

論文の内容の要旨

論文題目 Type 1 regulatory T cell における転写因子 Jazf1 を介した IL-10 産生制御機構の解明

氏名 河野 正憲

全身性エリテマトーデス(Systemic Lupus Erythematosus: SLE)は抗 double-strand DNA (ds-DNA) 抗体の出現と免疫複合体沈着を特徴とした全身性自己免疫疾患であり、多臓器障害を生じる代表的膠原病である。1950 年初頭には 5 年生存率はわずか 50%であったが、治療法の発展により 10 年生存率は 95%以上と劇的に改善した。しかし、今日においても SLE 患者の死亡リスクは同年代一般人口と比較して高く再燃率も極めて高いことから、新たな治療薬の開発が求められている。

免疫系は自己と非自己を区別しながら自己免疫応答を惹起しない仕組みを備えているが、完全ではなく、一部の自己反応性 T 細胞は制御性 T 細胞 (regulatory T cell: Treg)などにより抑制的に制御される。Treg はその分化誘導される部位により胸腺で誘導される thymus-derived Treg (tTreg)と、末梢 (胸腺外) で誘導される peripherally derived Treg (pTreg)に大別される。免疫学的恒常性は tTreg と pTreg が協調することで保たれていると考えられており、代表的 pTreg として type 1 regulatory T cell (Tr1 細胞)が知られている。Tr1 細胞は IL-10 を高産生し主に IL-10 によって免疫抑制機能を発揮するが、tTreg と異なりその機能は転写因子 Foxp3 に依存しない。

当研究室は Tr1 細胞の一つである IL-10 高産生性 CD4⁺CD25⁺LAG3⁺ Treg (LAG3⁺ Treg)を同定した。LAG3⁺ Treg は転写因子 early growth response gene 2 (Egr2)を発現し、IL-10 産生を介してマウス腸炎モデルを改善する。さらに、当研究室では LAG3⁺ Treg が TGF-β3 産生を介して強力に B 細胞抗体産生を抑制し、SLE モデルマウスにおけるループス様病態を改善することを報告している。その後の解析で、Toll 様受容体刺激下の B 細胞は IL-10 または TGF-β3 単独では抗体産生が増強されるが、両者が共存することで抗体産生は負に制御されることを示し、サイトカインが共存することで免疫応答促進性から抑制性に転化する現象を Inhibitory Cytokine Synergy (ICS)と定義し報告した。これらの結果は、LAG3⁺ Treg から産生される TGF-β3 のみならず IL-10 もループス様病態制御において必須であることを意味している。

近年、ゲノムワイド関連解析(GWAS)が盛んに行われ、自己免疫疾患においても数多くの研究が発表されている。GWAS で同定された疾患感受性遺伝子は、論理的帰結として疾患の原因や増悪に一義的に関与している。SLE においては、現在までに疾患と関連する遺伝子座が 100

以上報告されている。その中で近年新たに報告された *Juxtaposed with another zinc finger gene 1* (*JAZF1*) 遺伝子は SLE のみならず関節リウマチや全身性強皮症、炎症性腸疾患など複数の疾患感受性遺伝子であり、SLE をはじめとする自己免疫疾患発症に重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら免疫制御機構における *JAZF1* 遺伝子の機能はこれまでのところ明らかとなっていない。そのため、本研究では、SLE 疾患感受性遺伝子 *JAZF1* の役割を、SLE 病態制御で中心的な役割を果たす LAG3⁺ Treg を含む各種 CD4⁺ T 細胞の詳細な機能解析を通じて明らかとした。

我々はまず WT マウスの脾細胞中の各免疫細胞サブセットにおける *Jazfl* 発現を qRT-PCR で評価した。その結果、Tr1 細胞の 1 つである LAG3⁺ Treg で *Jazfl* が特異的に高発現することが明らかとなった。次に、*Jazfl* 遺伝子プロモータ制御下に enhanced green fluorescent protein (eGFP) を発現する *Jazfl*eGFP マウスの CD4⁺ T 細胞における遺伝子発現プロファイルを確認したところ、LAG3⁺ Treg で特徴的に発現する *Egr2* 及び *Lag3* については CD4⁺*Jazfl*eGFP⁺ T 細胞において有意に高発現していた。すなわち、*Jazfl* は LAG3⁺ Treg で特異的に発現すること、また CD4⁺*Jazfl*eGFP⁺ T 細胞は LAG3⁺ Treg に特徴的な遺伝子発現を呈することを示した。

続いて *Jazfl*eGFP マウスの脾細胞から CD4⁺ T 細胞を分離し、*Jazfl*eGFP 陽性細胞と陰性細胞を分取した。興味深いことに *Il10* 発現は CD4⁺LAG3⁺*Jazfl*eGFP⁻ 細胞で最も高く、CD4⁺LAG3⁺ T 細胞における *Jazfl* 発現は著しく *Il10* 発現を低下させた。以上から *Jazfl* は IL-10 産生性 CD4⁺ T 細胞における IL-10 を抑制的に制御することが示唆された。

IL-27 添加による *in vitro* Tr1 細胞誘導条件における検討では、*Il10*、*Egr2* 発現が誘導されたが、*Jazfl* 発現は逆に抑制された。続いて pMIG-*Jazfl* ベクターを構築し、レトロウイルスを用いて CD4⁺ T 細胞に導入した。Tr1 細胞誘導条件下では *Jazfl* 過剰発現により *Egr2* 発現に変化は認めないものの、*Il10* 発現が強く抑制された。以上から、*Jazfl* は IL-10 を高産生する Tr1 細胞において IL-10 産生を抑制的に制御することが示された。

Jazfl KO マウスにおける CD4⁺ T 細胞の Tr1 細胞誘導条件では、興味深いことに *Jazfl* 欠損は *Egr2* 発現に影響を与えないものの、*Jazfl* KO Tr1 細胞において *Prdm1* 及び *Il10* mRNA 発現が著明に亢進し培養上清中の IL-10 タンパクも有意に増加した。

次に LAG3⁺ Treg を用いて抗 *Jazfl* 抗体による chromatin immunoprecipitation (ChIP) アッセイを行なったところ、*Jazfl* は *Prdm1* のプロモータ領域に結合し、*Il10* の既知の conserved non-coding sequence (CNS)、hypersensitivity site (HSS) と合致した領域に複数結合することを示した。

転写因子 *Blimp1* をコードしている *Prdm1* は、Tr1 細胞において IL-10 産生を制御することが知られている。すなわち、*Jazf1* は *Il10* に直接的、また *Prdm1* 発現を介して *Il10* 発現を制御することが示唆された。

最後に、SLE のモデルマウスであるイミキモド誘発ループモデルマウスによる検討を行った。その結果、イミキモド塗布開始 8 週間経過後、マウス体重あたりの脾臓重量はイミキモドを塗布した *Jazf1* KO マウスでより増加する傾向にあった。SLE における代表的自己抗体である血清抗 dsDNA 抗体価は、イミキモドを塗布し 8 週経過した *Jazf1* KO マウスの方が WT と比べて上昇する傾向を認めた。腎障害の指標となる尿タンパクは有意差を認めないもののイミキモド処理 *Jazf1* KO マウスにおいて最も高度であった。以上の結果より *Jazf1* は SLE 様病態の制御機構において重要な役割を果たしていると考えられた。

本研究では、SLE の疾患感受性遺伝子である *JAZF1* 遺伝子が、マウス Tr1 細胞である LAG3⁺ Treg において特異的に高発現すること、そして同細胞及び *in vitro* で誘導した Tr1 細胞どちらにおいても IL-10 産生を負に制御することを明らかにした。LAG3⁺ Treg を用いた Chip 解析において *Jazf1* は *Prdm1* のプロモータ領域に結合すること、また *Il10* においてはプロモータ領域のみならずエンハンサー及びイントロン領域にも結合することから、*Jazf1* は *Il10* を直接かつ *Prdm1* 発現を介して二次的に制御することが示唆された。さらに、*Jazf1* KO マウスでは SLE の病勢が悪化することから、*Jazf1* が CD4⁺ T 細胞における IL-10 産生制御機構を介して SLE の病態を制御していることが示唆された。

SLE の病態形成において、IL-10 は病勢を悪化させる可能性が示唆されている。実際 SLE 患者の病勢と血清中の IL-10 が相関しているとする報告も存在する。IL-10 は B 細胞の抗体産生・免疫グロブリンのクラススイッチや形質細胞への分化を誘導し抗体産生を促進することで SLE 病態を悪化させると考えられている。LAG3⁺ Treg は IL-10 および TGF-β3 を大量に産生するが、IL-10 もしくは TGF-β3 単独では B 細胞の抗体産生は亢進され、IL-10 と TGF-β3 が共存することではじめて抗体産生が抑制される。本研究では、*Jazf1* 欠損によって TGF-β3 との ICS 効果が期待できる範囲を超えた過剰な IL-10 が産生され、結果として B 細胞の抗体産生を促進しイミキモド誘発ループモデルの悪化に関与した可能性が想定された。

本研究では *Jazf1* が、Tr1 の *Il10* 発現を抑制する働きを持ち、さらに *Jazf1* 欠損が SLE 病態悪化に寄与する可能性を示した。*JAZF1* がヒト SLE の疾患感受性遺伝子であること、また CD4⁺ T 細胞における *JAZF1* 発現低下が SLE のリスクになるとする報告が存在することから

も、CD4⁺T細胞における *Jazf1* 遺伝子に関する更なる検討が SLE 病態の解明、新規治療ターゲットの発見につながると考えられた。