

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：H23～H24

課題番号：23790534

研究課題名（和文） PD-1と新規免疫制御分子の作用によるT細胞分化の制御

研究課題名（英文） PD-1 and novel immune-regulatory molecules in T cell differentiation.

研究代表者

竹馬 俊介（CHIKUMA SHUNSUKE）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50437208

研究成果の概要（和文）：T細胞の免疫寛容導入時において、PD-1によって強く抑制されていた未知分子、ITAG1の機能解析を行った。ITAG1は、核内で既知の転写因子やクロマチン制御因子と会合することを見出し、T細胞機能を制御することが考えられたが、予想に反して、作成したITAG1ノックアウトマウスではT細胞の分化に大きな障害が見られなかった。ノックアウトマウスでは、ITAG1と近縁の分子が代償性に働くことが考えられた。

研究成果の概要（英文）：Biochemical and immunological experiments were carried out to elucidate roles of ITAG1, a novel molecule regulated by PD-1 during immune tolerance induction. I found that ITAG1 interacted with known transcriptional factor and chromatin regulators, suggesting its role in T cell differentiation. In contrast, ITAG1 knockout mice showed only minor defect, suggesting some compensatory mechanism in the knockout mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3400000	1020000	4420000

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：免疫学

キーワード：T細胞、副刺激、免疫寛容、免疫抑制、がん免疫

1. 研究開始当初の背景

リンパ球によって指揮される獲得免疫系は、生体防御を通じてホメオスタシスの維持に必須である一方、アレルギーや自己免疫疾患の要因となり、如何にして免疫系が自己に対する反応を起こさずにいられるのかは、免疫学の最大の疑問である。

1) PD-1分子は、TおよびB細胞に発現する免疫グロブリン様レセプターであり、PD-1ノックアウトマウス(KO)が、全身性、または臓器特異的な自己免疫疾患を自然発症することから、生理的なリンパ球の活性化の後、過剰な活性化を抑制するブレーキとして働

くと考えられている。私は、マウス体内で、CD8陽性のT細胞にアナジー（抗原不応答性）を獲得させる実験系を構築し、T細胞のアナジー獲得には、PD-1シグナルと、それによる抗原刺激初期のIL-2抑制が必須であることを明らかにしてきた。この研究より得られたサンプルを用いて行ったマイクロアレイ解析により、アナジー抵抗性のPD-1KOマウス由来のT細胞でのみ発現が上昇した、未知のITAG1遺伝子を同定した。ITAG1は、T細胞特異的に発現し、PD-1シグナルで早期に発現抑制される。さらに、ITAG1をT細胞株でノックダウンすると、T細胞レセプター(TCR)依存性の細胞増殖を抑制するこ

とから、ITAG1 分子は、抗原刺激時に、PD-1 による抑制性シグナルの非存在下でのみ発現し、T 細胞の強い活性化に深く関わっていると考えた。

2) 前述の実験で、体内での IL-2 の発現が T 細胞の運命や自己寛容を決定することは自明であった。IL-2 の、新規の制御因子を見つける目的で Jurkat T 細胞株を用い、この発現に影響を与えた TRIM28 遺伝子に着目した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ITAG1、および TRIM28 の、T 細胞分化や自己寛容における役割を生体レベルで解析すること、また、そのメカニズムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

1) ITAG1、および TRIM28 の、T 細胞分化、および機能における機能を検証するため、当該遺伝子の持つ機能エクソンの上流、および下流に、大腸菌由来の LoxP 配列を導入したマウス (ITAG1 Flox および TRIM28 Flox) を用い、LCK-CRE:Tg と交配することにより、T 細胞系列でのみこれらの分子を欠損するマウスを作成した。

2) ITAG1 および TRIM28 の生化学的解析
これまでに、生化学的解析のため、抗 ITAG1 モノクローナル抗体を開発している。ITAG1 および TRIM28 が既知の T 細胞制御因子と会合する可能性について、既知の転写因子をクローニングし、哺乳類細胞発現ベクターに組み替えた。293T 細胞に、これら因子と ITAG-1、または TRIM28 を導入し、発現を確認後、免疫共沈降法、およびウエスタンブロットを使って分子間の会合が起こるかを検討した。TRIM28 に関しては、結果で明らかになった Tgfb3 遺伝子座との会合等を明らかにするため、相田将俊博士 (京都大学医学研究科)、生田宏一博士 (京都大学ウイルス研究所) および縣保年博士 (京都大学医学研究科) らの助言により、クロマチン免疫沈降法を行った。

4. 研究成果

1) ITAG1 マウスの解析

T 細胞特異的 ITAG1 ノックアウトマウス (以下 ITAG1KO) を作成し、表現型解析を行った。ITAG1KO では、胸腺細胞の分化はおおむね正常に起こり、また、TCR 刺激に対する末梢 T 細胞の増殖反応等は正常であった。試験管内で活性化させた CD8 陽性細胞においては、キ

ラー細胞のエフェクター分子である Granzyme B の発現が野生型よりわずかに減弱していたが、それ以外に大きな表現型は見られていない。ITAG1 は、転写 corepressor のファミリーに属し、同じファミリーに属する因子が KO マウスにおけるこの分子の欠損を補っている可能性がある。

2) ITAG1 および TRIM28 の会合分子

T 細胞分化に必須の因子である、T-bet, GATA-3, rorc, Bcl6, Blimp, c-myc, KLF2, FoxO1, FoxO3 をクローニングし、ITAG1 または TRIM28 との会合を検討した。結果、ITAG-1 と GATA-3 の間に強い会合が見られた。また、ITAG1 は、クロマチン制御因子である rcor1 および LSD-1 と会合することを見出した。これは、ITAG1 が GATA-3 を含む、転写因子複合体に含まれることを示唆する。しかしながら、KO マウスの表現型は軽微であり、今後の検討が必要である。

TRIM28 は、c-myc および KLF-2 と会合することを見出した。これらは IL-2 の発現や T 細胞のエネルギー代謝、増殖反応などに必須である因子で、TRIM28 の今後の機能解析に役立つと考えられた。

3) TRIM28 の自己寛容における機能

T 細胞特異的 TRIM28 ノックアウトマウス (以後、CKO) を新規に作成してこの表現型を解析した。CKO マウスでは幼少期の T 細胞減少症が見られ、この T 細胞は、TCR 刺激下での IL-2 産生、および増殖反応の低下を示した。CKO マウスを病原体のいない環境で飼育すると、徐々に活性化/メモリー様の T 細胞が増加し、脾臓およびリンパ節の腫大を呈するようになった。増加した T 細胞は、野生型マウスに見られる IL-4 やインターフェロン- γ は産生せず、炎症性サイトカインである IL-17 を産生すること、つまり、多くの自己免疫に関わると考えられる、17 型ヘルパー T 細胞 (TH-17) への分化を起こす事がわかった。また、このマウスではナイーブ T 細胞から FoxP3 陽性 T 細胞への異常な分化誘導がみられた。さらに長期間の観察において、CKO マウスは多くの臓器に炎症性細胞浸潤を起こし、早期に死亡することがわかった。CKO に見られる自己免疫は、IL-2 の投与によって回復しないことから、CKO マウスは当初考えていた IL-2 の産生不全だけでは説明できない自己免疫性素因を持つことが考えられた。

そこで、CKO マウスの T 細胞では、自己免疫を規定するような因子発現の脱抑制が

起こっていると仮定した。マイクロアレイ解析を行うと、CKO マウスの T 細胞では、普段は T 細胞で転写抑制されているさまざまな遺伝子の脱抑制が見られた。これら遺伝子の中で免疫関連遺伝子を精査した結果、野生型マウス由来 T 細胞では抑制されている TGF β 3 遺伝子の強い発現が起こっている事がわかった。クロマチン免疫沈降法による解析により、TRIM28 が TGF β 3 遺伝子のエクソン 1 に会合し、その周囲のヒストンを脱アセチル化し、この転写を抑制していることがわかった。TGF β 遺伝子は、TH-1 や TH-2 の分化を負に制御する一方、FoxP3 陽性細胞や、TH-17 の分化を起すことがわかっている。実際、TH-17 が関わる実験的脳脊髄炎において TGF β を抗体により阻害すると、CKO マウスに見られる TH-17 や FoxP3 細胞の増加をブロックし、病態の改善が起こることを見出した。結論として、TRIM28 が、免疫恒常性の維持に必須なサイトカインバランスを、クロマチン制御によって精密に調節し、T 細胞恒常性を保つことが明らかになった。

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 3 件)

Qin H, Suzuki K, Nakata M, Chikuma S, Izumi N, Huong LT, Maruya M, Fagarasan S, Busslinger M, Honjo T, Nagaoka H. Plos One 6: e29141, 2011.
<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0029141>

Chikuma S, Suita N, Okazaki IM, Shibayama S, Honjo T. Nat. Immunol. 13: 596-603, 2012.
doi: 10.1038/ni.2293

Hara-Chikuma M, Chikuma S, Sugiyama Y, Kabashima K, Verkman AS, Inoue S, Miyachi Y. J. Exp. Med. 209: 1743-52, 2012.
<http://jem.rupress.org/content/209/10/1743.long>

[学会発表] (計 7 件)

竹馬 俊介「抗 PD-1 抗体によるがん治療法」日台癌のトランスレーショナル研究シンポジウム、神戸 2012 年 11 月 21 日。

竹馬 俊介 北海道大学獣医学部 学術交流資金群講演会「自己免疫疾患研究の最先端」札幌 2012 年 11 月 1 日。

など

[図書] (計 1 件)

竹馬 俊介 「TRIM28 と自己免疫応答」医学のあゆみ 245: 665-666, 2013

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

京都大学プレスリリース

「クロマチン制御因子 TRIM28 は、T 細胞性自己免疫疾患を抑制する」
http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news6/2012/120430_1.htm

6. 研究組織 (1) 研究代表者

竹馬 俊介 (CHIKUMA SHUNSUKE)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号: 50437208

(2)研究分担者

該当なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者

該当なし ()

研究者番号：