低下し、仮説の通り代謝状態が Th1R の誘導に大きな役割を果たすことが明らかとなった。

(5) 過剰発現系やロックアウトによる Th1R 誘導の分子メカニズムの解明を試みた。Cas9 をウイルスベクターにて導入する系は、Cas9 自体の導入効率が極めて低く、解析は断念した。そこで主にウイルスベクターによる過剰発現系を用いて解析した。結果(3)の内容を受けて Smad3 を Th1 に過剰発現させたところ、Th1 から resting を介さずに Foxp3 発現を誘導することができた。また、TCR の下流の mTORC1 関連遺伝子群を resting 中に過剰発現させる実験系により、代謝の影響を検討した。結果は仮説通りで、mTORC1 経路を促進するような遺伝子を発現させた場合は Th1R 誘導効率が上昇し、この経路を抑制するような遺伝子を発現させた場合は反対の結果になる、という傾向がみられた。

(6) マウス病態モデルを用いて、Th1R の免疫抑制能を解析した。アロ GVHD モデルは全身性の激しい炎症を伴う致死性の疾患モデルで、Th1R の移入では抑えることはできなかった。そこで腸炎モデルを中心に解析を進めた。まずリンパ球欠損マウスに Th1R 単独で移入した場合、腸炎等の炎症を引き起こさなかった。Th1R は炎症性のエフェクター Th1 由来であるため、それ自体が生体に害であるおそれがあったが、そのようなことは起きなかった。次にナイーブ CD4 T 細胞をリンパ球欠損マウスに移入する腸炎モデルにて、同時に Th1R も移入して病態を解析した。移入する細胞としては、改良型の A/C-Th1R を用いた。A/C-Th1R は、iTreg には劣るものの腸炎を有意に改善した(図 3)。すなわち Th1R が生体内にて免疫抑制能を持つことが示された。

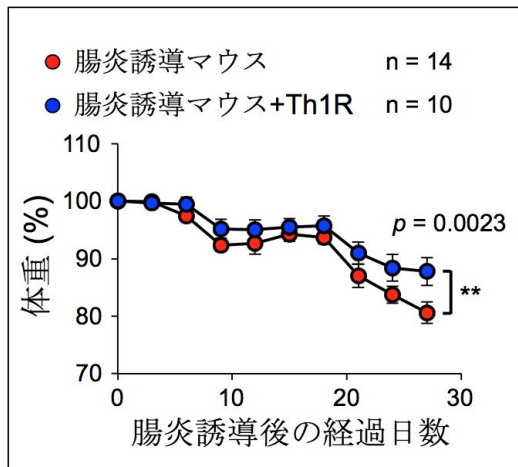


図 3 : Th1R 移入による腸炎の改善

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 1 件)

発表者：Mitsuhiro Kanamori

発表表題：Induction of regulatory T cells from Th1 cells through metabolic reprogramming

学会名：The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society

発表年：2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

金森 光広 (KANAMORI, Mitsuhiro)

慶応義塾大学・医学部 (信濃町)・特任助教

研究者番号：00772336

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()