

論文の内容の要旨

論文題目 抑制性サイトカインによる細胞代謝の修飾を介した免疫応答制御機構

氏名 駒井 俊彦

免疫賦活性サイトカインと抑制性サイトカインのバランスは免疫応答を正負に制御し、そのバランスの破綻は自己免疫疾患の病態形成に関わる。免疫賦活性サイトカインを阻害する薬剤は関節リウマチをはじめとする多くの自己免疫疾患に優れた治療効果を示す一方で、免疫寛容の破綻と自己抗体産生を特徴とする全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus; SLE)における効果は限定的である。近年、自己免疫疾患の治療法の新たなアプローチとして、免疫学的恒常性維持に関わる制御性 T 細胞 (regulatory T cells; Treg)による免疫抑制機序に注目が集まっている。代表的な抑制性サイトカインの transforming growth factor (TGF)- β や interleukin (IL)-10 は Treg の免疫抑制機序の一端を担う。当研究室では IL-10 を高産生して免疫抑制能を発揮する CD4⁺CD25⁺LAG3⁺ Treg (LAG3⁺ Treg)を同定し、LAG3⁺ Treg は TGF- β 3 の高産生を介してループスモデル MRL-Fas^{lpr/lpr} (MRL/lpr) マウスの病態を改善することを見出した。LAG3⁺ Treg が定常状態で発現する転写因子 early growth response gene 2 (Egr2)は SLE の疾患感受性遺伝子であり、リンパ球特異的 Egr2 欠損マウスはループス様病態を呈すること、および LAG3⁺ Treg からの TGF- β 3 産生は Egr2 依存性であることから、SLE の病態形成において TGF- β 3 が重要な役割を果たしていることが示唆されている。

IL-10 および TGF- β は、context-dependent な二面的な免疫制御能を有する。IL-10 は Il10 欠損マウスが自己免疫性腸炎を呈し、IL-10 が直接的に増殖やサイトカイン産生を制御することで活性化 T 細胞に抑制作用を持つことから、抑制性サイトカインとして知られてきた。一方で、IL-10 は B 細胞に対して免疫賦活作用も有し、SLE の病態では病原性を持つ可能性が指摘されている。TGF- β は哺乳類では構造的相同性の高い TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3 の 3 つのアイソフォームがある。TGF- β 1 は Tgfb1 欠損マウスが全身性自己免疫疾患を呈し、TGF- β 1 が直接的に T helper (Th)1 細胞や Th2 細胞分化を抑制、Treg の誘導などの作用を有することから、抑制性サイトカインとして知られている。一方で TGF- β 1 は、IL-6 存在下で

Th17 細胞の誘導、IL-21 存在下で IgA 産生形質芽細胞の誘導、低濃度でヒツジ赤血球刺激 B 細胞の増殖亢進、lipopolysaccharide (LPS) 刺激 B 細胞のクラススイッチ促進などの免疫賦活作用を有するため、濃度、併存サイトカイン、刺激の種類、背景病態に応じた二面的な免疫学的役割を有すると考えられている。TGF- β 2、TGF- β 3 は免疫担当細胞からの産生および免疫学的役割は長らく明らかではなかった。近年、TGF- β 3 は IL-6、IL-23 の共存下で病原性の高い Th17 細胞を誘導する可能性が示唆され、一方、当研究室からは LAG3⁺ Treg が TGF- β 3 の高産生を介して液性免疫制御能を持つことならびに TGF- β 3 は抗 IgM 刺激 B 細胞の活性を制御する免疫抑制能があることを報告している。本研究では代表的抑制性サイトカインである TGF- β の免疫制御における役割を、IL-10 との協調的作用という観点からアプローチし、SLE の新規治療法を探索することを目的に以下の検討を行った。

抗原特異的な免疫応答において、胚中心における B 細胞と濾胞性 T (follicular helper T: T_{FH}) 細胞との相互作用が重要である。T 細胞が関与する液性免疫応答における TGF- β の役割を検討したところ、TGF- β 1、TGF- β 3 は共に *in vitro* における T_{FH} 細胞分化を抑制した。TGF- β 1 と TGF- β 3 は、*in vitro* においては類似した機能を有する一方で、*in vivo* では異なる免疫学的役割を有すると考えられているため、pCAGGS-Tgfb1、pCAGGS-Tgfb3 ベクターを用いて *in vivo* における TGF- β の役割を検討した。その結果、4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl (NP) をハプテンとして付加した Keyhole limpet hemocyanin (KLH) を抗原とし、水酸化アルミニウム (alum) をアジュバントとした免疫下で、pCAGGS-Tgfb3 ベクターは NP 特異抗体産生を抑制し、胚中心 B (germinal center B: GCB) 細胞の分化を抑制していたが、pCAGGS-Tgfb1 ベクターでは同様の作用は認められなかった。以上のことより、TGF- β 3 が主として B 細胞の抑制を介して T 細胞依存性の液性免疫応答を制御することが示唆された。さらに、MRL/lpr マウスにおける TGF- β 3 の影響を評価したところ、pCAGGS-Tgfb3 ベクターは T_{FH} 細胞ならびに形質芽細胞の分化を抑制し、脾腫、進行性蛋白尿の産生、自己抗体の抗 ds-DNA 抗体産生といったループス様病態へ治療効果を示した。一方で、pCAGGS-Tgfb1 ベクターではこのような免疫抑制効果は認められず、肝組織に小葉中心性壊死を生じた。従って、SLE の病態において TGF- β 3 は TGF- β 1 よりも優れた治療効果を持つことが示唆された。

SLE の病態形成には Toll 様受容体 (Toll-like receptor; TLR) を介したシグナルが重要な役割

を果たしていることが知られている。そこで、TLR4 アゴニストである LPS を用いて、B 細胞活性化に対する TGF- β 3 および IL-10 の影響を評価した。その結果、TGF- β 3、IL-10 はいずれも単独で抗体産生を促進したが、TGF- β 3 と IL-10 を共添加することで抗体産生は強力に抑制された。また、TGF- β 3 と IL-10 を共添加した条件では、B 細胞の増殖や分化に関与する *Myc*、*Xbp1* の遺伝子発現、形質細胞の分化を抑制した。*In vivo* においても T 細胞非依存性抗原で TLR4 刺激である NP-LPS 免疫による NP 特異抗体の産生は pCAGGS-Tgfb3 および pCAGGS-Il10 ベクターの同時投与条件でのみ抑制された。さらに、TLR シグナルを惹起する完全フロイントアジュバント (CFA) をアジュバントとして用いた場合、NP-KLH 免疫による NP 特異抗体の抑制には、pCAGGS-Tgfb3 および pCAGGS-Il10 ベクターの同時投与が必要であった。SLE では疾患活動性に 관련된 血清 IL-10 値の上昇が報告されているが、MRL/*lpr* マウスにおいても血清 IL-10 値は上昇しており、MRL/*lpr* マウスに対して TGF- β 3 が単独での治療効果を示した背景に、血清中に高値で存在している IL-10 との協調的作用があった可能性が示唆された。以上より、TGF- β 3 は IL-10 と協調的に TLR シグナルによる B 細胞の活性化ならびに全身性免疫応答を制御すると考えられた。

TGF- β 3 と IL-10 の協調的作用機序を解明するため、RNA-sequencing により各サイトカインが LPS 刺激 B 細胞の遺伝子発現に与える影響を評価した。*In silico* のパスウェイ解析にて、TGF- β 3 と IL-10 の共添加により特徴的に抑制される遺伝子群は、増殖、細胞死、抗体産生などの機能に加え、細胞代謝に関わる遺伝子群であることが推測された。また、上流解析にて TGF- β 3 と IL-10 の共添加による mammalian target of rapamycin (mTOR) の抑制が推測された。ウェスタンブロット法による検討では、TGF- β 3、IL-10 は単独でも LPS 刺激 B 細胞で誘導される eukaryotic translation initiation factor 4E-binding proteins (4E-BP1) のリン酸化を抑制したが、p70 S6 キナーゼ (S6K) のリン酸化の抑制には共添加が必要であった。生理的な mTORC1 活性化因子であるロイシンは *Slc7a5* 遺伝子にコードされる L 型アミノ酸トランスポーターにより細胞内に取り込まれるが、TGF- β 3 と IL-10 の共添加は *Slc7a5* の発現を低下させた。さらに、TGF- β 3 と IL-10 による協調的免疫抑制作用は mTORC1 賦活作用のある MHY1485、およびロイシンの添加により解除された。以上より、TGF- β 3 と IL-10 は TLR4 刺激 B 細胞の mTORC1 シグナルを協調的に抑制し、免疫抑制作用を発揮すると考えられた。

次に、TGF- β 3 および IL-10 の細胞代謝への影響を評価した。qRT-PCR による評価では、ミトコンドリア電子伝達系に関わる酵素をコードする *Ndufs7*、*Cox5b*、*Atp5d* 遺伝子の発現はいずれも TGF- β 3 と IL-10 の共添加で協調的に低下していた。また、ミトコンドリアの総量を反映する Mitotracker Green 染色、膜電位依存性に染色される Mitotracker Deep Red 染色を用いたフローサイトメトリー解析では、LPS 刺激 B 細胞で拡大した両染色陽性細胞の割合は、TGF- β 3 と IL-10 の共添加により低下していた。細胞外フラックスアナライザーによる評価では、細胞外酸素消費量 (oxygen consumption rate; OCR)ならびに細胞外酸性化速度 (extracellular acidification rate; ECAR)のいずれも TGF- β 3 と IL-10 の共添加条件で著明な低下を示した。さらに、TLR9 アゴニストである CpG-ODN で刺激されたヒト B 細胞においても IL-10 の存在下でより効果的に、TGF- β 3 は OCR および ECAR を抑制していた。以上より、TGF- β 3 は IL-10 と協調的に B 細胞のエネルギー源である酸化的リン酸化ならびに解糖系代謝を抑制していると考えられた。

これらの結果から、TGF- β 3 の免疫学的役割の二面性ならびに SLE 病態における治療効果が明らかになり、また TGF- β 3 と IL-10 は協調的に mTORC1 シグナルならびに細胞代謝を抑制することで免疫抑制能を発揮することが明らかとなった。本研究の結果は TGF- β 3 と IL-10 が生理的に共存する意義を示唆し、TGF- β 3 を軸としたサイトカイン療法は、特に IL-10 との協調環境下にて最大限に効果を発揮し、SLE をはじめとする自己免疫疾患の新規治療法となる可能性があると考えられた。