

機関番号： 82401

研究種目： 若手研究(A)

研究期間： 2008～2010

課題番号： 20689012

研究課題名(和文)

制御性T細胞分化と機能の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Elucidating the molecular basis of regulatory T cell differentiation and function

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

研究成果の概要(和文)：

制御性T細胞の分化・機能制御メカニズムを明らかにすることを目的として二つの研究課題に取り組んだ。第一に、ヒト自己免疫疾患 IPEX において同定されている *Foxp3* 遺伝子変異を導入したノックインマウスを作製して変異の制御性T細胞分化・機能に与える影響を解析した。一つの変異マウスでは、自己免疫疾患の発症と相関して末梢組織に局在する制御性T細胞サブセットが選択的に欠損することを見出し、この制御性T細胞サブセットが自己免疫寛容の成立・維持に重要な役割を担っていると考えられた。第二に、正常個体に存在する *Foxp3*⁺T細胞は不均一な集団であり、一部は環境からの擾乱に対して *Foxp3* 発現を失ってヘルパーT細胞へ分化する可塑性を示すことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

We conducted two lines of research, which aim at elucidating the mechanisms of regulatory T cell (Treg) differentiation and function. First, we asked whether and how naturally occurring *Foxp3* gene mutations identified in human IPEX affect Treg differentiation and function by generating knock-in mice. We found that one of the mutations resulted in the development of autoimmune diseases similar to human IPEX, which was associated with a selective deficiency of a “tissue-seeking” subset of Treg cells. These results suggest that *Foxp3*⁺ Treg cells consist of functionally distinct subsets, each of which may play non-redundant roles in the establishment and maintenance of self-tolerance. Second, we found that *Foxp3*⁺ T cells are heterogeneous in that they contain a minor, functionally uncommitted, plastic subpopulation that loses *Foxp3* expression and converts to helper T cells in response to environmental perturbations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2009年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2010年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
年度			
年度			
総計	19,500,000	5,850,000	25,350,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：自己免疫疾患、免疫寛容、免疫制御、制御性 T 細胞、遺伝子発現制御、分化可塑性

1. 研究開始当初の背景

免疫系が「自己」・「非自己」を識別し、「自己」に対する寛容性を獲得・維持するメカニズムを解明することは免疫学における最も本質的な課題の一つであり、またその破綻が関係する様々な疾患（自己免疫疾患、アレルギー、炎症性疾患、がん、慢性感染症など）を克服する上でも重要である。近年、健康個体にも胸腺における負の選択を逃れ自己免疫病を惹起する能力を有した自己反応性 T 細胞が多数存在し、これらは制御性 T 細胞 (regulatory T cells, Treg) と呼ばれる T 細胞サブセットによって能動的に抑制されて自己寛容が成立していることが明らかにされてきた (Hori *et al.*, *Adv. Immunol.*, 2003; Sakaguchi *et al. Immunol. Rev.*, 2006)。我々は、ヒトおよびマウスに自然発症する致死的自己免疫疾患 IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome) の原因遺伝子として同定された転写因子 Foxp3 が Treg 特異的に発現する分子マーカーであり、その発生・分化、抑制機能を司るマスター転写因子として機能すること、そして Foxp3 変異マウス (*scurfy* マウス) に発症する自己免疫疾患が Treg 欠損に起因することを明確に示し、Treg が自己免疫寛容の成立・維持に中心的な役割を果たしていることを証明した (Hori *et al.*, *Science*, 2003; Komatsu and Hori, *PNAS*, 2007)。

Treg は様々な免疫疾患への関わりから近年世界的レベルで大きな注目を集め積極的に研究されているが、その抑制機能と発生・分化の分子基盤という本質的な問題が未解決である。Treg のマスター転写因子 Foxp3 の発見はこの問題にアプローチするための大きな手がかりを与え、Foxp3 発現がどのように制御され、Foxp3 がどのように Treg 分化・機能をプログラムしているのかを明らかにすることが次の大きな課題となっている。

2. 研究の目的

我々は Foxp3 が Treg 分化と機能を制御するメカニズムにアプローチするために、ヒト IPEX 患者において同定されている Foxp3 遺伝子変異 (特に DNA 結合領域である forkhead ドメインにおける 1 アミノ酸置換) に着目し、レトロウイルスを用いた強制発現系を用いてこれら変異が Treg の発生・分化と機能にど

のような影響を与えるかを解析してきた。その結果、調べた 7 種類全ての変異により Treg 機能の誘導活性が確かに障害され、ヒト IPEX も Treg の異常に起因することが示唆された。興味深いことに、IPEX 変異には Foxp3 の機能を完全に消失させる amorphic 変異 (R397W など) と部分的あるいは選択的に障害する hypomorphic 変異 (I363V, A384T など) とが存在し、さらに後者のうち A384T 変異体は大部分の Foxp3 標的遺伝子の発現を正常に制御できるにも関わらず、抑制機能を選択的に誘導できないことを見出した。このことは、A384T 変異を有する個体においては Treg の分子的特徴を備えた細胞は正常に発生・分化するものの、抑制機能に異常があるために IPEX を発症するという可能性が考えられた。従って、A384T 変異により発現が影響を受ける少数の Foxp3 標的遺伝子を解析することで、未だ明らかでない Treg の機能メカニズムに迫ることができると考えられる。本研究では、A384T および対照として I363V, R397W 変異を Foxp3 遺伝子座に導入したノックインマウスを作製してこの仮説を検証するとともに、A384T 変異により発現が影響を受ける遺伝子群を同定することにより、生体内における Treg の免疫抑制メカニズムを解明することを第一の目的とした。

一方、現在 Foxp3 は Treg の特異的かつ安定な系列特異的マーカーであると捉えられているが、我々はこの従来のドグマに反して正常マウス末梢に存在する Foxp3⁺ T 細胞における Foxp3 発現は決して安定ではないことを見出した。すなわち、Foxp3 レポーターノックインマウスから単離した Foxp3⁺ CD4 T 細胞を単独で T 細胞欠損マウスに移入するとその一部が Foxp3 発現を消失する。このことは、Treg とは不可逆的に機能分化した安定な細胞系列なのではなく Treg は置かれた環境によって Foxp3 発現をダイナミックに変化させることで機能を変化させるという分化可塑性を保持した細胞であるという可能性を示唆している。本研究では、T 細胞欠損環境下で Foxp3 発現を消失する T 細胞の性状と機能を解析するとともに、どのような外因性シグナルによって Foxp3 発現を消失するのか、また不安定な Foxp3 発現を示す細胞の起源、本態を明らかにすることを目的とした。さらに、Foxp3 遺伝子座に GFP-Cre 融合タンパクを導入したノックインマウスを作製し、これと Cre 活性のレポーターマウスである ROSA26^{RFP} ノックインマウスと交配させて Foxp3⁺ T 細胞の fate mapping 解析を行い、正常個体において一過的に Foxp3 を発現した過去を持つ T 細胞が存在するのか検討し、それら "exFoxp3⁺ T 細胞" の性状、機能、

起源を明らかにすることを目的とした。以上の解析により、Treg とは不可逆的に機能分化した安定な細胞系列であるのか、置かれた環境によって分化転換する可塑性な細胞であるのかを明らかにすることを試みた。従来、Treg とは安定な細胞系列であり、それ故に Treg を様々な免疫疾患の細胞治療として用いようという試みがなされてきた。仮に Treg が置かれた環境によって分化転換するならば、そのような分化可塑性は免疫疾患の治療という観点からは大きな障害である。従って、この問題を解決することは臨床医学的な観点からも重要である。

3. 研究の方法

(1) Foxp3 による Treg 機能制御メカニズム

上述のとおり、3 種類の変異 Foxp3 遺伝子変異 (I363V, A384T, R397W) を導入したノックインマウスを作製した。またこのとき変異体 Foxp3 発現細胞を同定・単離するために、human CD2 レポーターを同時にノックインした。樹立したノックインマウスにおける自己免疫疾患の発症を組織学的、免疫学的解析により評価した。また、変異の Treg 分化、機能に与える影響を炎症による二次的な影響を排除して直接的に評価するために、変異マウスを Foxp3:GFP レポーターマウスと交配させ、mutant:hCD2/WT:GFP ヘテロ接合体を解析した。Foxp3 は X 染色体上の遺伝子であるため、X 染色体不活化を受け、雌性マウスでは monoallelic に発現する。従って、ヘテロ接合体マウスでは変異型 Foxp3 を発現する hCD2⁺ T 細胞と野生型 Foxp3 を発現する GFP⁺ T 細胞が共存することになり、後者の存在によって自己免疫疾患が制御されるために、両者の振舞を健全状態で直接的に比較することができる。このヘテロ接合体から GFP⁺ WT Treg および hCD2⁺ mutant Treg を単離し、胸腺および末梢における両者の発生・分化を FACS 解析により検討し、その *in vitro* における抑制機能 (T 細胞増殖抑制活性)、サイトカイン産生能、遺伝子発現を検討した。

(2) Treg 分化の可塑性

上述のとおり、T 細胞欠損環境下において一部の Foxp3⁺ T 細胞が Foxp3 発現を失う。本研究では、まずこれら Foxp3 発現を失った“exFoxp3⁺ T 細胞”のサイトカイン産生、ヘルパー機能を解析し、どのような T 細胞へと分化しているのか検討した。また、Foxp3^{GFP-Cre}.ROSA26^{RFP} マウスを作製して、Foxp3⁺ T 細胞の fate mapping を行った。実際このマウスには一過的に Foxp3 を発現した歴史を持つ GFP⁺RFP⁺CD4⁺ T 細胞が存在したため、この細胞の免疫学的性状解析を行った。さらに、GFP⁺RFP⁺ exFoxp3⁺ CDD4⁺ T 細胞の起源を解析するために、Foxp3^{GFP-Cre}.ROSA26^{RFP} マウスを TCRβ トラン

スジェニック TCRα⁺背景とし、TCRVαレパトアを解析した。

4. 研究成果

(1) Foxp3 による Treg 機能制御メカニズム

3 種類の変異マウスいずれも *scurfy* マウスと同様、多臓器性の炎症を伴う自己免疫疾患を発症することを見出し、これら変異が IPEX の原因であることを証明した。興味深いことに、I363V, A384T 変異マウスにおいて発症する炎症は *scurfy* および R397W 変異マウスに発症する炎症よりも軽度であり、前二者が hypomorphic 変異であることが確かめられた。そして、ヘテロ接合体において Treg 分化、機能を解析したところ、I363V, R397W マウスにおいては胸腺内分化、*in vitro* における抑制機能、末梢における恒常性維持が全体的に障害され、また遺伝子発現パターンも全体的に影響を受けた。一方、A384T 変異マウスにおいては、胸腺内分化、*in vitro* における抑制機能は正常であり、Treg を特徴づける遺伝子群 (いわゆる Treg signature) のうち一部の遺伝子のみの発現が障害されていた。しかしながら、A384T Treg は末梢において野生型 Treg と十分競合できずに数が減少することを見出し、末梢における恒常性維持に選択的な障害があることがわかった。さらに、マイクロアレイ解析の結果、リンパ組織に局在する CCR7^{high} サブセットは正常に存在するものの、末梢組織へ局在する CCR7^{low} サブセットに選択的な障害があることが見出された。マイクロアレイ解析の結果、CCR7^{low} サブセットの中でも特定のサブセットを特徴付ける遺伝子群が A384T Treg において特異的に減少していた。実際、末梢組織における Treg を解析すると、この Treg が多く存在する皮膚等の組織において A384T Treg の減少が顕著であり、A384T /WT ヘテロマウスにおいてはこの一部の CCR7^{low} サブセットが完全に消失していることが明らかになった。この Treg サブセットの欠損は自己免疫疾患を発症する A384T /Y マウスにおいても認められた。さらに、A384T 変異によって惹起される自己免疫疾患は野生型 Treg の移入により阻止され、このとき野生型 Treg はこの特定の CCR7^{low} サブセットを選択的に再構成することを見出した。以上の結果から、A384T 変異マウスに発症する自己免疫疾患はこの Treg サブセットの分化・維持が障害されることで惹起されると考えられた (投稿準備中。)

(2) Treg 分化の可塑性

T 細胞欠損環境下において Foxp3 発現を消失した細胞の多くは、抑制活性を失って IFN-γ, IL-2, IL-17, IL-21 などのサイトカインを産生するヘルパー T 細胞へと分化していることを明らかにした。特に、これら exFoxp3⁺ T 細胞は腸管パイエル板において CXCR5^{hi}PD1^{hi}Bcl6⁺IL21⁺ follicular helper T (Tfh)細胞へと分化しており、B 細胞における IgA 産生を誘導するヘルパー機能を有することを見出した。Foxp3⁺ T 細胞から Foxp3⁻ T 細胞への分化は、IL-4, IL-6, IL-21 などのサイトカイン存在下で TCR

刺激を受けることで促進され、また TGF- β の中和によっても促進されたことから、サイトカイン環境が重要な役割を果たしていることが分かった。しなしながら、このような“可塑性”を示す Foxp3⁺ T 細胞は一部のマイナーなサブセットであり、多くはこれら環境変動に対しても安定に Foxp3 を発現すること、そしてその安定性は CD25 発現と相関していることを見出した。以上の結果は、2 報の原著論文 (Komatsu et al. *PNAS*, 2009; Tsuji et al. *Science*, 2009) および 1 報の総説 (Hori, *Curr Opin Immunol*, 2010) に報告された。

さらに Foxp3⁺ T 細胞の fate mapping を行い、GFP^{RFP} exFoxp3⁺ T 細胞が確かに正常個体の末梢に存在すること、それらはサイトカインを産生するヘルパー T 細胞としての性状を示すことを明らかにした。しかしながら、exFoxp3⁺ T 細胞の TCR レパトアを解析したところ、それらは Foxp3⁺ Treg よりもむしろ Foxp3⁺CD44^{hi} 活性化・メモリー T 細胞と同様の TCR レパトアを示すことを見出し、Treg とは起源を異にした細胞であることがわかった。さらに、Foxp3^{GFP^{Cre}}.ROSA26^{RFP} マウスを用いて解析を進めた結果、Foxp3 発現の誘導過程に伴って Foxp3 誘導初期に一過的な Foxp3 発現を示す細胞が生じるものそれらは抑制機能を有しておらず、遺伝子発現パターン、Foxp3 遺伝子座のメチル化状態の点において Treg とは明確に異なった性質を有する細胞であることを見出した。従って、exFoxp3⁺ T 細胞とは、一過的に Foxp3 を発現する Treg とは異なった活性化 T 細胞であると結論付けられた。一方、大多数の Foxp3⁺ T 細胞は安定に Foxp3 を発現して Treg として機能し、この Treg における安定な Foxp3 発現は Foxp3 遺伝子座の脱メチル化状態によって一過的な Foxp3 発現と区別されることを見出した。以上の結果から、Treg とは環境からの様々な擾乱に対しても安定に Foxp3 を発現して安定に機能する細胞系列であるが、Foxp3 発現自体は系列特異的ではなく、活性化 T 細胞に promiscuous に発現されることが明らかになった (論文投稿中)。

5. 主な発表論文等

(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 12 件)

- ① Honda, T., Otsuka, A., Tanizaki, H., Minegaki, Y., Nagao, K., Waldmann, H., Tomura, M., Hori, S., Miyachi, Y., and Kabashima, K. Enhanced murine contact hypersensitivity by depletion of endogenous regulatory T cells in the sensitization phase. *J. Dermatol. Sci.* 61: 144-147, 2011 (査読有)
- ② Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., Taniguchi,

T., Takeda, K., Hori, S., Ivanov, I.I., Umesaki, Y., Itoh, K., Honda, K. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* 331: 337-341, 2011 (査読有)

- ③ Hori, S. Developmental plasticity of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 22: 575-582, 2010 (査読有)
- ④ Tomura, M., Honda, T., Tanizaki, H., Otsuka, A., Egawa, G., Tokura, Y., Waldmann, H., Hori, S., Cyster, J.G., Watanabe, T., Miyachi, Y., Kanagawa, O., and Kabashima, K. Activated regulatory T cells are the major T cell type emigrating from sensitized skin. *J. Clin. Invest.* 120: 883-893, 2010 (査読有)
- ⑤ Tong, H., Miyazaki, Y., Yamazaki, M., Hara, H., Waldmann, H., Hori, S., and Yoshida, H. Exacerbation of delayed-type hypersensitivity responses in EBV-induced gene-3 (EBI-3)-deficient mice. *Immunol. Lett.* 128: 108-115, 2010 (査読有)
- ⑥ Hori, S. c-Rel: A pioneer in directing regulatory T cell lineage commitment? *Eur. J. Immunol.* 40: 664-667, 2010 (査読有)
- ⑦ Kim, J., Lahl, K., Hori, S., Loddenkemper, C., Chaudhry, A., deRoos, P., Rudensky, A., and Sparwasser, T. Cutting Edge: Depletion of Foxp3⁺ cells leads to induction of autoimmunity by specific ablation of regulatory T cells in genetically targeted mice. *J. Immunol.* 183: 7631-7634, 2009 (査読有)
- ⑧ Tsuji, M., Komatsu, N., Kawamoto, S., Kanagawa, O., Honjo, T., Hori, S.*, and Fagarasan, S.* Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3⁺ T cells in gut Peyer's patches. *Science* 323: 1488-1492, 2009 (査読有)
- ⑨ Komatsu, N., Mariotti-Ferrandiz, M.E., Wang, Y., Malissen, B., Waldmann, H., and Hori, S. (2009) Heterogeneity of natural Foxp3⁺ T cells: a committed regulatory T cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. *PNAS* 106: 1903-1908, 2009 (査読有)
- ⑩ Mori, Y., Kato, T., Kodaka, T., Kanagawa E.M., Hori, S., and Kanagawa, O. Protection of IFN- γ signaling deficient NOD mice from diabetes by cyclophosphamide. *Int. Immunol.* 20: 1231-1237, 2008 (査読有)
- ⑪ Ichiyama, K., Yoshida, H., Wakabayashi, Y., Chinen, T., Saeki, K., Nakaya, M., Takasu, G., Hori, S., Yoshimura, A., and Kobayashi, T. Foxp3 inhibits ROR γ t-mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with ROR γ t. *J. Biol. Chem.* 283: 17003-17008, 2008 (査読有)
- ⑫ Hori, S. Rethinking the molecular definition of regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* 38: 928-930, 2008 (査読有)

[学会発表] (計 19 件)

- ① Hori, S. “Stability and plasticity in regulatory T cell

differentiation” The 14th International Congress of Immunology (2010年8月22-27日、神戸)

- ② Hori, S “Stability and plasticity in regulatory T cell differentiation” Keystone Symposia “Tolerance and Autoimmunity” (2010年2月21-26日、Taos, New Mexico, USA)
- ③ Hori, S “Robustness and plasticity in regulatory T cell differentiation” The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (2009年12月2-4日、大阪)
- ④ Hori, S “Lineage stability and plasticity in regulatory T cell differentiation” The 12th US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference “Immune Regulation” (2009年2月26日、Bethesda, Maryland, USA)
- ⑤ Hori, S “Dissecting Foxp3-dependent molecular program of regulatory T cell differentiation and function” BMB2008 (2008年12月9-12日、神戸)
- ⑥ Hori, S “Foxp3 and its essential function for T cell regulation” International Symposium “Frontiers in Allergy and Autoimmunity” (2008年5月30-31日、Mainz, Germany)

以上国際学会における招待講演
その他国内学会 13 件

[その他]

ホームページ:

<http://www.riken.jp/r-world/research/lab/rcai/home/index.html>

6. 研究組織

(1) 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

50392113

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし