

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860748

研究課題名(和文) 胸腺由来制御性T細胞のin vivoでの誘導による免疫制御の基礎的検討

研究課題名(英文) A basic study about the immune regulation by thymus-derived regulatory T cells induced in vivo

研究代表者

濱野 良子 (Hamano, Ryoko)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：10623655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウスにおいて高容量の抗原を経静脈投与することで血中抗原が胸腺樹状細胞により抗原提示され胸腺由来の抗原特異的T細胞を誘導し、さらにIL-2-IL-2抗体の免疫複合体(以下IL-2IC)を投与することでこれらの抗原特異的T細胞は効率的に増幅することができることが報告されている。これらの結果に基づき、我々は以下のような結果が得られた。

経静脈的に抗原を投与しさらにIL-2ICを投与することで抗原特異的制御性T細胞を効果的に誘導増幅させることができた。それらの細胞群はCCR2依存性に抗原投与部位に集積することが観察され、さらに集積した制御性T細胞は局所の炎症に関与していた。

研究成果の概要(英文)：It is reported that a combined i.v. administration of antigen and IL-2-anti-IL-2 Ab immune complexes (IL-2 ICs) efficiently expands antigen-specific Treg cells in the thymus and induces their migration into peripheral blood. In this study, we explored that the expanded antigen-specific Treg cells rapidly move into the antigen injected site in CCR2 dependent manner. Moreover, prior treatment with antigen and IL-2 ICs enhanced antigen-specific Treg-cell migration and inhibited delayed type hypersensitivity (DTH) reactions. Thus, the treatment with Ag and IL-2 ICs can efficiently expand Ag-specific Treg cells with the capacity to migrate and reduce localized immune responses.

研究分野：免疫学

キーワード：制御性T細胞 胸腺 炎症

1. 研究開始当初の背景

制御性 T 細胞は CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ を主たる表現型とする T 細胞のサブセットの一つで過剰な炎症反応や、アレルギー、自己抗原に対する不要な免疫反応の抑制など、免疫の恒常性の維持に重要な役割を持つ細胞である。大きく二つに分けられ、胸腺で分化誘導される natural occurring Treg と末梢で誘導される induced Treg である。

制御性 T 細胞の欠損や低下はヒト・マウスにおいて自己免疫疾患を引き起こすことから、制御性 T 細胞の機能的、量的な強化は自己免疫疾患や過剰な炎症反応の制御に有効と考えられ、制御性 T 細胞を増加させ治療への利用を目指す研究は多数なされてきた。しかし、1) 制御性 T 細胞をポリクローナルに過剰に増加、活性化させることは既存の免疫抑制剤などと同様に易感染状態を来すことや 2) これまでの多くの検討では可塑性に問題がある induced Treg が誘導されている、という 2 つの問題点が指摘されている。

近年、マウスにおいて IL-2 とモノクローナル IL-2 抗体の免疫複合体 (以下 IL-2IC) を投与することで in vivo で制御性 T 細胞を増加させることで、自己免疫疾患を抑制することが報告された (Webster 2009)。また高用量の抗原をマウスに投与することで、血中抗原が胸腺由来制御性 T 細胞を誘導することが報告されている (Baba 2013)。われわれはこれらの結果を踏まえ、IL-2IC の投与により効果的に増幅した抗原特異的制御性 T 細胞が局所の抗原部位に良好に集積することを確認し、このことは、高容量抗原 + IL-2IC の投与により誘導された胸腺由来制御性 T 細胞の誘導は、上記の 2 つの問題点を解決し特定の炎症反応や局所での炎症反応の抑制可能にすることが想定された。

以上の想定のもと、胸腺由来の抗原特異的制御性 T 細胞の分化誘導方法を確立し、自己免疫疾患やアレルギー抑制の可能性を検証することを本研究の目的とした。

2. 研究の目的

制御性 T 細胞は、エフェクター T 細胞の活性化を抑制することで、過剰な免疫反応を抑制する作用のある T 細胞の 1 サブセットである。高用量の抗原投与が胸腺由来の抗原特異的 T 細胞を誘導され IL-2IC を投与することで、

さらにこれらの抗原特異的 T 細胞は効果的に増幅することを見出していることから、これら胸腺由来抗原特異的制御性 T 細胞を効果的に vivo で増幅させる方法を確立し、さらに増幅させた抑制性 T 細胞によるアレルギーや自己免疫疾患モデルでの炎症抑制の可能性を検討することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

卵白アルブミン (OVA) 特異的 T 細胞受容体導入遺伝子改変マウス (D011.10 マウス) に対して経静脈的に OVA を投与し、さらに IL-2IC を投与することで効果的に抗原特異的制御性 T 細胞を誘導・増幅させる方法を確立させ、この細胞の特徴を表面マーカーや転写因子などをフローサイトメトリーを用いて明らかにする。これらの細胞はすでに予備実験にて局所の抗原投与部位に効果的に集積することが確認されており、その動態に関わる分子を明らかにする。さらに、D011.10 マウスにあらかじめ抗原特異的制御性 T 細胞を誘導したマウスに、遅延型過敏反応や関節炎を惹起することで、それらの疾患モデルにおける抗原特異的制御性 T 細胞による炎症反応の抑制を肉眼的、病理学的に評価する。十分な抑制能がみられた場合は、そのメカニズムについても検討を行う。

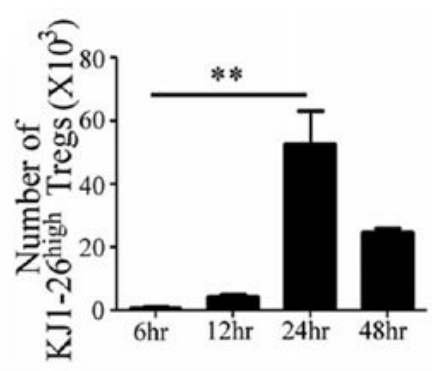
4. 研究成果

背中に空気を皮下注射することでエアパウチを作成した D011.10 マウス (6 から 8 週齢) に、Day0, 1 と 2 日間連続で 2 mg の OVA を静脈投与し、Day3 にエアパウチ内に OVA を投与した。この時、Day 3 をピークに胸腺内に抗原特異的 Foxp3⁺ 胸腺細胞が誘導され、血中では抗原特異的制御性 T 細胞が出現した。さらに、エアパウチ内への OVA 投与から 24 時間後をピークに、抗原特異的制御性 T 細胞がエアパウチ内に集積した。(図 1)

胸腺切除マウスと脾臓切除マウスで同様に 2mg の高用量 OVA を連続投与したところ、胸腺切除マウスでのみ有意に制御性 T 細胞の誘導が減少した。この結果から、抗原投与部位に集積する制御性 T 細胞の大部分は胸腺由来であることが示唆され、それらの制御性 T 細胞は局所の抗原に対して集積することが

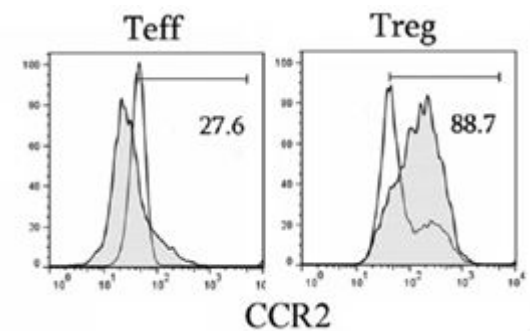
確認された。

(図1)



制御性 T 細胞の遊走・集積には TARC-CCR4 の関与が広く知られている。OVA の投与によって誘導された抗原特異的制御性 T 細胞でも CCR4 の発現が認められた。今回、CCR4 の発現に加えて、エアパウチ内に集積した制御性 T 細胞ではエフェクター T 細胞 (Teff) と比較して CCR2 が強く発現されていた。また OVA を投与したエアパウチ内では CCR2 のリガンドである CCL2 の上昇が確認された。さらに、CCR2 抗体を投与し CCR2 を阻害すると、エアパウチへの抗原特異的制御性 T 細胞の誘導は阻害されたことから、抗原特異的制御性 T 細胞の動態には、CCL2-CCR2 が関与していると考えられた。(図2)

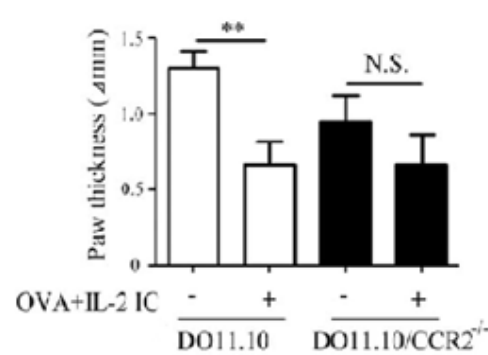
(図2)



DO11.10 と野生型マウスの骨髄キメラマウスを作成した。それらのマウスを OVA とアジュバンドにて免疫しさらに足底に遅延型過敏反応を惹起した。あらかじめ OVA と IL-2IC を投与し抗原特異的制御性 T 細胞を増加させたマウスでは、遅延型過敏反応が著明に抑制されることが観察された。さらに OVA と IL-2IC を投与したマウスでは局所組織で制御性 T 細胞の集積することが確認された。一

方、これらの炎症抑制効果は CCR2 をノックアウトしたマウスでは軽減された。(図3)

(図3)



野生型マウスにおいても遅延型過敏反応を惹起したところ、同様に OVA と IL-2IC を投与することで局所の炎症反応が抑制された。

以上の結果より、高用量の抗原と IL-2IC を投与することで胸腺由来の抗原特異的制御性 T 細胞を効果的に増幅させることが可能であることが明らかとなった。さらに、増幅された抗原特異的制御性 T 細胞は、CCR2 依存的に抗原存在部位に集積し、抗原存在部位における免疫・炎症反応を制御することによって、抗原特異的免疫反応を抑制していると考えられた。これらの結果は抗原特異的・臓器特異的な炎症を伴う自己免疫疾患などで効果的な免疫抑制を実現できる可能性が示唆された。

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4件)

- 1) Characterization of MT-2 cells as a human regulatory T cell-like cell line. *Cell Mol Immunol.* 2015 Nov;12(6):780-2 (査読あり)

Hamano R Wu X, Wang Y, Oppenheim JJ, Chen X

- 2) A case developing minimal change disease during the course of IgG4-related disease. *Mod Rheumatol.* 2015 Mar 24;1-4. (査読あり)

Yamada K, Zoshima T, Ito K, Mizushima I,

Hara S, Horita S, Nuka H, Hamano R, Fujii H, Yamagishi M, Kawano M.

3) Efficacy of coronary artery screening tests and intervention in hemodialysis patients. Ther Apher Dial. 2014 Oct;18(5):443-9 (査読あり)

Daimon S, Mizushima I, Hamano R, Terai H.

4) Ag and IL-2 immune complexes efficiently expand Ag-specific Treg cells that migrate in response to chemokines and reduce localized immune responses. Eur J Immunol. 2014 Apr;44(4):1005-15. (査読あり)

Hamano R, Baba T, Sasaki S, Tomaru U, Ishizu A, Kawano M, Yamagishi M, Mukaida N.

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

濱野 良子 (HAMANO, Ryoko)

金沢大学医学系研究科 協力研究員

研究者番号：10623655

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：