

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591649

研究課題名(和文) 制御性T細胞サブセットによる皮膚免疫制御

研究課題名(英文) Regulation of skin immunity by regulatory T cell-subset

研究代表者

野村 尚史 (Nomura, Takashi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・その他

研究者番号：60346054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー性皮膚炎・乾癬・自己免疫疾患の病態はまだ完全に解明されていないが、その一因は免疫系の暴走が原因である。このような免疫系の過剰反応を抑える特殊なリンパ球が制御性T細胞である。本研究では、Helios発現細胞に蛍光タンパクを発現させたHeliosレポーターマウスを作製し、Heliosを発現する制御性T細胞を生きた状態で解析した。その結果、Heliosを発現する制御性T細胞は強い免疫抑制活性を有することがわかった。Heliosレポーターマウスは、過剰な免疫反応を効率的に抑制する方法の開発や、アレルギー疾患・自己免疫疾患の治療開発にも応用できる。

研究成果の概要(英文)：Although etiology of atopic dermatitis, psoriasis, and collagen diseases is not fully clarified, it is partly explained by excessively activated immune system. Such over-activation is inhibited by special lymphocytes called regulatory T cells. In this project, we developed Helios-reporter mice, in which Helios-expressing cells expressed fluorescent proteins; and we analyzed live regulatory T cells expressing Helios. Our study revealed that Helios-expressing regulatory T cells possessed a strong suppressive activity. Helios-reporter mice are applicable for developing measures to restrain excessive immune responses or to treat allergic and autoimmune diseases.

研究分野：皮膚科学・免疫学

キーワード：皮膚免疫学 免疫制御 アレルギー 免疫寛容

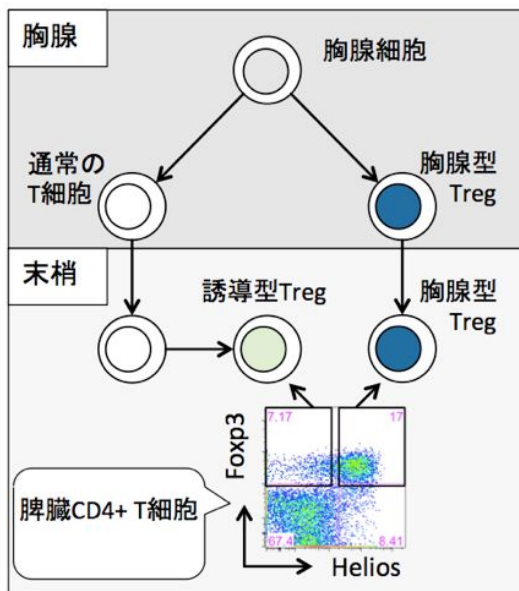
1. 研究開始当初の背景

開始当時、免疫反応を抑制する Foxp3<+>制御性 T 細胞 (以下、Treg) は、少なくとも、胸腺由来の胸腺型と末梢リンパ組織に由来する末梢誘導型の二つのサブセットがあるとされていた。しかし細胞表面分子で区別できないため、簡便な解析方法がなく、各サブセットを生かした状態で分離したり解析したりすることはできなかった。

Treg の分類		
	胸腺型	末梢誘導型
分化する部位	胸腺	末梢組織
Foxp3 発現	あり	あり
表面マーカー	区別できない	

一方、申請者は、以前の研究で、胸腺内に存在する胸腺型 Treg が転写因子 Helios を発現することを RT-PCR で明らかにしていた。実際 Helios 抗体で染色すると、胸腺内 Treg はすべて Helios を発現していた。

また、無免疫動物の脾臓 CD4+T 細胞を Foxp3 と Helios で染色すると、Treg の大部分は Helios 陽性だが、一部 Helios 陰性が含まれていた。



さらに試験管内で、通常の T 細胞から TGF- $\beta$  で誘導した Foxp3 陽性細胞は、Helios を発現しなかった。

以上の知見から、末梢誘導型 Treg は Helios を発現しない集団に含まれるのではないかと仮説をたてた。またこの仮説が誤りだとしても、Helios を発現する集団としない集団の違いを明らかにすることは、一般的に Treg と呼称される T 細胞サブセットの機能を明らかにする上で有用と考えた。

2. 研究の目的

(1) Helios 陽性 (以下、<+>) Treg を生かした状態で分離し、その機能を解析すること。

(2) またこの目的を達成するために、Helios の発現を、細胞が生きた状態で検出できるマウスを作出すること。

3. 研究の方法

(1) Helios レポーターマウスの作出

大腸菌染色体工学を用いて、マウス Helios 遺伝子座に蛍光タンパク Venus の cDNA を組み込んだ。改変した遺伝子座と G418 耐性遺伝子を含む DNA を、マウス ES 細胞にエレクトロポレーションで注入し、遺伝子改変体を G418 で選別した。サザンブロット法で組換え体の遺伝子構造を解析した結果、目的の組換え体 ES 細胞を得た。このようにして得た組換え体 ES 細胞をマウス受精卵に注入し、キメラマウスを作出した。キメラマウスの末梢血を解析し、Venus の発現率が高い個体を C57BL/6 と交配し、産仔を得、遺伝子組換えマウスをゲノム PCR で選別した。組換えマウスは C57BL/6 に少なくとも 8 回以上戻し交配した。

(2) Helios 発現細胞の機能解析

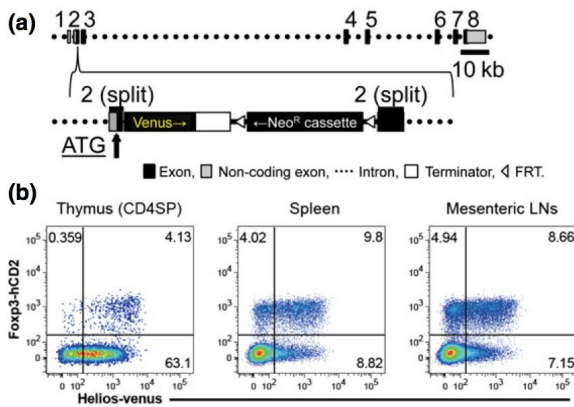
DNFB で遅延性皮膚炎（接触過敏反応、CHS）を惹起するマウスの実験系を利用した。CHS を誘導したマウスの皮膚・所属リンパ節から T 細胞を回収し、その免疫抑制活性を *in vitro* で解析した。

4. 研究成果

(1) Helios レポーターマウスの作出

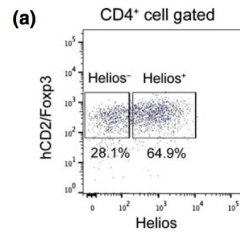
マウス Helios 遺伝子第 2 エクソンに Venus 遺伝子 cDNA を挿入し（下図 a）、Helios レポーターマウスを作出した。作出したマウスに、Foxp3<sup>+</sup>細胞が細胞表面分子ヒト CD2 を発現する Foxp3/hCD2 と交配した。

このマウスを用いて生きた Treg を Foxp3/hCD2 と Helios/Venus で区別して可視化することに成功した（下図 b）。



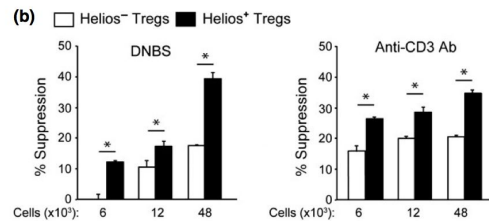
(2) 皮膚炎に浸潤する Treg 分画の分取：

DNFB で遅延性皮膚炎（接触過敏反応、CHS）を惹起した皮膚・所属リンパ節から T 細胞を回収し、自動細胞分取装置で生きた状態で選別した（下図 a）。



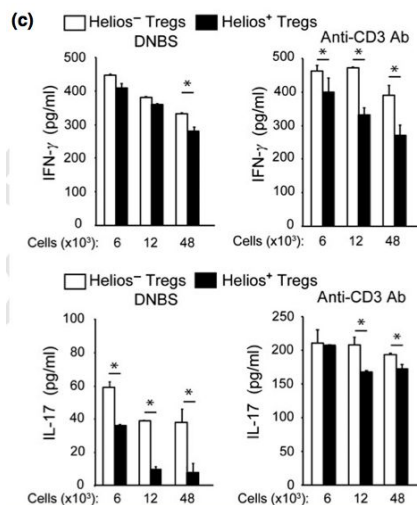
(3) Helios<sup>+</sup>/Helios<sup>-</sup>分画の T 細胞増殖抑制活性の比較（*in vitro*）：

CHS に用いた脂溶性ハプテン DNFB と同じ抗原性の水溶性ハプテン DNBS を培養液に加え、各 Treg 分画の免疫抑制活性（共存する通常 T 細胞の増殖を抑制する度合い）を *in vitro* で比較したところ、Helios<sup>+</sup>Treg が効率的に細胞増殖を抑制した（下図 b 左）。一方抗原非特異的に Treg を刺激してもやや効率は低いながらも Helios<sup>+</sup>Treg の抑制活性が優った（下図 b 右）。この結果から、Helios<sup>+</sup>Treg 集団は、単に抑制活性が高いだけでなく、CHS に用いた抗原に特異的なクローンを多く含むことがわかった。



(4) Helios<sup>+</sup>/Helios<sup>-</sup>分画のサイトカイン産生抑制活性の比較 (in vitro)

上の実験と同様の条件で、共存する通常T細胞のサイトカイン産生を抑制する能力について評価した(下図c)。抗原特異的の刺激ではIFN- $\gamma$ 産生に分画間の差はなかったが(下図c左上) IL-17産生はHelios<sup>+</sup>Tregによる抑制効率が大きく優っていた(下図c左下)。抗原非特異的の刺激(anti-CD3)では、このようなサイトカイン別の差は顕著でないが、やはり抑制活性はHelios<sup>+</sup>Tregで優っていた(下図c右上下)。



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)

Sugita K., Hanakawa S., Honda T., Kondoh G., Miyachi Y., Kabashima K., Nomura T. Generation of Helios reporter mice and an evaluation of the suppressive capacity of Helios<sup>+</sup> regulatory T cells in vitro.

*Experimental Dermatology*. 2015.

DOI:10.1111/exd.12711. Ahead of print.

Nomura T., Katoh M., Yamamoto Y., Kabashima K., Miyachi Y.

Eosinophilic pustular folliculitis: The transition in sex differences and interracial characteristics between 1965 and 2013.

*The Journal of Dermatology*. Vol. 42, pp. 343-352. 2015.

DOI:10.1111/1346-8138.12783

Nomura T., Kabashima K., Miyachi Y.

The panoply of abT cells in the skin.

*Journal of Dermatological Science*. Vol. 76, pp. 3-9. 2014.

DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2014.07.010

[学会発表](計 3 件)

Nomura T., Kabashima K., Miyachi Y. Visualization of Helios-expressing T cells in the skin.

The American Association of Immunologists Annual Meeting. 2012/5/4-2012/5/8. Boston, U.S.A.

Nomura T., Hayatsu N., Sugita K., Kabashima K., Miyachi Y. Stimulation with anti-CD3/CD28 beads and TGF- $\beta$  in the non-inflammatory milieu converts CD4<sup>+</sup> T cells into Helios<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells.

The Japanese Society for Investigative Dermatology Annual Meeting. 2012/12/7-2012/12/9. Okinawa, Japan

Nomura T., Sugita K., Hayatsu N., Kitoh A., Miyachi Y., Kabashima K.

TGF- $\beta$  under non-inflammatory cytokine milieu converts naïve CD4<sup>+</sup> T cells into thymic-type Helios<sup>+</sup> regulatory T cells.

International Investigative Dermatology Edinburgh 2013. 2013/5/8-2013/5/11. Edinburgh, U.K.

[図書](計 0 件)

[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:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

研究者番号 60346054

野村尚史（ノムラ タカシ）

機関番号 14301

研究機関名 京都大学

研究種目名 基盤研究（C）

補助事業期間 平成 24 年度～平成 26 年度

課題番号 24591649

研究課題名 制御性 T 細胞サブセットによる  
皮膚免疫制御