

課題番号 : 29指1002

研究課題名 : カルシニューリン阻害系免疫抑制剤とTregの相乗効果を引き出す新規メソッドの開発

主任研究者名 : 関谷 高史

分担研究者名 :

キーワード : Treg, CNI, NR4A1, transfusion

研究成果 :

移植片対宿主病 (GvHD) において、CD4 陽性 T 細胞 (CD4⁺T 細胞) は中心的な位置付けにある。CD4⁺T 細胞サブセットは、相反する機能を持つ 2 種類の細胞に大別される。一方は免疫応答を活性化に導くヘルパー T 細胞 (Th) であり、もう一方は免疫応答を抑制する制御性 T 細胞 (Treg) である。GvHD の抑制には Cyclosporine A (CsA) や FK506 等のカルシニューリン阻害系 (CNI) の免疫抑制剤が用いられるが、それらの主な作用点の一つは Th 細胞の抑制である。一方、GvHD の抑制における Treg の重要性が近年急速に明らかとされてきている。骨髄移植時における Treg 細胞の共移入は、免疫寛容を誘導し、GvHD の強力な抑制を導く。また、免疫抑制剤の投与期間中にドナー細胞由来の Treg が分化することは、GvHD の抑制に寄与するのみならず、薬剤非依存的な免疫寛容への移行を促す。このように免疫抑制剤と Treg は、共に GvHD の抑制におけるキーファクターと言えるが、両者の相乗効果は得られていないのが現状である。免疫抑制剤は、むしろ Treg 分化を抑制してしまうことが明らかとなっている。そこで本研究では、免疫抑制剤による Treg 分化抑制のメカニズムを解明し、免疫抑制剤存在下でも Treg の正常な分化を導く新規メソッドの開発を目指した研究を進めてきている。

主任研究者は先行研究で、「Nr4a ファミリー転写因子」Treg 分化で必須の役割を担っていることを見出しているため、この分子に着目した研究を行った。Nr4a ファミリー転写因子は Nr4a1, Nr4a2, Nr4a3 から構成され、redundant に Treg 分化で必須の役割を担っている。しかし興味深いことに、Nr4a2 と a3 の発現は CsA により抑制された一方、Nr4a1 の発現は抑制を受けないことを見出した。そこで、前述の通り、ファミリー分子間では機能重複があり、Nr4a2 と a3 の二重欠損細胞、即ち Nr4a1 が存在するだけで Treg は正常に分化することと合わせて考えると、高濃度 CsA 存在下でも Treg 分化が維持される理由は、Nr4a1 の発現が維持されるからであると推測できる。申請者はこの仮説の検証実験を行い、wild-type の CD4⁺T 細胞は CsA 存在下でも Treg に分化できる一方、Nr4a1-KO 細胞は CsA 存在下で分化の著明な減弱を示すことを確認した。以上、Nr4a1 は CsA 存在下で Treg 分化が維持される上で必須の役割を担っていることを示す結果を得た。

さらに、マウス GvHD モデルにおいて、CNI の抑制効果に対する Nr4a1 の役割の検討実験を行った。その結果、野生型細胞を移入したマウスと比較し、Nr4a1 欠損細胞を移入したマウスでは CsA による免疫寛容誘導の持続が著明に減弱することが示された。さらに、その GvHD 個体から取得した細胞を解析した結果、野生型細胞と比較し、Nr4a1 欠損細胞は CsA 投与下における Treg 分化が著明に減弱していることが確認された。これらの実験結果は、Nr4a1 は CsA 投与下における Treg 分化に重要な役割を担っており、CsA 投与頻度を減らした後の持続的な免疫寛容の維持に必須の役割を担っていることを示している。

以上の実験結果から、Nr4a1 は CNI 存在下での Treg の分化誘導に必須であり、CNI による GvHD 抑制効果を担う重要な因子であることを見出した。継続して行っている実験では、Nr4a1 の人為的活性化が CNI 存在下での Treg 誘導を高め、ひいては GvHD の治療効果を高めることを検討している。また、Nr4a1 の発現低下を引き起こすヒト SNP が報告されているため、骨髄移植患者献体を手し、本 SNP と GvHD の発症頻度、重症度との相関解析に着手している。

Subject No. : 29-1002

Title : Establishment of a novel method that mediates synergistic effects between calcineurin inhibitors and Treg cells for a controlled immune suppression.

Researchers : Takashi Sekiya

Key word : Treg, CNI, NR4A1, transfusion

Abstract :

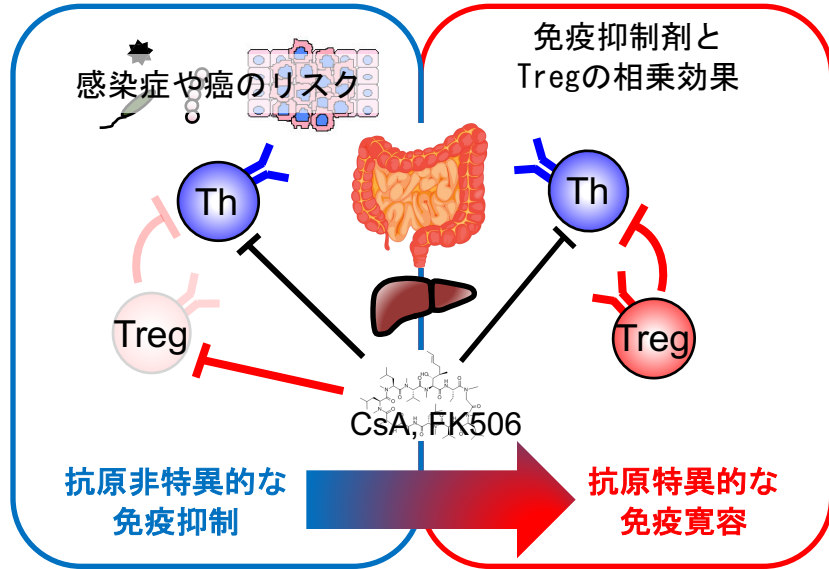
CD4⁺ T cells play crucial roles in organ transplantation and transfusion of hematopoietic stem cells. In particular, regulatory T cells (Treg) suppress an unwanted immunity against the grafts, thus being one of the determinants for successful engraftment of transplanted organs. Another crucial mediator in the transplantation and transfusion is the calcineurin inhibitors (CNI), including cyclosporin A (CsA) and FK506. However, the cooperation between the two crucial mediators for immune tolerance, Treg and CNI, has not been achieved yet. For example, it has been shown that CNI strongly suppresses differentiation and activities of Treg cells. The suppressive mechanisms of CNI against Treg cells have not been revealed in depth yet, and no effective method has been established that augments Treg differentiation and activities in the presence of CNI. Therefore, we launched a study which is aiming at elucidating a method which enables full Treg differentiation and activities even in the presence of CNI, thus increasing the success rate of allogenic transplantation and transfusions.

In this study, we focused on a transcription factor named "NR4A1", a key molecule in Treg differentiation, as a candidate mediator which establishes the cooperation between Treg and CNI, according to several reasons: First, it has been revealed that NR4A family transcription factors, composed of NR4A1, A2, and A3, redundantly mediate Treg differentiation. Second, our unpublished work has revealed that although the expression of NR4A2 and NR4A3 are repressed by CNI, that of NR4A1 is resistant to it. Thus, we first demonstrated the ability of wild-type and NR4A1-KO CD4⁺ T cells to differentiate into Treg cells, and found that NR4A1-KO CD4⁺ T cells are highly sensitive to CNI in terms of Treg differentiation. Next, we performed allogenic bone marrow transplantation using cells from wild-type and NR4A1-KO C57BL6/J mice, which were transfused into allogenic BALB/c mice. As a result, we found that graft-versus-host disease (GvHD) was suppressed in recipient BALB/c mice of wild-type cells by CsA, as expected, whereas the suppressive effects of CNI were not observed in recipients of NR4A1-KO cells.

In an ongoing study, we are analyzing a relationship between human SNPs at *NR4A1* locus, which have been reported to affect expression level of NR4A1, and incidence and severity of GvHD after hematopoietic cell transplantation.

本研究のミッション

免疫抑制剤はドナー細胞と宿主間の免疫反応を抑制するが、Tregによる「内在的な」免疫寛容効果も打ち消してしまう。

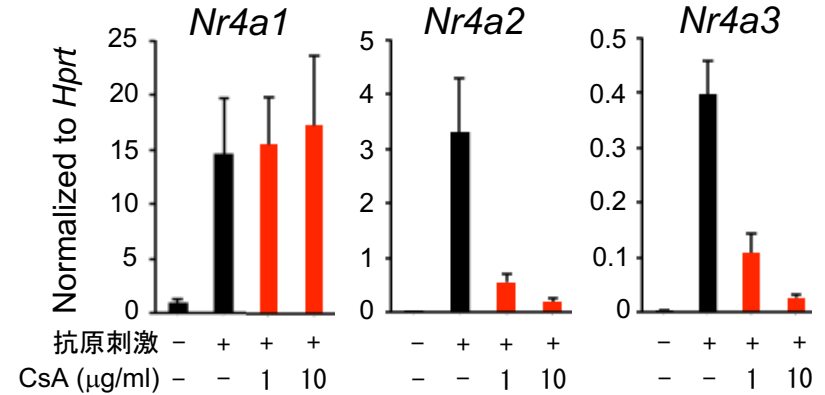


そこで本研究は

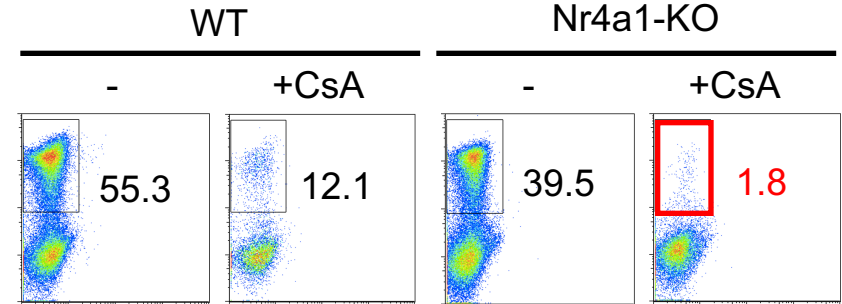
- ☑免疫抑制剤によるTreg分化抑制の分子メカニズムの解明
- ☑免疫抑制剤存在下でもTregを誘導する新規メソッドの開発
- ☑免疫抑制剤のTregに対する作用を規定する遺伝子多型の解析

を目指す

本研究のバックグラウンド



Treg分化で必須の役割を担う「Nr4aファミリー」転写因子の中で、「Nr4a1」の発現のみがCyclosporin Aに対し抵抗性を示す。

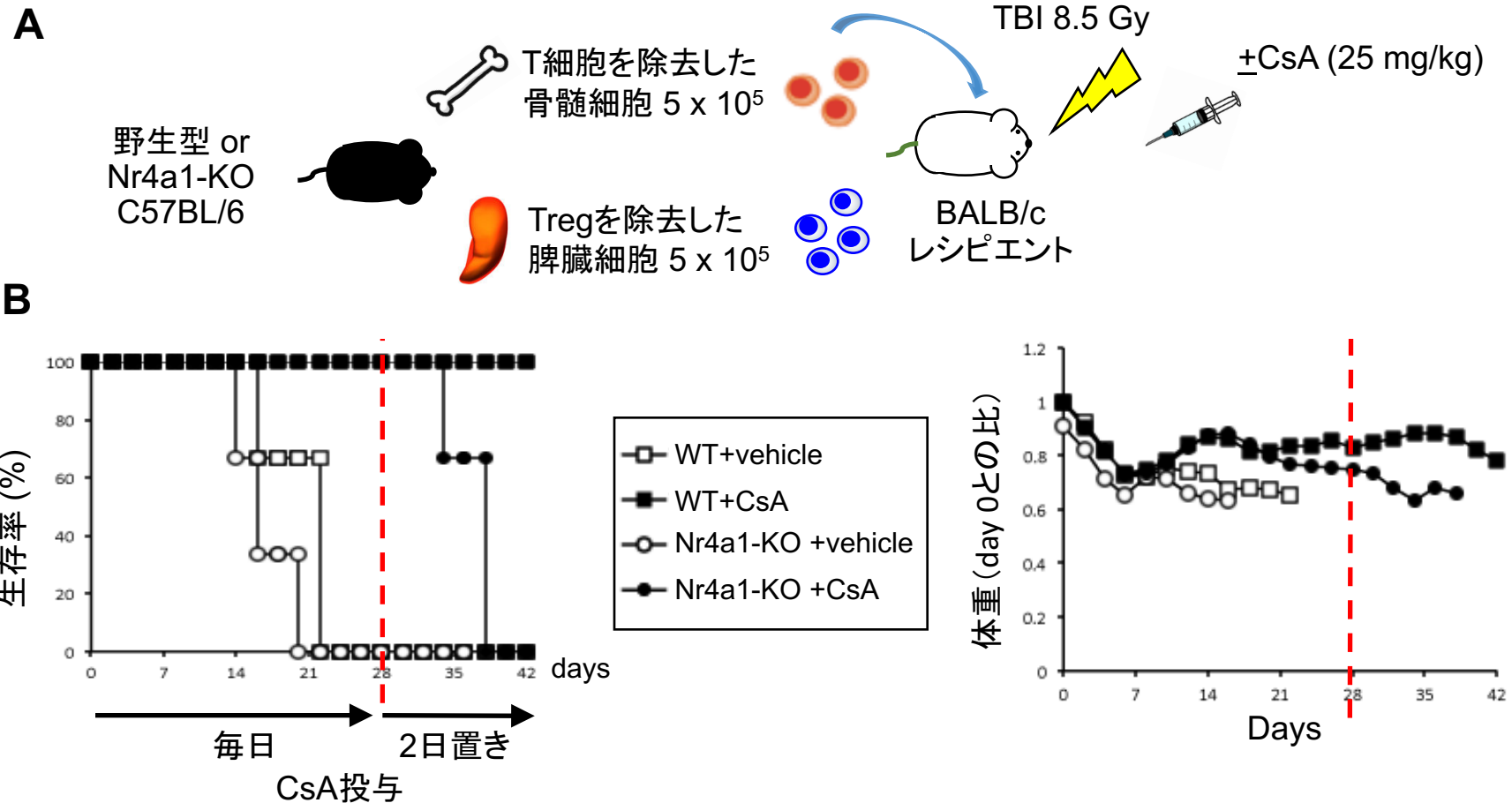


Nr4a1欠損細胞はCsA存在下でのTreg分化の著明な減弱を示す。

以上の予備的知見から、免疫抑制剤とTregの「両立」を可能にするキーファクターとしてNr4a1に着目し、その作用機序の解明、治療標的としての可能性を追求する。

初年度の研究成果

アロ骨髄移植GvHDのCsAによる抑制に対するNr4a1の役割を明らかとした。



(A) 本実験の模式図. 野生型もしくはNr4a1-KO C57BL/6マウスから取得した骨髄細胞および脾臓細胞を、放射線照射した異系統のBALB/cマウスに移入し、GvHDを発症させた。これらのマウスでCsAの抑制効果を検討した。(B) 各群における生存率と体重の解析結果. CsAは細胞移入後4週までは毎日投与し、以降は2日置きに投与を行った。示されるとおり、Nr4a1-KOマウスから取得した細胞を移入した群では、CsA投与頻度を減らした後のGvHDの増悪化が著明であった。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号：29指1002

研究課題名：カルシニューリン阻害系免疫抑制剤とTregの相乗効果を引き出す新規メソッドの開発

主任研究者名：関谷高史

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Nr4a receptors regulate development and death of labile Treg precursors to prevent generation of pathogenic self-reactive cells	Sekiva T, Hibino S, Saeki K, Kanamori M, Takaki S, Yoshimura A	Cell Reports	In press	2018
Notch-mediated conversion of activated T cells into stem cell memory-like T cells for adoptive immunotherapy	Kondo T, Morita R, Okuzono Y, Nakatsukasa H, Sekiva T, Chikuma S, Shichita T, Kanamori M, Kubo M, Koga K, Miyazaki T, Kassai Y, Yohimura A	Nature Communications	第8巻	2017

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
該当なし				

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当なし				

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。