

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月15日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590451

研究課題名（和文）ヒト制御性 T 細胞の生物学的機能と特性：新たな分子経路の発見とその作用機序の解明

研究課題名（英文）Biological function and characteristics of human regulatory T cells: A new molecular pathway

研究代表者

平岡 伸介（HIRAOKA NOBUYOSHI）

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：40276217

研究成果の概要（和文）：免疫は生体に侵入する病原体やがん細胞を認識して除去することにより生体を防護する機構である。一方、免疫が過剰に反応して別種の病気になることを防ぐため、免疫反応を抑える働きを担うリンパ球、CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞(Treg)が存在する。がん組織中では、Treg ががんに対する免疫反応を抑えて、がん進展を促進している。本研究では、Treg がどのような仕組みで働くのかを検討するために、その仕組みに関わる新たな分子を見出し、その分子について解析した。

研究成果の概要（英文）：The immune system is a system of biological structures and processes within an organism that protects against disease. To function properly, an immune system detects and removes a wide variety of microorganisms invading into the body and cancer cells. However, an excessive immune reaction causes another types of disease. To avoid it, we have lymphocytes that suppress the immune reaction, one of which is called CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (Treg). Treg also suppress anti-tumor immune reaction in cancer tissues, resulting in supporting the cancer growth and extension. Here, in order to make clear the molecular mechanisms of the immune suppression mediated by Treg, we found a new molecule expressed specifically in Treg and involved in the immune suppression, and characterized the molecule.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：実験病理

科研費の分科・細目：

キーワード：がん、病理学、免疫学

1. 研究開始当初の背景

(1) CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞(Treg)は、他の免疫担当細胞機能を抑制して免疫反応を負に調整する、末梢性免疫寛容の担い手で

ある。先天的に Treg を欠損した scurfy マウスや Treg に異常のある IPEX (immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked)の患者は全身性の重篤

な自己免疫疾患となり、実験的に Treg を除去したマウスでも自己免疫疾患が発生する。一方で研究代表者は、ヒトがん間質においては Treg 浸潤の増加が宿主免疫反応の低下を惹起し、結果的に Treg 浸潤の多いがん症例では有意に予後不良となること、発がん過程の進行に Treg を介した抗腫瘍免疫の低下が重要であることを示してきた。このように、Treg 機能の増減により宿主免疫機能が大きく変化し、Treg の異常により自己免疫疾患の発生や腫瘍の増悪が促進されることから、Treg をコントロールすることが臨床的に大きな治療効果をもたらすことが期待される。しかし Treg に関して未解明の点も多い。Treg の細胞表面特異的な分子の同定や、Treg の主たる役割である、リンパ球等の免疫担当細胞機能を抑制する活性の分子機序についても定説を得ていない。さらにマウスに比して、ヒト Treg に関する情報はずっと少ない。従ってヒト Treg の生物学的機能や特性の理解を深めることは、学術的にも、また腫瘍や自己免疫疾患の効果的な治療法の開発のためにも急務と云える。

(2) Treg に異常を来す先天性疾患は転写因子 FoxP3 の遺伝子変異により起こり、その後の FoxP3 遺伝子欠損マウスを含めた多くの研究から、FoxP3 が Treg の細胞分化や機能発現にとって必須であることがわかった。そしてマウスにおいては FoxP3 の遺伝子導入のみにより、ナイーブ CD4⁺T 細胞を Treg の機能や特徴を有する細胞へと誘導可能である。ところがヒトにおいては FoxP3 の遺伝子単独導入では Treg 機能発現を十分に誘導することが出来ず、特に最も重要な機能である、他のリンパ球機能を抑制する活性が十分に誘導できない(*J Clin Invest* 2005;115:3276)。この為ヒトでは Treg

機能発現に FoxP3 に加えて他の分子の関与が必要と考えられている。

2. 研究の目的

(1) Treg の生物学的機能や特性の理解を深め、悪性腫瘍に対する効果的な免疫療法開発の礎となる知見を得るために、ヒト Treg の生物学の解明に取り組んでいる。本研究では、特に、他のリンパ球に対する抑制活性の分子機序を明らかにすることを目的として、その抑制活性の発現に必要な FoxP3 以外の新たな転写因子の同定を第一の目的とする。

(2) ヒト Treg における TF-HTR の特性・機能の解析を通して、Treg リンパ球抑制活性における TF-HTR の役割とその作用機序について検討し、リンパ球抑制活性の分子機序の解明に迫る。さらに、Treg による宿主免疫反応性の低下を介した、がんの進行と悪性度の増進が知られていることから、TF-HTR の Treg における発現変化を詳細に検討することにより、これら分子のがんにおける意義についても検討する。

3. 研究の方法

(1) 健常者末梢血単核球からナイーブ CD4⁺T 細胞を免疫磁気ビーズ法にて回収し、それに TGF- β 存在下で T 細胞レセプター(TCR)刺激を加えて、Treg 様のリンパ球抑制活性を有する細胞を誘導した(以後 iTreg と呼ぶ)。TGF- β 非存在下で刺激を加えたコントロール細胞に比して、iTreg で有意に発現亢進する遺伝子を、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析により選別した。それらの中から、多様なサブセットの免疫担当細胞の中で Treg に特徴的に発現亢進を示す遺伝子を定量的 RT-PCR 法にて選別した。さらにレトロウイルスベクターを用いてナイーブ CD4⁺T

細胞にこれらの遺伝子を導入し、その細胞にリンパ球抑制活性を誘導する遺伝子を検索した。

(2) Treg における TF-HTR の役割について、FoxP3 と対比させながら、TF-THR を CD4⁺T 細胞に遺伝子導入して細胞生物学的・免疫学的な変化を解析した。TF-HTR に特異的なモノクローナル抗体を確立した。TF-HTR の発現について、多様なサブセットや活性化状態の異なる免疫担当細胞や造血系臓器を対象に、RNA レベルを定量的 RT-PCR 法により、蛋白レベルをフローサイトメトリー・免疫組織化学にて検討した。また Treg がリンパ球抑制活性を示す際に、TF-HTR の下流で働く遺伝子を同定するため、TF-HTR を遺伝子導入した CD4⁺T 細胞において、コントロール細胞と比して有意に発現変化を示す遺伝子を、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析により選別を試みた。

(3) ヒトがんの発生から進行の過程において、宿主免疫反応性の低下を介して、がん細胞が宿主免疫から逃避し、結果として腫瘍の進行と悪性度の増進を促している。したがって TF-HTR およびその下流分子は Treg 機能の調整を介して、この発がん・進行過程に深く関連していることが推測される。そこで、ヒトがんの発生から進行過程の各段階において、Treg におけるこれら分子の発現がどのように変化しているのかを多数検体を用い、免疫組織化学により検討した。国立がんセンター中央病院で 1990-2002 年に外科的に切除され、術前に化学療法等の補助療法を受けていない各約 200 症例の膵がん切除材料を用いて、腫瘍組織に浸潤する TF-HTR⁺Treg の臨床病理学的な意義について検討した。

4. 研究成果

(1) 前述の方法に従って実験をすすめ、a) TCR 刺激を受けたナイーブ T 細胞に比して iTreg においてその発現が有意に亢進している遺伝子、b) 多様なサブセットの免疫担当細胞の中で、Treg に特徴的に発現亢進している遺伝子、c) ナーブ CD4⁺T 細胞に遺伝子導入して、リンパ球抑制活性を誘導する遺伝子、以上 a)-c) の条件を満たす転写因子をコードする候補遺伝子を同定し、TF-HTR(transcription factor – human Treg) と名付けた。

(2) TF-HTR 遺伝子発現は、健常人 15 人の natural Treg でも見られるが、特に iTreg で高発現する傾向にあり、他の CD4⁺T 細胞サブセットでの発現は殆ど認められなかった。また TF-HTR 転写物のスプライスヴァリエントは異なる状態の Treg に発現していた。組織中で TF-HTR は FOXP3⁺Treg と類似の発現分布を示した。一方、ナイーブ CD4⁺T 細胞において、TF-HTR は FoxP3 によって発現誘導されることはなく、また TF-HTR による FoxP3 あるいは CTLA-4 等のリンパ球抑制関連遺伝子の発現誘導を認めないことから、TF-HTR がヒト Treg の機能や形質の発現のために FoxP3 と共に、おそらく相互に機能を補完しながら働いていることを推定している。TF-HTR 発現細胞で発現亢進する候補遺伝子が複数採れ、さらに候補を絞った上でその機能について検討している。

(3) 約 200 例の膵がん切除検体の検討により、膵がん組織に浸潤する TF-HTR⁺Treg と CD4⁺T 細胞の比が高いと患者生命予後が有意に短くなることがわかった。また多変量解析からこの比は独立した予後因子になることがわかり、患者予後判定の一助になると考えられた。

以上、未だ解析が完遂していない状態であるが、これまでその機能を知られていなかった新たな分子 TF-HTR の特性や機能の解析、さらにその下流で働く分子の同定と機能解析を世界に先駆けて実施している。これらを通じてヒト Treg のリンパ球抑制活性の分子機序の解明に迫り、新たな分子径路の解明により重要な生命現象の理解を深めていくことが期待される。

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 6 件 査読あり)

1. Hiraoka N., Yamazaki-Itoh R. Ino Y. et al. (2011) CXCL17 and ICAM2 are associated with a potential anti-tumor immune response in the early intraepithelial stages of human pancreatic carcinogenesis. *Gastroenterology*. 140,310-321.doi:10.1053/j.gastro.2010.10.009
2. Hiraoka N. (2010) Tumor-infiltrating lymphocytes and hepatocellular carcinoma: Molecular biology. *Int J Clin Oncol*. 6, 544-51. doi: 10.1007/s10147-010-0130-1
3. Hiraoka N. Ino Y. Sekine S. et al. (2010) Tumor necrosis is a postoperative prognostic marker for pancreatic cancer patients with a high interobserver reproducibility in histological evaluation. *Br J Cancer*, 103, 1057-65. doi:10.1038/sj.bjc.6605854

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平岡 伸介 (Nobuyoshi Hiraoka)
独立行政法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長
研究者番号：40276217