

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 5 月 23 日現在

機関番号：12601  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21591277  
 研究課題名（和文） 二種類のヒト新規制御性T細胞サブセットの比較機能解析  
 研究課題名（英文） Comparison analysis of two different human regulatory T cell populations  
 研究代表者  
 藤尾 圭志 (FUJIO KEISHI)  
 東京大学・医学部附属病院・助教  
 研究者番号：70401114

研究成果の概要（和文）：本研究では新しい制御性 T 細胞サブセットの機能を解析した。ヒト末梢血単核球を免疫不全 NOG マウスに移入することで発症する移植片対宿主病（GVHD）において、転写因子 Egr3 を発現する扁桃腺 CD4 陽性 CD25 陰性 CD45RO 陰性細胞または Egr2 を発現する CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞を共移入することにより、体重減少を抑制することを確認した。この結果により、ヒトにおいて CD4 陽性 CD25 陰性 CD45RO 陰性細胞及び CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞が制御性活性を持つことが判明した。

研究成果の概要（英文）：The functions of two newly identified regulatory T cells subsets were evaluated. Regulatory activities of human tonsillar CD4+CD25-CD45RO- cells and CD4+CD25-LAG3+ cells were confirmed in graft-versus-host disease (GVHD) model induced by the transfer of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) to immunodeficient NOG mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：膠原病・アレルギー・感染症内科学

キーワード：免疫寛容、リンパ球、サイトカイン、獲得免疫、免疫制御

1. 研究開始当初の背景

これまで Foxp3 により規定される CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞以外にも、抑制性サイトカイン IL-10 を高産生する Tr1、TGF-β を高産生する Th3 などが培養系においてのみ報告されているが、細胞表面マーカー及び表現型を規定する転写因子などが分かっておらず、詳細な解析はなされていなかった。制御性 T 細胞が同定される以前から知られている T 細胞レベルの自己免疫寛容のメ

カニズムとしてアナジーがある。アナジーは T 細胞が特異抗原に対する増殖と IL-2 産生を生じない状態を示す。最近 T 細胞のアナジーを規定する転写因子として Egr-2 が報告された (Nat Immunol.2005,6:472-80)。申請者はレトロウイルスベクターを用いた実験系で Egr-2 のマウス in vivo での免疫抑制活性を検討した。すると Egr-2 遺伝子を導入した CD4 陽性 T 細胞は、生体内で OVA による遅延型過敏反応を著明に抑制することが分

かった。さらに *Egr-2* 遺伝子導入 CD4 陽性 T 細胞は、T 細胞の活性の抑制に重要とされている LAG-3、IL-10 の発現を誘導したことから、マウス脾臓において *Egr-2* を高発現する CD4 陽性 CD25 陰性 CD45RB 陰性 LAG3 陽性細胞サブセット（以下 CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞と記載）が同定できた。この CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞は *Foxp3* を mRNA・タンパクとも発現しておらず、TCR 刺激により 10 ng/ml 以上の高濃度の IL-10 を産生した。さらに腸炎モデル系において、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞は IL-10 依存性に腸管炎症を著明に抑制する活性があることが判明した。また *Foxp3* 欠損 *Scurfy* マウスでも抑制能のある CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞が増加していた。以上のことから *Egr-2* が T 細胞に強い抑制能を付与しうる遺伝子であること、*Egr-2* を高発現した T 細胞は *Foxp3* とは独立した、従来言われてきた *Tr1* に類似する新たな制御性 T 細胞サブセットであると考えられた。ヒトにおいても CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞が存在するかどうか扁桃腺において検討したところ、*Egr-2* 高発現・*Foxp3* 非発現で IL-10 を高産生する CD4 陽性 CD25 陰性 CD45RO 陽性 LAG3 陽性細胞が存在し、ヒトにおいても制御性の CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞が機能していると考えられた。

*Egr* ファミリーに属する別の転写因子 *Egr-3* についても検討したところ、OVA 特異的 TCR DO11.10 遺伝子とその *Egr-3* 遺伝子を共導入した CD4 陽性 T 細胞は、生体内で OVA による遅延型過敏反応を著明に抑制した。さらに *Egr-3* 導入 CD4 陽性 T 細胞は *Egr-2* 遺伝子導入 CD4 陽性 T 細胞と同様に LAG-3、IL-10 の mRNA・タンパクの発現を誘導したが、制御性 T 細胞の誘導に重要なサイトカインの TGF- $\beta$  タンパクに関しては *Egr-3* 遺伝子導入 CD4 陽性 T 細胞だけが産生した。CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞は TGF- $\beta$  を少量のみ産生するが、*Egr-3* 発現は低発現であった。ヒト扁桃腺において検討したところ、CD4 陽性 CD25 陰性 CD45RO 陰性細胞の一部が *Egr-3* 遺伝子及び TGF- $\beta$  の mRNA を末梢血ナイーブ CD4 陽性 CD45RA 陽性細胞の約 5 倍高発現し、TGF- $\beta$  タンパクを多量に産生することが分かった。*Egr-3* 導入 CD4 陽性細胞では、TGF- $\beta$  の転写に重要とされているリン酸化 STAT3 が増加していた。以上のことから *Egr-3* が T 細胞に TGF- $\beta$  産生能及び強い抑制能を付与しうる遺伝子であること、*Egr-3* を高発現した T 細胞は従来言われてきた *Th3* に相当する新たな制御性 T 細胞サブセットであると考えられた。

## 2. 研究の目的

2007年に報告されたゲノムワイドのSNP解析において *Egr-2* がクローン病の感受性遺伝子であることが示唆され（Nature 447:661-678,2007; Nature Genetics 39:596-604,2007）、T細胞アナジ-遺伝子関連の制御性T細胞サブセットは各種自己免疫疾患に関与することが強く推測される。今後自己免疫疾患発症機序の解明には、マウスだけでなくヒト細胞での解析が重要である。本研究では申請者らが新たに同定したヒト扁桃腺の *Tr1* 様サブセット-CD4陽性 CD25陰性 CD45RO陽性LAG3陽性細胞及び *Th3* 様サブセット-CD4陽性 CD25陰性 CD45RO陰性細胞を比較して解析し、自己免疫寛容の破綻から自己免疫疾患の発症に至るメカニズムの解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

ヒト扁桃腺 CD4 陽性 CD25 陰性 CD45RO 陽性 LAG3 陽性細胞、CD4 陽性 CD25 陰性 CD45RO 陰性細胞、CD4 陽性 CD25 陽性 *Foxp3* 陽性制御性 T 細胞及び末梢血 CD4 陽性 CD45RA 陽性ナイーブ T 細胞の 4 群でマイクロアレイによる発現遺伝子解析を行った。

またヒト扁桃腺 CD25 陰性 CD45RO 陽性 LAG3 陽性細胞、CD4 陽性 CD25 陰性 CD45RO 陰性細胞の生体内での抑制活性をヒト細胞のマウス疾患モデルへの移入により検討した。具体的には NOG マウスに 0.35 Gy のレントゲン照射による前処置を行い、翌日ヒト末梢血リンパ球を腹腔内注射し以後 60 日間に渡り移植片対宿主病 (GVHD) の発症を観察する実験系を用いた (Transplantation 60:179-184,1995)。末梢血リンパ球の腹腔内注射と同時に扁桃腺 CD25 陰性 CD45RO 陽性 LAG3 陽性細胞、CD4 陽性 CD25 陰性 CD45RO 陰性細胞及び CD4 陽性 CD25 陽性 *Foxp3* 陽性細胞を静注し、GVHD への抑制効果を検討した。

## 4. 研究成果

マイクロアレイ解析ではヒト扁桃腺 CD4 陽性 CD25 陰性 CD45RO 陽性 LAG3 陽性細胞は *Egr2*, IL-10, LAG3 に加え、マウス CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞が発現する IFN- $\gamma$ , ビタミン D レセプター、*c-Maf*, CD22, CD200 などを発現しており、マウス CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞ときわめて類似した細胞集団であることが示唆された。一方で CD4 陽性 CD25 陰性 CD45RO 陰性細胞は *Egr3*, TGF- $\beta$ 1 を発現していたが、CD4 陽性 CD25 陽性 *Foxp3* 陽性制御性 T 細胞や、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞が特徴的に発現する遺伝子の発現はほとんどみられず、他の制御性 T 細胞とは大きく異なる細胞集団と考えら

れた。

扁桃腺 CD4 陽性 CD25 陰性 CD45RO 陰性細胞はマウス Egr3 遺伝子導入細胞とは異なり、TCR 刺激時には TGF- $\beta$ 、IL-10 とも産生しなかった。しかし CD4 陽性 CD25 陰性 CD45RO 陰性細胞は膜上に TGF- $\beta$  を発現し、この TGF- $\beta$  発現は siRNA による Egr3 の発現抑制で低下したことから、Egr3 依存性と考えられた。CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞も TGF- $\beta$  を発現することが知られているが、CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞では Egr3 の発現は高くなく、この制御性 T 細胞の TGF- $\beta$  発現への Egr3 の寄与は大きくないと考えられた。

ヒト末梢血単核球を免疫不全 NOG マウスに移入することで発症する移植片対宿主病 (GVHD) において、扁桃腺 CD4 陽性 CD25 陰性 CD45RO 陰性細胞を共移入することにより、体重減少を抑制することを確認し、この細胞集団が制御性活性を持つことが証明できた。さらに同様の GVHD モデルにおいて、Egr2 を発現する扁桃腺由来の CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞を共移入することにより、体重減少を抑制することも確認できた。この結果により、ヒトにおいても CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞が制御性活性を持つことが判明した。

また興味深いことに、自己抗体が出現する自己免疫疾患、全身性エリテマトーデス (SLE) および関節リウマチ (RA) において、末梢血 CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞が健常人よりも著明に減少していることが確認できた。SLE、RA とも CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞も健常人よりも減少していたが、その減少の程度は CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞の方が大きかった。

つまり本研究により Egr2 を発現する CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞がマウス CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞に極めて類似していること、生体内で抑制性活性を発揮することが確認できた。また Egr3 を発現する CD4 陽性 CD25 陰性 CD45RO 陰性細胞が Egr3 依存性に TGF- $\beta$  を発現し、生体内で抑制性活性を発揮することが確認できた。また自己免疫疾患において CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性細胞が減少していることが明らかとなり、自己免疫疾患との関連が示唆された。

## 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 7 件)

(1) Fujio K, Okamura T, Sumitomo S, Yamamoto K. Regulatory T cell-mediated

control of autoantibody-induced inflammation. *Frontiers in Immunology*, 査読有、3: 2012, 28

(2) Okamura T, Fujio K, Sumitomo S, Yamamoto K. Roles of LAG3 and EGR2 in regulatory T cells. *Ann Rheum Dis.*, 査読有、71 suppl2: 2012, i96

(3) Okamoto A, Fujio K, Okamura T, Yamamoto K. Regulatory T cell-associated cytokines in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol*, 査読有、2011:2011,463412

(4) Okamoto A, Fujio K, Yamamoto K. The future of lupus therapy modulating autoantigen recognition. *Lupus*, 査読有、19:2010, 1474

(5) Fujio K, Okamura T, Yamamoto K. The family of IL-10 secreting CD4+ T cells. *Adv Immunol.*, 査読有、105:2010,99

(6) Myouzen K, Kochi Y, Shimane K, Fujio K, Okamura T, Okada Y, Suzuki A, Atsumi T, Ito S, Takada K, Mimori A, Ikegawa S, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K. Regulatory polymorphisms in EGR2 are associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet.*, 査読有、19:2010, 2313

(7) Okamura T, Fujio K, Shibuya M, Sumitomo S, Shoda H, Sakaguchi S, Yamamoto K. CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells controlled by the transcription factor Egr-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 査読有、106:2009, 13974.

[学会発表] (計 5 件)

(1) Keishi Fujio, CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells and autoimmunity, 8<sup>th</sup> International Congress on Autoimmunity, 2012 年 5 月 10 日、グラナダ、スペイン

(2) 藤尾圭志, 制御性 T 細胞と自己免疫、日本リウマチ学会、第 56 回日本リウマチ学会学術総会シンポジウム、2012 年 4 月 27 日、グランドプリンスホテル新高輪、東京、日本

(3) 藤尾圭志, CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells and autoimmune disease, 第 40 回日本免疫学会学術総会、2011 年 11 月 29 日、幕張メッセ、千葉、日本

(4) Keishi Fujio, CD4+CD25-LAG3+

regulatory T cells and autoimmunity,  
Autoimmunity Congress Asia 2011, 2011 年  
11 月 18 日、シンガポール、シンガポール

(5) 藤尾圭志、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3  
陽性制御性 T 細胞と自己免疫疾患、第 39 回  
日本臨床免疫学会総会、2011 年 9 月 17 日、  
東京、日本

〔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〕

ホームページ等

<http://plaza.umin.ac.jp/~areri18/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤尾 圭志 (FUJIO KEISHI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70401114

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし