

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

## I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業ソロタイプ「画期的医薬品等の創出をめざす脂質の生理活性と機能の解明」研究開発領域

(英語) Advanced Research and Development Program for Medical Innovation, “Studies on Specific Activities and Functions of Lipid Molecules to Develop Innovative Medical Technologies”

研究開発課題名： (日本語) 新規 T 細胞サブセットを規定するコレルテロール代謝酵素の機能解析と疾患制御への応用

(英語) Functional analysis on cholesterol metabolizing enzyme that defines a novel T cell subset and the clinical application for disease control

研究開発担当者 (日本語) 慶應義塾大学医学部 皮膚科学 専任講師 高橋 勇人

所属 役職 氏名： (英語) Hayato Takahashi, Assistant Professor,  
Keio University School of Medicine,

実施期間： 平成 28 年 10 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

### 【和文】

本研究は新しい CD4<sup>+</sup>T 細胞サブセットとその脂質に関連する新規機能を同定すること、そしてその T 細胞機能や同定した脂質を利用することにより、免疫制御を目標とした創薬につなげていくことを目指している。

抗原刺激を受けたナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞は特定のサイトカインの作用によって、Th1, Th2 といった幾つかのサブセットに分化し、各サブセットはそれぞれ特有の機能を有することによって、特定の疾患の病態形成に積極的に関与する。その分化過程において、あるサブセットの分化に重要なサイトカインやそのサブセットから分泌されるサイトカインは、別のサブセットの分化を抑制することが知られている。互いの分化を抑制しあうサイトカインの特徴こそが各サブセットが独立して存在しうる大きな理由となっている。そこで、既知の代表的なサブセットを抑制しうるサイトカインを用いてナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞を刺激し分化させ

ると、既知のサブセットへ分化することなく、新たな機能をもった未知の新規サブセット (ThX) へ分化できる可能性を考え、研究をすすめている。本研究では、IL-27 が Th17 と iTreg の分化を抑制することを確認し、Th1 と Th2 分化を抑制する TGF- $\beta$  と組み合わせて ThX の誘導を試みた。すなわち、野生型マウス (C57BL/6) から CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>hi</sup>CD44<sup>lo</sup>CD25<sup>-</sup>のナイーブ T 細胞を FACS にて単離し、抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体に加えて、IL-27 と TGF- $\beta$  で刺激し ThX を誘導した。同時に既知サブセットも誘導し、各サブセットの遺伝子発現解析を行った。その結果、ThX に特異的に発現する遺伝子が抽出され、その最上位にコレステロール代謝酵素 X を同定した。定量 PCR においても、酵素 X が IL-27 と TGF- $\beta$  の刺激で発現誘導されることが確認された。酵素 X はコレステロールから代謝産物 Y を生成させる。そこで、CD4<sup>+</sup>T 細胞を IL-27 と TGF- $\beta$  で刺激すると T 細胞から代謝産物 Y が分泌されることを確認するため、刺激後の培養上清をガスクロマトグラフィー質量分析計で測定したところ、代謝産物 Y が確かに T 細胞から分泌されることが分かった。分泌された代謝産物 Y が周囲のリンパ球に与える影響を検討するため、CD4<sup>+</sup>T 細胞を抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体で刺激し、そこに代謝産物 Y を添加して観察したところ、T 細胞が死滅することが分かった。以上のことから、CD4<sup>+</sup>T 細胞に新規機能分子として酵素 X が発現することを明らかにし、その代謝産物 Y が周囲リンパ球に細胞死を誘導することにより免疫制御に貢献している可能性が示唆された。

今後、酵素 X を発現する T 細胞の生体内での免疫学的な役割を解析し、酵素 X あるいは代謝産物 Y に関連した創薬につなげていきたい。

#### 【英文】

This project is aimed at identifying a new subset of CD4<sup>+</sup> T cells and new function related to lipid. Through utilizing lipids or new T cell function discovered by this project, development of new drugs to obtain immune regulation in inflammatory disorders is expected in the future.

Naïve CD4<sup>+</sup> T cells differentiate into several subsets such as Th1 and Th2 and so on upon antigen stimulation together with cytokines that differentially can define the fate. Then each differentiated subset exerts distinct function and appropriately contributes to disease pathogenesis. During that process, the cytokine, which is necessary for differentiation of the subset or produced from the differentiated subset, suppresses the efficient differentiation of other subsets. This relationship between key cytokines and subset differentiation is the one of the big reasons why each subset can be independent from each other. The idea employed in this project is to use cytokines that inhibit already identified subsets for stimulation of naïve CD4<sup>+</sup> T cells and expects that stimulated T cells potentially differentiate into unidentified subsets (ThX) with new function, avoiding from differentiation into known subsets instead.

We identified interleukin (IL)-27 to suppress Th17 and iTreg differentiation and utilized the combination of IL-27 and TGF- $\beta$ , which is known to inhibit Th1 and Th2 differentiation, for ThX induction. To do that, naïve CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>hi</sup>CD44<sup>lo</sup>CD25<sup>-</sup> T cells were isolate from C57BL/6 wild-type mice and stimulated with IL-27 and TGF- $\beta$  in addition to anti-CD3 antibody, anti-CD28 antibody to prepare ThX *in vitro*. At the same time, representative known subsets were prepared and gene expression profiles of all prepared subsets were genome-widely analyzed by RNA-seq. As the results, genes that are specifically expressed only in ThX were listed and cholesterol metabolizing enzyme X was identified as the most highly expressed gene. Quantitative PCR also confirmed that enzyme X is specifically expressed

only in ThX but not in other subsets. Since enzyme X is known to convert cholesterol into metabolite Y, it is expected that ThX might secrete metabolite Y. Gas-chromatography and mass-spectrometry measured metabolite Y in supernatant of ThX and confirmed that metabolite Y was secreted from ThX. To understand the function of metabolite Y, metabolite Y were supplied into *in vitro* culture system of CD4<sup>+</sup> T cells and T cells were analyzed by flow cytometry, demonstrating that metabolite Y induced cell death in CD4<sup>+</sup> T cells.

This year, we identified enzyme X as a novel functional molecule of CD4<sup>+</sup> T cells and results indicated that metabolite Y might contribute immune regulation via inducing cell death in T lymphocytes. We are going to further analyzed the function of enzyme X-expressing T cells *in vivo* and take advantage of our results to develop new drugs in the future.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）

なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 25-hydroxycholesterol secreted from CD4<sup>+</sup> T cells mediates novel immune regulation by interleukin-27. 口頭, Hayato Takahashi, Hisashi Nomura, Hisato Iriki, Yohei Mikami, Yuka Kanno, John O'Shea, Masayuki Amagai: The 45<sup>th</sup> annual meeting of the Japanese Society for Immunology. Okinawa, Japan, 2016.12.5-7, 国内.
2. Novel immune regulation by CD4<sup>+</sup> T cells via cholesterol 25-hydroxylase pathway. 口頭, Hayato Takahashi, Hisashi Nomura, Hisato Iriki, Akiko Kubo, Yohei Mikami, Yuka Kanno, John O'Shea, Masayuki Amagai: European Society for Dermatological Research Annual Meeting 2016. München, Germany, 2016.9.7-10, 国外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

なし

(4) 特許出願

なし