

# 免疫寛容誘導による自己抗原特異的免疫抑制療法の確立

神戸大学医学部附属病院臨床検査医学分野

笠木 伸平

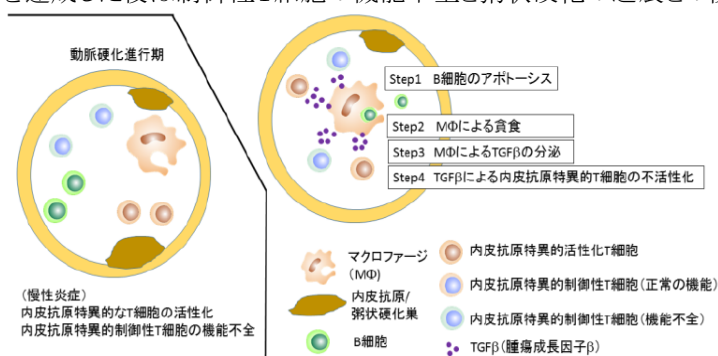
## 1. はじめに

**緒言** アテローム性動脈硬化(粥状硬化)は、致死的な合併症やその高い罹患率を背景とする医療経済学的な観点等の理由からその予防はわが国の大変重要な課題となっている。しかし、粥状硬化症に対する治療は、未だ確立どころか提唱すらもされていない。本研究は、動脈硬化の病態と考えられている血管内皮抗原に対する慢性炎症に対して、血管内皮抗原特異的な制御性T細胞のみを選択的に体内で誘導することで慢性炎症を抑制し、粥状硬化の治癒を目指すものである。

**目的** 制御性T細胞を抗原非特異的に誘導するのではなく、血管内皮抗原特異的な制御性T細胞のみを選択的に体内で誘導することで免疫不全を誘導することなく動脈硬化を抑制できる治療法を確立すること。

**背景** これまでの研究で、感染抗原に対する免疫応答には影響を与えずに(免疫不全を起こさずに)特定の抗原に対する免疫応答を選択的に体内で抑制する免疫抑制療法を自己免疫疾患モデルマウスを使った実験系で確立した。(Kasagi S et al. Science Translational Medicine 6,241ra78, 2014) 本治療法は、T細胞or B細胞除去抗体療法)に引き続いて特定の抗原の投与を投与することで特定抗原に特異的な制御性T細胞を選択的に誘導することが可能であり、動脈硬化の治療に適用した場合は図①のような治療機序が考えうる。

**序論** 以上のことから血管内皮抗原に特異的な免疫抑制療法の確立により動脈硬化の治療を確立させることを第一の目標とする。また、制御性T細胞の免疫抑制機能の機能不全が血管内皮における免疫恒常性の破綻、あるいは粥状硬化の進展に関与している可能性があり、第一の目標と併行して病態の解明も行いたい。第一の目標を達成した後は制御性T細胞の機能不全と粥状硬化の進展との関連についても検証していく。



図①

血管内皮抗原特異的なT細胞は以下の方法で誘導する。すなわち、抗CD20抗体(リツキサソ)によりB細胞にアポトーシスを誘導した後にそれを貪食したMΦがTGFβを大量に分泌し、血管内皮抗原特異的なT細胞を不活性化する。

## 2. 方法

### 1) 血管内皮抗原特異的な免疫抑制療法の確立

動脈硬化モデルマウスであるApo-E欠損マウスのペアを購入、その後、交配により8週齢のApoE欠損マウス

(メス)15匹を用意した。その上で、すべてのマウスに血管内皮抗原であるHSP65(10 $\mu$ g)と抗原賦活剤であるICFAで作成したエマルジョンをマウスの尾根部(皮下注射)に免疫した。初回の免疫後2週間後(10週齢時)も同様に追加免疫を行った。マウスを3群(1群あたり5匹)にわけ、内1群は12~14週齢時にかけてHSP65を5 $\mu$ g隔日で腹腔内に投与した。また、別の1群は12週齢時に抗CD20抗体(Genentech社からMTAにて入手)をマウス1匹あたり250 $\mu$ g腹腔内投与し、続けて同じく12~14週齢時にかけて、HSP65を5 $\mu$ g隔日で腹腔内に投与した。20週齢時に解析のためマウスをsacrificeした。

## 2)制御性T細胞の機能不全と粥状硬化の進展との関連の検討

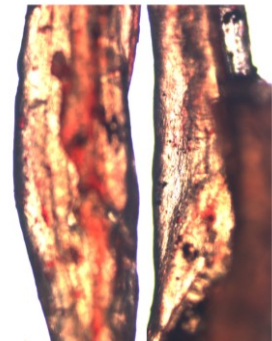
Apo-E欠損マウスに $\gamma$ 線の全身照射を施したのちにDEREGマウス(ジフテリア毒素により制御性T細胞を体内から除去できるマウス)の骨髄を移植することで骨髄キメラマウスを作成し、ジフテリア毒素処理により制御性T細胞を除去した場合に粥状硬化がどのように進展するのを経時的に検討する。現在マウスを作成中である。

## 3. 結果

### 1)動脈硬化の進展に関して

HSP65(10 $\mu$ g)とICFAで免疫されただけのコントロール群、HSP65の投与を受けた群(HSP65群と定義)と比較して、抗CD20抗体とHSP65の治療を受けた群(以下抗CD20抗体+HSP65群)では、大動脈壁のOil Red染色(脂肪染色)による染色範囲(=動脈硬化の程度)が軽度であった(図②)。また、動脈硬化巣内に浸潤する細胞を同定するために免疫染色のための大動脈は同じグループ(5匹)でプールし、コラゲナーゼ処理を行った後にPercoll液によるリンパ球の抽出を試みたが、回収できた細胞数が極めて少なく、血管内の免疫細胞のFACSによる機能解析は困難であった。

図② HSP65 CD20抗体+HSP65



### 2) 制御性T細胞の誘導に関して

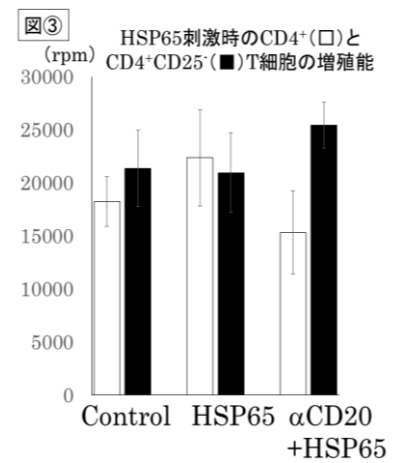
実験終了時点での各マウスの脾臓細胞を回収し、CD4陽性細胞中のFoxp3陽性制御性T細胞の比率を測定したところ、抗CD20抗体+HSP65群では他の2群と比較して有意に制御性T細胞の比率が高かった。

抗原特異的な制御性T細胞の誘導の有無を検討する目的で、同じ細胞をテトラマー抗体(NIH tetramer core facilityから提供)で染色しFACSによる解析を試みたがうまくいかず別の方法(以下3)の項参照)の評価方法に切り替えた。

### 3) HSP 65特異的と非特異的な免疫反応の評価、およびHSP65特異的な制御性T細胞の機能評価

実験終了時点での各マウスの脾臓細胞を回収した後に各群のマウス5匹の脾臓細胞をプールをし、脾臓CD4+CD25<sup>-</sup>細胞と脾臓CD4陽性細胞をわけて抽出、その後、それぞれの細胞(同数)を樹状細胞の存在下で抗原特異的な刺激;HSP65(10 $\mu$ g/ml)あるいは抗原非特異的な刺激;抗CD3抗体(0.5 $\mu$ g/ml)を加えた。(96ウェル使用、Triplicate)その結果、HSP65特異的なCD4<sup>+</sup>T細胞の増殖能は抗CD20抗体+HSP65群で他の2群と比較して低く(図③)、一方で、抗CD3抗体による抗原非特異的なT細胞増殖能は抗CD20抗体+HSP65群で他の2群と比較してむしろ上昇していた。すなわち、抗CD20抗体+HSP65群では、他の2群と比

較して、HSP65特異的なT細胞の増殖のみが選択的に抑制されていた。さらに、制御性T細胞(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>)を含まないCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T細胞分画のHSP65特異的な細胞増殖能は、制御性T細胞を含むHSP65特異的なCD4<sup>+</sup>T細胞増殖能と比較して著明に多く、この傾向は抗CD20抗体+HSP65群でとくに著明であったことから、抗CD20抗体+HSP65群では特に脾臓中にHSP65特異的なCD4<sup>+</sup>T細胞の増殖を抑制する制御性T細胞、すなわち、HSP65特異的な制御性T細胞が他の2群と比較して



豊富に含まれていると考えられた(図③)。

#### 4. 研究成果

今回の結果により、抗CD20抗体+HSP65の併用療法により抗原非特異的なT細胞増殖能を保持したままHSP65特異的なT細胞の増殖能が抑制され、その抑制にHSP65特異的な制御性T細胞が重要な働きをしていること、また本治療でモデルマウスにおける動脈硬化が抑制されること(=免疫寛容誘導による自己抗原特異的免疫抑制療法が動脈硬化モデルマウスでも可能である)ことが分かったことが最大の成果であると考えられる。

#### 5. 考察

本研究により抗CD20抗体+HSP65の併用療法により動脈硬化を抑制できるということが1回の実験ではあるが認められたことは期待できる結果であると考えられる。この併用療法によりHSP65特異的制御性T細胞が誘導される機構、その機構におけるTGF-βやIL-10の関与の有無、それらの産生細胞の同定などの検討課題が残っている。制御性T細胞の関与を検討する目的で抗CD25抗体(制御性T細胞の除去抗体)を、TGF-βやIL-10の関与を検討する目的でそれぞれの中和抗体を*In Vivo*の実験系で治療と併用して使用し、治療効果が相殺されるかどうかを現在検討中である。今回はB細胞除去抗体を使用したが、現在高用量の抗体を入手することが困難である状況があり、B細胞除去抗体を入手できない期間においてT細胞除去抗体療法(抗CD4抗体と抗CD8抗体)で代用できると考え、次の実験で本抗体を使用する予定である。今回はHSP65を腹腔内に投与したが、経口や経静脈的(より臨床に近い形式で)に投与した場合にどうなるのか、制御性T細胞の機能不全と粥状硬化の進展との関連の検討などまた検討できておらず、課題は山積している。

#### 5. 発表論文、参考文献

**Kasagi S**, Zhang P, Che L, Abbatiello B, Maruyama T, Nakatsukasa H, Zanvit P, Jin W, Konkel JE, Chen W. In vivo-generated antigen-specific regulatory T cells treat autoimmunity without compromising antibacterial immune response. *Science Translational Medicine* 6,241ra78, 2014.