

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590569

研究課題名(和文) 制御性T細胞機能におけるGARP蛋白の役割

研究課題名(英文) Roles of the GARP protein in functions of regulatory T cells

研究代表者

藤井 穂高 (Fujii, Hodaka)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：30302665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは、活性化T-reg特異的細胞表面蛋白としてGARP蛋白を同定した。本研究課題では、申請者が独自に作製したGARP変異マウスを用いて、GARPが自己免疫制御に果たす役割とその分子機構の解析を行った。(1) GARPがT-regの分化と機能発現に果たす役割、(2) GARPによるT-reg機能制御の分子機構、(3) GARPが生体内で自己免疫の抑制に果たす役割、(4) GARPの発現制御機構、について解析を進め、GARPが、TGFβシグナルとGARP自身の発現調節を介してT-regとTh17細胞の分化誘導において重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The awardee identified GARP as an activated regulatory T cell (T-reg)-specific cell surface protein. In this study, the role of GARP in the regulation of suppression of autoimmunity and its molecular mechanisms were analyzed by using transgenic mice overexpressing GARP in the T cell lineages and GARP-deficient mice. The analysis included (1) roles of GARP in the regulation of differentiation and functions of T-regs, (2) molecular mechanisms of regulation of T-reg functions by GARP, (3) roles of GARP in suppression of autoimmunity in vivo, and (4) mechanisms of expression regulation of GARP. The present study revealed that GARP plays critical roles in differentiation of T-regs and Th17 cells through TGFβ signaling and expression regulation of GARP itself.

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：免疫寛容 自己免疫 制御性T細胞 GARP蛋白

1. 研究開始当初の背景

近年の研究により、制御性 T 細胞 (T-reg) が自己免疫疾患の抑制や免疫能の調節に重要な働きをしていることが明らかになりつつある。これまでに、T-reg が免疫抑制を行う際に、IL-10, TGF β , CTLA-4, granzyme B, perforin, IFN γ , IL-9, HO-1, cAMP, galectins, CD39-CD73, adenosine, IL-2 sink, IL-35 等の分子・機構が関与することが示唆されているが、T-reg による免疫抑制の分子機構については不明の点が多い。

申請者らは、ニューヨーク大学の Derya Unutmaz 博士と共同で、活性化 T-reg 特異的細胞表面蛋白として GARP 蛋白を同定した。GARP をヒトナイーブ CD4 T 細胞に発現させると、T 細胞受容体刺激による増殖やサイトカインの分泌が抑制された。この機能には、GARP の細胞外ドメインが必要であった。また、ヒト T-reg で、GARP の発現を減少させると、T-reg の抑制能が減弱した。これらの結果から、GARP が T-reg の機能発現に重要な役割を果たしていることを明らかにした (*PLoS One*, 2008)。更に、ヒト T-reg を用いて、GARP の発現には、T-reg の主要分化制御転写因子である Foxp3 の発現だけでは不十分であり、他の刺激が必要であることを示した。また、GARP の発現と、T-reg の抑制能とは良く相関しており、GARP が他の CD4 T 細胞サブセットで発現していないことから、GARP が機能的活性化 T-reg の特異的マーカーであることを示した。この結果は、生体内での免疫反応や自己免疫疾患における機能的活性化 T-reg の動態を解析するために重要な知見である (*PNAS*, 2009)。

しかし、これまでの解析は、主としてヒトの細胞を用いてなされていたため、GARP が T-reg や他の細胞の分化や全身での免疫抑制・免疫調節に果たす役割は全く分かっていなかった。

2. 研究の目的

本研究提案では、申請者が独自に作製した GARP 変異マウスを用いて、GARP が自己免疫制御に果たす役割とその分子機構の解明を目指す。具体的には、

- (1) GARP が T-reg の分化と機能発現に果たす役割
- (2) GARP による T-reg 機能制御の分子機構
- (3) GARP が生体内で自己免疫の抑制に果たす役割
- (4) GARP の発現制御機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

1. GARP 変異マウスにおける T-reg の分化及び機能

GARP が T-reg の分化に影響を与える可能性を考慮して、まず、GARP 変異マウスにおける T-reg の分化を解析した。GARP 変異マウスの胸腺及び末梢リンパ組織中の T-reg 数を、T-reg のマーカーである転写因子 Foxp3, CD4, CD25 の発現を指標としてフローサイトメトリーにより解析した。

次いで、GARP 変異マウスの T-reg を単離して、*in vitro* での増殖アッセイ、サイトカイン産生能、及びエフェクター T 細胞の機能抑制アッセイを用いてその機能を解析した。また、GARP トランスジェニックマウスではヒト CD2 ミニジーンをトランスジーンのカセットとして用いており、T-reg だけでなく他の T 細胞でも GARP が強制発現されている。このときに CD4 陽性 CD25 陰性のナイーブ T 細胞が免疫抑制能を持っているか否かを調べることで、GARP の発現が免疫抑制能の発現に必要十分かどうかを検討した。

2. GARP による T-reg 機能発現の分子機構

GARP が T-reg の機能発現を制御する分子機構を解析した。GARP 蛋白は、細胞外ドメイン・膜貫通ドメイン・非常に短い細胞内ドメインからなる。申請者らは、細胞外ドメインだけからなる組換え GARP 変異体蛋白をエフェクター T 細胞に加えると、そのエフェクター T 細胞の増殖が抑制されるという予備的な結果を得ている。このことから、GARP は、その細胞外ドメインでエフェクター T 細胞もしくは培地中の何らかの分子と相互作用することにより、その機能を発揮することが考えられる。そこで、GARP の細胞外ドメインと相互作用する分子を、GARP の細胞外ドメインと抗体 Fc 領域との融合蛋白を用いたアフィニティー精製や発現クローニングにより同定を試みた。こうした解析により、GARP が T-reg の機能発現を制御する分子機構の解明を目指した。

3. GARP 変異マウスにおける自己免疫疾患に対する感受性

GARP が T-reg 機能発現に重要であることから、GARP トランスジェニックマウスでは自己免疫疾患に対する感受性が低下する一方、GARP 欠損マウスではその亢進が予想される。この予想を実証するため、GARP 変異マウスでの自発的自己免疫疾患発症の有無を調べた。具体的には、様々な週齢のマウスで、自己抗体（抗核抗体、抗 DNA 抗体等）の有無、活性化 T 細胞数、組織へのリンパ球の浸潤、脾腫・リンパ腫の有無、組織破壊などを網羅的に解析した。

一方、T-reg には GARP 以外にも機能発現機序があることから、SP 環境下で飼育しているマウスにおいては、自発的自己免疫症状の発現の頻度が低い、ないしは、発症に時間がかかる可能性もある。そこで、誘導性自己免疫疾患のモデル系を用いて解析した。誘導性

自己免疫疾患のモデル系としてコラーゲン誘導性関節炎 (collagen-induced arthritis: CIA)、dextran sulphate sodium (DSS) 誘導性腸炎などの系を用いた。こうした解析により、GARP が生体内で免疫調節に果たす役割を解析した。

4. GARP の発現制御機構

T-reg の分化には転写因子 Foxp3 が必須であることが示されている。また、マウスのナイーブ CD4 T 細胞に Foxp3 を強制発現させたり、TGF β 刺激によって Foxp3 の発現誘導をすれば、GARP を発現した機能的 T-reg への分化が誘導出来ることが示されている。それに対して、ヒトの場合には、Foxp3 の発現だけでは機能的 T-reg には分化せず GARP も発現しないことが明らかにされており、マウスとヒトの T-reg 分化には大きな違いがあることが示されている。ヒトおよびマウスにおける GARP 発現制御機構の解析を進め、ヒトで機能的 T-reg の分化を誘導する未知の機構を解析した。具体的には、ヒト T-reg で GARP の発現を誘導する刺激の同定、GARP 遺伝子のエンハンサー・プロモーター領域の解析による発現制御領域の同定、それらの領域に結合する転写因子の同定、等を進めた。

4 . 研究成果

(i) GARP-Tg マウスの作製とその解析: GARP が T-reg 機能発現に果たす役割を解明する目的で、VA-hCD2 カセットを用いて、マウス野生型 GARP 遺伝子を T 細胞特異的に過剰発現させたトランスジェニックマウスを C57BL/6 系を用いて作製した(以下、GARP-Tg マウス)。複数の独立した Founders が得られ、そこから生まれたラインを用いて、T-reg の分化、リンパ球細胞集団及び T 細胞の機能を解析した。その結果、

- a. T 細胞受容体 (TCR) からの刺激が、GARP の細胞膜への効率的な局在に必要である。
 - b. IL-2 シグナルが T-reg 特異的に GARP の細胞膜上への発現増加を誘導する。
 - c. GARP-Tg マウスでは、CD4 陽性 T 細胞数が、末梢で顕著に減少しており、特に週齢が上がるとエフェクター/メモリータイプの細胞の減少が加速する。
 - d. GARP-Tg マウスでは、胸腺において、成熟 T-reg のみが減少している。
 - e. GARP-Tg CD4 陽性細胞の TCR 刺激による増殖が低下しており、これは TGFβシグナルを抑制することにより解除される。
 - f. TGFβシグナルの抑制により T-reg における GARP の細胞表面での発現は顕著に増加し、FoxP3 の発現誘導をブロックする。
- といった結果を得た。こうした知見は、GARP が、TGFβシグナルと GARP 自身の発現調節を介して T-reg の分化に重要な役割を果たしていることを示唆するものである。この成果を、Journal of Immunology 誌上に発表した。

(ii) GARP 欠損マウスの作製: GARP の欠損が T-reg 機能に与える影響を解析する目的で、GARP 遺伝子の exon 1 を loxP で挟んだ形のノックインマウスを作製した。Exon 1 は、GARP 蛋白のシグナルペプチドをコードしており、これまでの解析から、シグナルペプチドを欠き細胞表面における発現能を失った GARP 蛋白はその機能を完全に消失することを確認している。このマウスに、全身の細胞で Cre リコンビナーゼを発現する CAG-Cre マウスを交配させて、全身で GARP 遺伝子を欠損するマウスを作製した。この GARP 欠損マウスは、生後間もなく死亡した。

そこで、次に、上記のノックインマウスに、全身で FLPe リコンビナーゼを発現する CAG-FLPe マウスを交配させて、neo カセットを除いた GARP^{Floxed} マウスを作製した。こ

の GARP^{Floxed} マウスと、T 細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する CD4-Cre マウスを交配させて、T 細胞特異的に GARP 蛋白の発現を欠損するマウスを作製した。これを用いて、T-reg の分化、リンパ球細胞集団及び T 細胞の機能を解析した。その結果、

- a. GARP と潜在性 TGFβ1 は、TCR 刺激によって活性化されたマウス T-reg に発現しているが、ヒトの T-reg と異なり、マウスでは休止期にある T-reg にも低いレベルで発現している。
- b. マウス T-reg での GARP の発現は、TCR 刺激無しでも、IL-2 や IL-4 刺激によって増加する。
- c. GARP は、胸腺内 T-reg において低いレベルで発現しており、胸腺内 T-reg 前駆細胞は IL-2 刺激に伴って GARP 及び Foxp3 を共発現する。
- d. GARP の発現は TGFβ1 や TGFβ1 の GARP への結合に依存しておらず、また、furin による pro-TGFβ1 から潜在性 TGFβ1 への転換にもよらない。
- e. GARP の CD4 陽性 T 細胞特異的欠失により、活性化 T-reg 細胞膜上における潜在性 TGFβ1 の発現は消失する。
- f. GARP 欠損 T-reg の分化は正常であり、末梢組織において正常な数が存在し、試験管内では完全な T 細胞活性化の抑制能を持つ。
- g. GARP / 潜在性 TGFβ1 を発現している活性化 T-reg は、外来性 IL-6 存在下に Th17 細胞の分化を効果的に誘導し、また、IL-2 存在下に T-reg 分化を誘導する。
- h. Th17 細胞及び T-reg の分化は、GARP / 潜在性 TGFβ1 を発現している活性化 T-reg によって効果的に誘導される一方、潜在性 TGFβ1 の分泌への依存は軽微である。

こうした成果を、Journal of Immunology 誌に発表した。

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 4 件)

1. Zhou ZX, Kozhaya L, Fujii H, and Unutmaz D, GARP-TGF- β complexes negatively regulate regulatory T cell development and maintenance of peripheral CD4+ T cells *in vivo*. *J. Immunol.* (2013) 190, 5057-5064. doi: 10.4049/jimmunol.1300065. 査読有
2. Edwards JP, Fujii H, Zhou AX, Creemers J, Unutmaz D, Shevach EM, Regulation of the Expression of GARP/Latent TGF- β 1 Complexes on Mouse T Cells and Their Role in Regulatory T Cell and Th17 Differentiation. *J. Immunol.* (2013) 190, 5506-5515. doi: 10.4049/jimmunol.1300199. 査読有
3. Juliana FM, Nara H, Onoda T, Rahman M, Araki A, Jin L, Fujii H, Tanaka N, Hoshino T, and Asao H: Apurinic/apyrimidinic endonuclease1/redox factor-1 (Ape1/Ref-1) is essential for IL-21-induced signal transduction through ERK1/2 pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2012) 420, 628-634. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.051. 査読有
4. Fujita T, and Fujii H: Direct identification of insulator components by insertional chromatin immunoprecipitation. *PLoS One* (2011) 6, e26109. doi: 10.1371/journal.pone.0026109. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

1. Hodaka Fujii, Toshitsugu Fujita, Direct identification of insulator components by insertional chromatin immunoprecipitation (iChIP). Keystone Symposium "Epigenomics", 2012年1月18日、Keystone

Resort, Keystone, Colorado, USA

2. 藤田 敏次、藤井 穂高、挿入的クロマチン免疫沈降法を利用したインスレーター分子の同定、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月16日、パシフィコ横浜(神奈川県)
3. 藤井 穂高、藤田 敏次、挿入的クロマチン免疫沈降法(iChIP)による特定ゲノム領域エピジェネティクス制御機構の生化学的解析、日本エピジェネティクス研究会 第5回年会、2011年5月20日、KKRホテル熊本(熊本県)

[その他]

ホームページ等

<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/lab/microimm/fujii/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 穂高 (FUJII, Hodaka)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号 : 30302665

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し