

論文の内容の要旨

論文題目 T細胞における Egr2/Egr3 依存性 TGF- β 3 産生機構を介した
液性免疫制御に関する検討

氏名 森田 薫

自己免疫疾患は多数の疾患の総称であるが、その多くは自己抗体を産生するという特徴を持つ。健常人では免疫学的寛容システムが機能するため、自己抗原に対して免疫応答は起こさないが、T細胞およびB細胞の異常はこのシステムの破綻を導き、自己抗体産生を引き起こす。病原性を有する自己抗体の多くは、胚中心において体細胞高頻度突然変異とクラススイッチ組換えにより誘導された高親和性抗体である。実際、抗 dsDNA 抗体をはじめとした自己抗体産生を特徴とし、多臓器に炎症を認める全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) では、マウス、ヒトの研究において、過剰な胚中心応答がその病態形成において重要な役割を果たしていることも報告されており (*Nat. Rev. Immunol.* 2009; 9: 845)、これら胚中心応答に関与する濾胞 T (follicular helper T: Tfh) 細胞および胚中心 B (germinal center B: GCB) 細胞の制御機構の解明は、自己抗体産生機序を介する各種自己免疫疾患の新規治療法開発に直結すると考えられている。

免疫応答を負に制御する細胞サブセットとして、制御性 T 細胞 (regulatory T cells: Treg 細胞) が広く知られているが、Treg 細胞には分化誘導の側面から、胸腺で誘導される内因性 Treg 細胞 (naturally occurring regulatory T cells: nTreg 細胞) および、末梢で誘導される Treg 細胞 (inducible regulatory T cells: iTreg 細胞) に大別される。SLE を含めた自己抗体産生を特徴とする自己免疫疾患において胚中心形成異常は病態機序に深く関与していると考えられ、近年研究が活発に行われている。胚中心は T 細胞依存性に形成され、胚中心を抑制する細胞としては nTreg 細胞由来の CXCR5⁺CD25⁺ Treg 細胞 (follicular regulatory T cells: Tfr 細胞) などが近年報告されている。しかしながら、これらの Treg 細胞サブセットの異常だけでは SLE をはじめとした自己免疫疾患の自己抗体産生機序を説明することはできず、その他の Treg 細胞サブセットの関与の可

能性も考えられている。その候補として iTreg 細胞が挙げられるが、iTreg 細胞に関しては胚中心形成を抑制するという報告がなく、液性免疫制御機構におけるその役割は不明であった。iTreg 細胞の一サブセットとして、当研究室の岡村らは 2009 年に lymphocyte activation gene-3 (LAG3) を表面マーカーとして有し、抑制性サイトカイン IL-10 を高産生する CD4⁺CD25⁺LAG3⁺ 制御性細胞 (LAG3⁺ Treg 細胞) を同定し、転写因子 early growth response gene-2 (Egr2) が特異的に高発現していることを報告している (*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009; 106: 13974)。Egr2 は T 細胞の不応答性 (anergy) 誘導に関与するが、近年、EGR2 は SLE の疾患感受性遺伝子であること (*Hum. Mol. Genet.* 2010; 19: 2313)、T 細胞および B 細胞特異的 Egr2 コンディショナルノックアウトマウスが SLE 様病態を呈することが報告された (*J. Exp. Med.* 2008; 205: 2295)。これらのことから、Egr2 を特異的に発現する LAG3⁺ Treg 細胞が、Egr2 の機能を介して自己抗体産生を制御する可能性が示唆された。そこで、本研究でははじめに、LAG3⁺ Treg 細胞による抗体産生制御機能の有無に関して検討を行った。その結果、LAG3⁺ Treg 細胞は *in vitro* において B 細胞の増殖ならびに抗体産生を抑制し、GCB 細胞に特徴的な遺伝子発現も抑制した。このことより LAG3⁺ Treg 細胞は液性免疫を制御することが明らかとなった。

次に、LAG3⁺ Treg細胞による液性免疫制御機構におけるEgr2の役割につき検討を行った。Egr familyにはEgr1からEgr4までが存在するが、Egr3はEgr2と同様にT細胞のアナジー誘導に関与することが報告されており (*Nat. Immunol.* 2005; 6: 472–480)、さらにEgr3はEgr2の機能を補完することも報告されている (*Immunity.* 2012; 37: 685)。よって、LAG3⁺ Treg細胞におけるEgr2の機能解析にはEgr2およびEgr3の両遺伝子欠損マウスを用いた解析が必要となる。実際、T細胞特異的Egr2コンディショナルノックアウト (Egr2^{fl/fl} CD4-Cre⁺; Egr2 CKO) マウスのLAG3⁺ Treg細胞を用いた検討にて、Egr3の代償的な遺伝子発現上昇を認め、Egr3による補完的機能が示唆された。そこで、本研究では、T細胞特異的Egr2コンディショナルノックアウト (Egr2 CKO) マウスおよびT細胞特異的Egr2、Egr3 ダブルコンディショナル (Egr2^{fl/fl} Egr3^{fl/fl} CD4-Cre⁺; Egr2/3 DKO) マウスを作製し解析を行った。その結果、Egr2/3 DKOマウスはEgr2 CKOマウスと比較して早期よりSLEに特徴的な病態を呈し、さらにSLEの典型的な罹患臓器以外の広範囲な臓器への炎症細胞浸潤も認めた。このことより、T細胞上のEgr2発現、並びにEgr3によるEgr2の機能補完作用はSLEを含めた多様な自己免疫疾患の発症制御において重要であると考えられた。

T 細胞における Egr2、Egr3 欠損が及ぼす影響に関して二次リンパ組織内の T 細胞、B 細胞に関して解析を行った。その結果、Egr2 CKO マウスおよび Egr2/3 DKO マウスでは野生型 (wild type: WT) マウスと比較して、Tfh 細胞および GCB 細胞の過形成を認め、その傾向は Egr2/3 DKO マウスにおいて著しかった。これらのことより T 細胞における Egr2、Egr3 発現は胚中心形成制御において重要な役割を果たしていることが示唆された。次に、Egr2/3 DKO マウスの胚中心形成異常が LAG3⁺ Treg 細胞の機能異常に起因するか否かにつき、WT マウスの LAG3⁺ Treg 細胞を Egr2/3 DKO マウスに養子移入した結果、Tfh 細胞、GCB 細胞の過形成が有意に抑制された。これらの結果より、Egr2/3 DKO マウスでは LAG3⁺ Treg 細胞の機能異常が過剰な胚中心応答を導くと考えられた。

次に、LAG3⁺ Treg 細胞の抑制性因子につきマイクロアレイ解析を用いて遺伝子の網羅的解析を行った。その結果、*Tgfb3* (transform growth factor-beta 3) 遺伝子を特異的に高発現することが判明し、ELISA を用いた検討においても LAG3⁺ Treg 細胞が TGF-β3 をタンパクレベルにおいても大量に産生することが明らかとなった。TGF-β1 による液性免疫制御機能は知られていたが、TGF-β3 の機能に関しては不明であった。TGF-β3 による液性免疫制御に関して解析を行ったところ、TGF-β3 は *in vitro* において TGF-β1 と同様に GCB 細胞の分化を抑制し、また Tfh 細胞の機能を抑制することが明らかとなった。

さらに、LAG3⁺ Treg 細胞における Egr2、Egr3 の機能および TGF-β3 との関係について解析を行った。その結果、LAG3⁺ Treg 細胞は Egr2、Egr3 依存性に TGF-β3 を産生し、pCAGGS-Tgfb3 プラスミドベクターを用いて TGF-β3 を Egr2/3 DKO マウスに導入した結果、Egr2/3 DKO マウスの GCB の過形成の抑制を認めた。このことより Egr2/3 DKO マウスにおける過剰な胚中心応答は Egr2、Egr3 を欠損した LAG3⁺ Treg 細胞の TGF-β3 産生障害が要因の一つであると考えられた。

最後に Egr2、Egr3 による TGF-β3 産生機序に関して解析を行った。LAG3⁺ Treg 細胞は Egr2、Egr3 を欠損しても *Tgfb3* mRNA の低下を認めず、Egr2、Egr3 は TGF-β3 の転写に直接関与せず、異なる機序で TGF-β3 の産生を制御していると考えられた。TGF-β3 は細胞内で複数のプロセッシングを受けて細胞外に産生されるが、その中で mature TGF-β3 および latency associated

peptide (LAP) で構成された small latent complex は latent TGF- β binding protein (LTBP) と結合して細胞外へ分泌されることが知られている(*Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2004; 41: 233)。LTBP family には LTBP-1 から LTBP-4 までの 4 種類が存在するが、LAG3⁺ Treg 細胞では *Ltbp3* mRNA の発現上昇を認める一方、Egr2、Egr3 欠損によりその発現は低下した。さらに *Ltbp3* siRNA によって、LAG3⁺ Treg 細胞の LTBP-3 発現をノックダウンしたところ、TGF- β 3 分泌は顕著に低下した。これらの結果より、TGF- β 3 の細胞外への分泌は LTBP-3 が必須であり、Egr2 と Egr3 は LTBP-3 発現を誘導することで LAG3⁺ Treg 細胞における TGF- β 3 分泌を制御していると考えられた。

本研究では T 細胞における Egr2、Egr3 および自己免疫疾患の自己抗体産生との関係に関して、LAG3⁺ Treg 細胞の機能を中心に解析を行った。その結果、T 細胞特異的に Egr2、Egr3 を欠損した Egr2/3 DKO マウスでは SLE 様症状をはじめとする全身性自己免疫疾患が発症した。また、Egr2/3 DKO マウスでは GCB 細胞、Tfh 細胞の過形成といった胚中心形成の異常を認め、原因として Egr2 および Egr3 欠損による LAG3⁺ Treg 細胞の機能異常が考えられた。Egr2、Egr3 の LAG3⁺ Treg 細胞における機能を解析したところ、Egr2、Egr3 は LTBP-3 の発現誘導を介して TGF- β 3 分泌を促進し、さらに LAG3⁺ Treg 細胞は TGF- β 3 を介して GCB 細胞、Tfh 細胞の分化を抑制することが明らかとなった。TGF- β 3 は皮膚の創傷治癒や口蓋形成に関する研究において注目されているサイトカインであるが、免疫学における TGF- β 3 の役割、特に抑制サイトカインとしての機能に関する検討はほとんどされていない。本研究結果は初めて液性免疫制御機能を有する iTreg 細胞を同定し、さらに TGF- β 3 の免疫応答に対する抑制機能、および Egr2、Egr3 依存性の LTBP3 を介した TGF- β 3 分泌制御機構を明らかにした点で大変意義深い。これらの知見は LAG3⁺ Treg 細胞および TGF- β 3 が自己免疫疾患に対する重要な治療ターゲットとなり得ることを示唆しており、SLE を含む自己抗体産生機序を介する自己免疫疾患の新規治療薬開発の重要な礎となると考えられた。