

論文の内容の要旨

論文題目 ヒト末梢血中の CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞の機能解析と

関節リウマチ患者における検討

仲地 真一郎

免疫寛容を司る制御性 T 細胞 (regulatory T cells、以下 Treg) は、自己免疫疾患の発症・治癒に深く関与しており、その機能解析や疾患における動態、分化誘導機構の解明は自己免疫疾患の病態解明に重要である。Treg にはさまざまな亜分類が報告されているが、CD25⁺ Treg と、タイプ 1 制御性 T 細胞 (Type 1 regulatory T cells、以下 Tr1 細胞) が特に重要である。CD25⁺ Treg は、転写因子である Forkhead Box P3 (FOXP3) をマスター遺伝子とし、Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4) を介して抗原提示細胞の T 細胞への結合を阻害し免疫応答を抑制する。一方、Groux らが発見した Tr1 細胞は、Foxp3 を発現せず、高 IL-10 下で誘導され、IL-10 を高産生して T 細胞の増殖を抑制する。

CD25⁺ Treg については多くの報告が蓄積されてきているが、IL-10 産生制御性 T 細胞についてはこれを特徴づけるマーカーが同定されておらず、知見が限られていた。しかし、2013 年に Gagliani らが Lymphocyte activation gene 3 (LAG3) と CD49b が Tr1 細胞のマーカーであると報告し、岡村らはマウスにおいて CD4⁺CD25⁻LAG3⁺ 制御性 T 細胞 (以下 LAG3⁺ Treg) が IL-10 を高産生し、アナジー関連遺伝子である Egr2 で制御され、B 細胞の抗体産生を抑制することを報告

した。また、LAG3⁺ Treg は B 細胞による抗体産生を抑制することで全身性エリテマトーデスマウスモデルマウスの腎炎を改善させ、またその抗体産生抑制能には Fas と Egr2 の双方が必要であることが報告された。今回私は、LAG3⁺ Treg のヒト末梢血での存在とその機能、また関節リウマチでの LAG3⁺ Treg の頻度と治療による影響を検討した。

まず私は、ヒト末梢血より単核球を分離し、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性というマウス同様の表面マーカーをもつ LAG3⁺ Treg の集団の存在を確認した。また、培養上清の ELISA により、ヒト LAG3⁺ Treg は IL-10 と IFN- γ を高産生しており、マウス LAG3⁺ Treg 同様の結果を得た。B 細胞・Tfh 細胞の共培養実験では、ヒト LAG3⁺ Treg は有意に IgG 産生を抑制していた。また、ヒト LAG3⁺ Treg は IgM と IgA の産生も抑制していたことから、ヒト LAG3⁺ Treg は、クラススイッチに関わる過程ではなく免疫グロブリン産生自体を抑制していることが示唆された。また、Gagliani らの報告では、IL-10 産生 Tr1 細胞の同定には LAG3 だけでなく CD49b 陽性が必要であるとされていたが、私の検討では CD4⁺CD25⁻LAG3⁺CD49b⁻ T 細胞も抗体産生抑制能を示したことから、CD49b の発現が抗体産生抑制には関わらないことが示された。

次に、LAG3⁺ Treg の抗体産生抑制能は細胞間接触を要するかどうかを調べるために、細胞集団を分離して培養できる Transwell を用いて B 細胞・Tfh 細胞との共培養実験を行った。その結果、LAG3⁺ Treg の細胞間接触が断たれると抗体産生抑制能が解除された。マウス LAG3⁺ Treg は Fas 関連アポトーシスが抗体産生抑制能に関わるという報告を踏まえて、私はブロッキング抗体を用いた共培養実験を行った。その結果、LAG3⁺ Treg は抗 IL-10 抗体を加えてもその抗体産生

抑制能が解除されなかったが、抗 Fas リガンド抗体を加えると抗体産生抑制能が解除された。これにより、LAG3⁺ Treg の抗体産生抑制能における細胞間接触の必要性が示された。

一般的に、ワクチンを接種すると、次の抗原侵入時に即時に対応できるように抗原に対する免疫応答が惹起される。私はインフルエンザワクチンを接種した健常人 4 名の末梢血を解析したところ、day7 には LAG3⁺ Treg は減少し、day14 には接種直前と同程度へ戻っていた。これにより、LAG3⁺ Treg は能動免疫時の免疫応答に影響していることが示唆された。

さらに本研究では、101 名の健常人ボランティアと 85 名の関節リウマチ患者の末梢血中の LAG3⁺ Treg を解析した。その結果、LAG3⁺ Treg の CD4⁺ T 細胞中における頻度は、健常人に比して関節リウマチ患者で有意に少なかった。Clinical Disease Activity Index (CDAI) を疾患活動性の指標として用いて検討したところ、疾患活動性の高い群では低い群よりも LAG3⁺ Treg が有意に少なかった。これらの結果より、関節リウマチでは LAG3⁺ Treg が病態形成に関わっている可能性が示唆された。また、治療による影響を調べるために、関節リウマチ患者 18 名を対象にアバタセプト投与前後で末梢血を解析したところ、LAG3⁺ Treg はアバタセプト治療 6 か月後では治療前と比べて有意に増加した。対照的に、CD25⁺ Treg はアバタセプト治療 6 か月後には治療前と比べて有意に減少しており、この結果は他の報告と同様であった。さらに、アバタセプト投与前患者において DAS28-CRP の変化を指標として治療反応性をみたところ、治療反応良好群では LAG3⁺ Treg の増加の程度が有意に大きかった。

前述の結果を踏まえて、私はアバタセプトによって LAG3⁺ Treg の分化が促進されるという仮

説を立て、*in vitro* で実験を行った。Naive CD4⁺ T 細胞を健康人末梢血から分取し、アバタセプトを加えて4日後に再度フローサイトメトリーを用いて解析を行った。すると、アバタセプトを加えて培養した群ではコントロール群に比して有意に CD4⁺CD25⁺LAG3⁺ T 細胞が増加していた。また、アバタセプト投与群ではこの培養細胞の EGR2 の mRNA が有意に上昇していた。このようにして得られた培養細胞を B 細胞・Tfh 細胞と共培養したところ、コントロール群と比べて有意に抗体産生を抑制していた。

今回の研究をまとめると、ヒト末梢血中の LAG3⁺ Treg は抗体産生抑制能を有し、関節リウマチ患者では LAG3⁺ Treg が減少し、特に高疾患活動性の関節リウマチ患者では減少していた。また、アバタセプトによる加療によって関節リウマチ患者の LAG3⁺ Treg が増加しており、アバタセプト自体による Naive CD4⁺ T 細胞から LAG3⁺ Treg 様の機能をもつ細胞の誘導が確認された。これらの知見を通して、関節リウマチに対してアバタセプトでの治療を行う根拠となり、さらに自己免疫疾患の治療法の開発へとつながることが期待される。