

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2011

課題番号：19059014

研究課題名（和文）制御性 T 細胞による自己認識と自己免疫の制御

研究課題名（英文）Self-recognition and regulation of autoimmunity by regulatory T cells

研究代表者

堀 昌平 (Hori Shohei)

独立行政法人理化学研究所・免疫恒常性研究ユニット・ユニットリーダー

研究者番号：50392113

研究分野：免疫学領域

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：自己免疫、免疫寛容、制御性 T 細胞、抗原特異性、細胞分化、クローン動物

### 1. 研究計画の概要

免疫系には免疫抑制機能を発現する制御性 T 細胞(regulatory T cells; Treg)とよばれる T 細胞サブセットが内在し、自己免疫寛容の獲得・維持に重要な役割を担っている。本研究では Treg を介した「自己」「非自己」の識別機構を解明することを目指す。これまでに、Treg は T 細胞レセプター(TCR)を介して自己抗原を強く認識することで分化し「自己」を能動的に規定すると提唱されているが、その胸腺内分化および末梢での抑制機能発現における自己認識の役割、そして Treg の規定する「自己」の分子の実体は未だ不明である。本研究がこれら未解決の問題を解明することを目指す。

この問題にアプローチするために、本研究では、まず正常マウスから単離した Treg の核を移植した nt (nuclear transfer) ES 細胞を樹立し、Treg 由来の TCR を単一に発現するマウスモデルの確立を試みる。そして、この独自のアプローチにより、Treg の抗原特異性を解析し、さらにその認識する内在性抗原を同定することを試みる。

### 2. 研究の進捗状況

(1) Treg 由来 ntES 細胞を用いたキメラマウスの作製と解析：C57BL/6 マウスから CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T 細胞を単離し、核移植によって ntES 細胞を 6 クローン樹立してキメラマウスを作製した。しかしながら、いずれもキメラ率の低い個体しか得られず、最終的に germ-line 伝達に成功したのは一つのクローン(1D2)の TCR $\beta$  遺伝子のみであった。

(2) Treg 由来 TCR をモノクローナルに発現するマウス系統の確立：Germ-line 伝達によって 1D2 $\alpha$  遺伝子を得ることができなかったが、得られた 1D2 $\beta$  を利用し、1D2 $\alpha$  を強制発現させることで 1D2 $\alpha\beta$  TCR を再構成する方針に変更した。このために 1D2 $\alpha$  トランスジェニックマウスおよびレトロジェニックマウスの作製を進めた。予備実験の結果、レトロジェニックマウスにおいては確かに 1D2ab TCR を発現した Treg が分化することがわかった。

(3) Treg TCR レパトワの解析：得られた 1D2 $\beta$  マウスを活用して TCR $\alpha$  鎖のレパトワ解析を進めた。まず、このマウスにおいて 1D2 $\alpha$  CDR3 配列が Treg に選択的に発現することを見出し、1D2 TCR が Treg 由来であることを確認した。また、研究の過程で Treg における Foxp3 発現と抑制機能は決して安定ではなく一部の細胞はヘルパー T 細胞へ分化転換する可塑性を有することを見出した。可塑性を示す Treg のレパトワと特異性を解析するために、1D2  $\beta$  マウスを活用して、T 細胞欠損環境下で Foxp3 発現を維持する Treg と失った "ex-Treg" を単離し、その TCR $\alpha$  レパトワを解析した。その結果、両者の重なりは少なく、可塑性を持った Treg はユニークな特異性を持ったサブセットであることがわかった。

### 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している

(理由) Treg 由来 ntES 細胞を用いて Treg 由来 TCR を単一に発現するマウスを作製するという当初の計画は、germ-line 伝達の技術的問題から、期待通りに達成することは困難であった。しかしながら、1D2 $\beta$  マウスという今

後の研究に重要なツールを確立することができた。また 1D2 $\alpha$ については他のアプローチにより問題の解決を試み、実際に 1D2  $\alpha\beta$  TCR を個体レベルで再構成することができた。また、研究の過程で Treg における Foxp3 発現と機能の不安定性という新たな現象を見出し、Treg の可塑性という新たな概念を提出することができた。

#### 4. 今後の研究の推進方策

(1) 1D2  $\alpha\beta$ TCR の再構成とその抗原特異性の解析: 1D2 $\beta$  マウスに 1D2 $\alpha$  を強制発現することにより 1D2  $\alpha\beta$ TCR を単一に発現するマウスモデルを確立し、Treg 分化と機能発現における TCR 特異性の役割を明らかにする。そして、この 1D2  $\alpha\beta$ TCR がどのような自己抗原を認識するのか、解明する。

(2) 分化の可塑性を示す Treg のレパトワと抗原特異性: 研究の過程で新たに見出した Treg 分化の可塑性に着目し、Treg の規定する「自己」の安定性と可塑性を明らかにする。このために、本研究でこれまでに得られた 1D2 $\beta$  マウスをフルに活用し、Foxp3 発現を安定に維持する Treg と発現を失った”ex-Treg”の間で TCR $\alpha$  レパトワを比較することで、どのようなレパトワと特異性を持った Treg が可塑性を示すのかを明らかにする。

#### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

1. Tsuji, M., Komatsu, N., Kawamoto, S., Kanagawa, O., Honjo, T., Hori, S., and \*Fagarasan, S. (\*corresponding/senior authors) Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3<sup>+</sup> T cells in gut Peyer's patches. *Science* 323: 1488-1492, 2009 (査読有)
2. Komatsu, N., Mariotti-Ferrandiz, M.E., Wang, Y., Malissen, B., Waldmann, H., and Hori, S. Heterogeneity of natural Foxp3<sup>+</sup> T cells: a committed regulatory T cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. *PNAS* 106: 1903-1908, 2009 (査読有)

有)

3. Hori, S. Rethinking the molecular definition of regulatory T cells. *European Journal of Immunology* 38: 928-930, 2008 (査読有)
4. Komatsu, N. and Hori, S. Full restoration of peripheral Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell pool by radioresistant host cells in *scurfy* bone marrow chimeras. *PNAS* 104: 8959-8964, 2007 (査読有)

[学会発表] (計 16 件)

1. Hori, S. Stability and plasticity in regulatory T cell differentiation. Keystone Symposia “Tolerance and Autoimmunity”, February 21-26, 2010, Taos, New Mexico, USA

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

<http://web.rcai.riken.jp/en/labo/home/index.htm>