

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21514

研究課題名（和文）制御性T細胞から分泌される新規免疫抑制因子の同定と機能解析

研究課題名（英文）Investigation of new products expressed by Treg cells for immune homeostasis

研究代表者

高場 啓之（Takaba, Hiroyuki）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・助教

研究者番号：50637444

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：制御性T細胞は自己免疫寛容を成立させる重要な免疫細胞集団である。この集団はおもに胸腺で出来上がり、自己抗原を認識することで自己応答性T細胞から分化する。制御性T細胞は所属リンパ組織で免疫抑制に関わったり、末梢組織では組織恒常性の維持に関与する。しかしながら、制御性T細胞がどのように機能するか、その分子基盤は不明な点が多い。そこで、申請者らは制御性T細胞から産生される液性因子を網羅的に解析する実験系を立ち上げ、複数の興味深い因子を同定した。同定した因子の中でも機能未知なものを中心に着目することで、制御性T細胞の分子基盤の一端を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

制御性T細胞は、胸腺でCD4ヘルパーT細胞から分化して、脾臓などの二次リンパ組織において免疫抑制機能を持ち、また、末梢組織においては組織恒常性の維持に寄与している。制御性T細胞がどのように機能するのかはまだ不明な部分が大きく、その分子基盤の解明は自己免疫寛容の理解といった基礎免疫学の礎になるのみならず、自己免疫疾患やがん治療に役立つ。申請者らは、独自に制御性T細胞から分泌される液性因子を網羅的に解析する実験系を確立し、いくつかの重要因子を同定した。同定された因子のうち、特に機能未知の分子に着目することで、制御性T細胞のもつ未知の機能を明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：Regulatory T cells are an important population of immune cells that establish autoimmune tolerance. This population is primarily generated in the thymus and differentiates from self-responsive T cells by recognizing self-antigens. Regulatory T cells are involved in immunosuppression in the lymphoid tissues and in the maintenance of tissue homeostasis in peripheral tissues. However, the molecular basis of how regulatory T cells function remains unclear. Therefore, we established an experimental system to comprehensively analyze the humoral molecules secreted from regulatory T cells and identified several factors. By focusing on the molecules whose functions are unknown among the identified factors, we could elucidate a fundamental molecular mechanism of regulatory T cells.

研究分野：免疫学

キーワード：胸腺 制御性T細胞 がん免疫 自己免疫疾患

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

すべての T 細胞は胸腺で創出され、1つの T 細胞は基本的に1つの抗原受容体 (T 細胞抗原受容体) を発現しており、MHC ペプチド抗原を認識することで、獲得免疫応答を制御している。T 細胞の中でも CD4 陽性のヘルパー T 細胞集団の制御性 T 細胞は、体の免疫系を調節するための重要な役割を果たしている。所属リンパ組織に存在する制御性 T 細胞は、過剰な獲得免疫反応を抑えることにより、自己免疫疾患や慢性炎症を予防する働きを持っている。大部分の制御性 T 細胞は胸腺から分化しており、T 細胞受容体が自己抗原ペプチドを認識することで、活性化され免疫応答の抑制に関わると考えられている。制御性 T 細胞に選択的に発現する転写因子は Foxp3 であり、制御性 T 細胞で Foxp3 の発現が低下したり欠損したりした場合、自己免疫症状を呈する。一方で、Foxp3 の発現を上昇させた場合、つよい免疫抑制がみられる。このように制御性 T 細胞の活性化と機能調節は、体の健康を維持する上で非常に重要であり、制御性 T 細胞がうまく機能しないと、体は自分自身の細胞を攻撃する自己免疫疾患を発症したり、無害な物質に反応してアレルギー反応を引き起こしたりする。

近年、制御性 T 細胞はがん細胞が免疫系に見つかるのを防ぐ役割も果たすことが報告されている。制御性 T 細胞の働きが強すぎると、本来必要な免疫反応を抑制し、感染症への抵抗力が低下したり、がん細胞が体内で増殖したりする可能性がある。以上の理由から、制御性 T 細胞は、免疫療法やがん治療の開発に繋がる重要な研究対象となっている。これまで、制御性 T 細胞の機能は抑制性共分子 CTLA4 や、インターロイキン 10 (IL-10) やトランスフォーミング増殖因子 (TGF- $\beta$ ) を分泌することで免疫制御に関わることが知られている。制御性 T 細胞に選択的に発現する膜タンパク質については遺伝子発現解析でかなり詳細な解析が進んでいるものの、実際に制御性 T 細胞からどのような液性因子を放出するのか、網羅的に解析した研究はなかった。

### 2. 研究の目的

申請者は制御性 T 細胞を活性化させる初代培養系を立ち上げ、培養液中へ産生される液性因子を質量分析装置により網羅的に同定する方法を確立した。この方法を駆使し、制御性 T 細胞から分泌される機能性液性因子を網羅的に探索することで、制御性 T 細胞の分子機能を理解することを目指した。

### 3. 研究の方法

制御性 T 細胞の特徴的なマーカーである FOXP3 遺伝子の発現を追跡できる FOXP3-hCD2 レポーターマウスを用いることで、所属リンパ節から制御性 T 細胞を回収した。そして、活性化した制御性 T 細胞から培地へ分泌される液性因子を網羅的に同定するためにマススペクトロメトリーを行った。同定された化学物質に対しては人工合成することで、候補物質をマウス個体へ投与したり、培養系に加えたりすることで、免疫応答を解析し候補物質の機能を推定した。制御性 T 細胞から分泌されるサイトカインを網羅的に同定するためには、以下のようなステップを行った。1, 制御性 T 細胞の分離と培養: FOXP3 レポーターマウスから二次リンパ組織の脾臓やリンパ節を取り出し、制御性 T 細胞を細胞表面マーカーに対する hCD2 抗体を使用し、磁気活性細胞ソーティング (MACS) とフローサイトメトリーにより分離した。分離された細胞は、無血清培地条件下で増殖させた。さらに、CD3 抗体と CD28 抗体で今日刺激することで T 細胞を活性化させた。2, サイトカインの測定: 培養中の制御性 T 細胞から分泌されるサイトカインは、培養液に放出されるが、既知のサイトカインが産生されているかを、酵素結合免疫吸着試験 (ELISA) やサイトカイン配列図法 (CBA) 等の方法で定量し確認した。3, 遺伝子発現の分析: サイトカイン分泌の詳細を理解するためには、制御性 T 細胞の遺伝子発現プロファイルを調査することが有用です。RNA 抽出後、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)、マイクロアレイ、または次世代シーケンシング (RNA-seq) により、サイトカインを含む遺伝子の発現レベルを測定した。4, 質量分析: 無血清培地を回収し、質量分析装置で培地中に産生されている化学物質を網羅的に同定した。条件によっては、安息香酸等により培地を濃縮して質量分析を行うことで、少量の化学物質を同定した。5, 同定された候補物質を人工的に合成した後に、脾臓細胞集団の *in vitro* 系に投与して、免疫細胞集団ごとの免疫応答について、フローサイトメトリー等を用いて詳細に解析をした。

### 4. 研究成果

制御性 T 細胞は自己免疫寛容を成立させる重要な免疫細胞集団だが、この集団はおもに胸腺で出来上がる。胸腺において制御性 T 細胞は、末梢組織自己抗原を認識することで自己応答性 T 細胞から分化する。そして制御性 T 細胞は所属リンパ組織で免疫抑制に関わったり、末梢組織では組織恒常性の維持に関与したりする。末梢組織では自己抗原認識による活性化が必要であり、さまざまなサイトカインや共刺激分子を発現させることで機能する。しかしながら、制御性 T 細胞がどのように機能するか、その分子基盤は不明な点が多い。そこで、申請者らは制御性 T 細胞から産生される液性因子を網羅的に解析する実験系を立ち上げ、複数の興味深い因子を同定した。制御性 T 細胞の T 細胞受容体刺激により、インターロイキン 10 などの既知の因子は同定できたので実験系は上手く確立したと考えられる。そして、質量分析により同定した液性因子の中でも機能未知なものを中心に着目し、その化合物を合成したり、合成経路に関与する遺伝子について、遺伝子欠損マウスを作製したりした。それらの遺伝子欠損マウスを解析することで、いくつかのがんモデルや自己免疫疾患モデルにおける制御性 T 細胞の新たな機能を見出した。今後、他にも得られた液性因子についてさらなる解析を行い、論文としてまとめる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshihiko Tomofuji, Hiroyuki Takaba, Hiroshi I Suzuki, Rayene Benlaribi, Cristian David Pena Martinez, Yoshihiro Abe, Yasuyuki Morishita, Tadashi Okamura, Akashi Taguchi, Tatsuhiko Kodama, Hiroshi Takayanagi	4. 巻 8
2. 論文標題 Chd4 choreographs self-antigen expression for central immune tolerance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 892-901
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41590-020-0717-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hiroyuki Takaba, Yoshihiko Tomofuji, Hiroshi Takayanagi
2. 発表標題 Promiscuous Gene Regulators for Central Immune Tolerance
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------