

B細胞抗体産生を抑制するCD4陽性CD25陰性LAG3陽性制御性T細胞の解析

東京大学 医学部附属病院 アレルギーリウマチ内科
藤尾 圭志

1. はじめに 緒言 目的 背景 序論

自己免疫性疾患は、様々な臓器に炎症を生ずる。全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) では腎臓、中枢神経、皮膚など、関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) では関節に炎症を生ずる。注目すべき点は、これらの疾患で共通して自己抗体が出現することである。SLE では抗 2 本鎖 DNA 抗体、抗 Sm 抗体、RA ではリウマトイド因子、抗シトルリン化蛋白抗体 (anti-citrullinated protein antibody: ACPA) などが出現する。これらの自己抗体は標的臓器に沈着して補体系の活性化、好中球遊走、免疫複合体形成を誘導する。つまり、自己抗体は自己免疫性炎症で中心的な役割を果たすと考えられる。

RA をはじめとする自己免疫疾患の実臨床では、抗サイトカイン療法を中心とする生物学的製剤により、症状が消失する臨床的寛解が達成できるようになった。しかしそれらを達成できる割合は限られており、さらに感染症を含む副作用など問題も多い。臨床的寛解においても自己抗体が完全に陰性化する「免疫学的な寛解」は達成できず、自己抗体による炎症性カスケードを動かすプロセスの残存が想定される。このことが治療継続中または終了後の、高い再燃率につながると考えられる。そこで自己抗体産生の抑制は、炎症の成立の基盤を除き、真の治癒につながることができると考えられる。

免疫系は車でいえばアクセルに相当する活性化シグナルと、ブレーキに相当する抑制シグナルを含む。抗体産生の活性化シグナルについては解明が進んでいるが、抑制シグナルについてはほとんど分かっていない。最近申請者らは、B細胞の抗体産生を抑制するユニークな機能を持つ新規制御性T細胞 (regulatory T cells; Treg) サブセットである、lymphocyte activation gene-3 (LAG3) 陽性の Treg (LAG3Treg) を同定した。解析により LAG3Treg が抗体産生の生理的なブレーキであるという知見が集積されつつあり、このサブセットの解明は新たな自己免疫疾患治療戦略の開発につながると考えられる。

申請者らは今まで知られていたCD4陽性CD25陽性FoxP3陽性の制御性T細胞 (FoxP3Treg) とは異なる、全く新規でかつ強力な作用を持つ制御性T細胞集団、LAG3Tregを同定した (Okamura, T et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 106:13974, 2009, Fujio, K et al *Adv Immunol* 105:99, 2010)。FoxP3Treg は制御性T細胞の主要なサブセットであり、自己免疫寛容の維持に重要である (Sakaguchi S. et al. *Science* 317:627, 2007)。しかし機能的なFoxP3Tregを欠損するScurfyマウスは関節炎を生じず、SLE類似の全身性自己免疫疾患像も呈さないなど、FoxP3Tregの誘導だけで関節炎や抗核抗体を介した炎症を制御できるかどうかは不明であった。申請者らが同定したLAG3TregもFoxP3Tregと同様に、試験管内、生体内での抑制活性を持ち、腸炎の抑制及び腸管抗原に対する免疫寛容に関与している。さらに最近の解析でLAG3Tregは試験管内、生体内での抗体産生を抑制する活性があり、SLEモデルマウスにおいて強力な治療効果を発揮した。このLAG3TregはCD4陽性CD25陰性LAG3陽性の表現型を持ち、CD4陽性T細胞の中での割合は脾臓で2%、パイエル板で7%である。FoxP3遺伝子は発現せず、転写因子Egr2を発現するのが特徴で、IL-10を高産生しマウス腸炎を抑制する活性を持つ。LAG3Tregは胸腺そのものでは分化せず、B細胞依存性に分化する点でも、FoxP3Tregとは全く異なる。

実際にループスモデルマウスMRL/lprマウスに、Fas遺伝子の変異の無いMRL/+マウス由来のLAG3Tregを少数移入すると、自己抗体産生、腎炎などの病態が著明に改善された。対照的に、MRL/+マウス由来のFoxP3Tregを移入しても病態は改善しなかった。そこで本研究では具体的には試験管内でB細胞とCD4陽性T細胞を共培養した場合の抗体産生に対する、CD4陽性CD25陰性LAG3陽性Tregの影響、さらにB細胞とCD4陽性T細胞を移入したRAG1欠損マウスを抗原で免疫した際の抗体産生へのCD4陽性CD25陰性LAG3陽性Tregの影響の観察を目的とした。さらにこの2つの解析系においてCD4陽性CD25陰性LAG3陽性Tregが抗体産生抑制能を発揮する際に重要な分子メカニズムを検討した。

2. 方法

生体内の抗体産生抑制実験では、B6マウス由来のB細胞と、トリアルブミン(OVA)特異的T細胞レセプタートランスジェニックマウスOT-IIマウス由来のCD4陽性T細胞を共移入し、NP-OVAで2回免疫する実験系

を用いた。共移入の際にCD4陽性CD25陰性LAG3陽性T細胞またはCD4陽性CD25陽性T細胞を同時に移入した。試験管内の抗体産生抑制実験では、NP-OVAで2回免疫したB6マウス由来のB細胞とCD4陽性T細胞を共培養し、抗NP-OVA抗体の産生を誘導した。共培養の際にCD4陽性CD25陰性LAG3陽性T細胞またはCD4陽性CD25陽性T細胞を添加した。さらにPD-1欠損マウス、T細胞特異的Egr2欠損マウス由来のB細胞、T細胞も適宜実験に使用した。

3. 結果 研究成果

B6マウス由来のCD4陽性CD25陰性LAG3陽性T細胞は、B細胞とヘルパーT細胞を移入したRAG1欠損マウスをNP-OVAで2回免疫することによる抗NP-OVA抗体産生を抑制した。この抑制時にはGerminal Center B細胞の分化が著明に抑制されていた。NP-OVAで免疫したB6マウス由来のB細胞とヘルパーT細胞の試験管内の共培養による抗NP-OVA抗体産生は、CD4陽性CD25陽性Tでは抑制されなかったが、CD4陽性CD25陰性LAG3陽性T細胞により著明に抑制された。

CD4陽性CD25陰性LAG3陽性T細胞の生体内の抗体産生抑制機能に関連しうる共刺激分子を検討したところ、PD-1のリガンドであるPD-L1がCD4陽性CD25陰性LAG3陽性T細胞上に発現していた。そこでCD4陽性CD25陰性LAG3陽性T細胞移入による生体内の抗体産生抑制実験において、PD-1欠損B細胞を用いたところ、抗体産生は抑制されなかった。これらのことからCD4陽性CD25陰性LAG3陽性T細胞上のPD-L1がB細胞上のPD-1を介して抗体産生を抑制していることが明らかとなった。さらにCD4陽性CD25陰性LAG3陽性T細胞に発現しているEgr2の機能を、T細胞特異的Egr2欠損マウスを用いて検討した。するとEgr2欠損CD4陽性CD25陰性LAG3陽性T細胞は抗体産生抑制機能が減弱していた。

4. 考察 まとめ

CD4陽性CD25陰性LAG3陽性T細胞は生体内でPD-L1/PD-1依存性にB細胞の抗体産生・Germinal Center B細胞への分化、を抑制することが分かった。さらにCD4陽性CD25陰性LAG3陽性T細胞の抗体産生抑制にはEgr2が必要であった。よってCD4陽性CD25陰性LAG3陽性T細胞ひいてはナイーブT細胞における、Egr2およびPD-L1の発現を制御することにより、自己抗体産生を抑制できる可能性があることが分かった。今回の知見は自己抗体を介する自己免疫疾患の治療法の開発に、有用な知見となると考えられた。

5. 発表論文、参考文献

- (1) Detection of autoantibody to citrullinated BiP in rheumatoid arthritis patients and pro-inflammatory roles of citrullinated BiP in collagen-induced arthritis. Shoda H, Fujio K*, Shibuya M, Okamura T, Sumitomo S, Okamoto A, Sawada T, Yamamoto K. *Arthritis Res Ther* in press *corresponding author
- (2) Role of LAG3 and EGR2 in regulatory T cells. Okamura T, Fujio K*, Sumitomo S, Yamamoto K. *Ann Rheum Dis* in press *corresponding author
- (3) Regulatory T cell-associated cytokines in systemic lupus erythematosus. Okamoto A, Fujio K*, Okamura T, Yamamoto K. *J Biomed Biotech* in press *corresponding author
- (4) The future of lupus therapy modulating autoantigen recognition. Okamoto A, Fujio K*, Yamamoto K. *Lupus* 19: 1474, 2010 *corresponding author
- (5) The family of IL-10-secreting CD4+ T cells. Fujio K, Okamura T, Yamamoto K. *Adv Immunol* 105:99, 2010
- (6) Regulatory polymorphisms in EGR2 are associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. Myouzen K, Kochi Y, Shimane K, Fujio K, Okamura T, Okada Y, Suzuki A, Atsumi T, Ito S, Takada K, Mimori A, Ikegawa S, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K. *Hum Mol Genet* 19:2313, 2010