

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26713019

研究課題名(和文) 機能的な制御性T細胞のin vitro創出を目指したCD4T細胞分化機構の研究

研究課題名(英文) Molecular mechanisms for CD4 T cell differentiation, aiming at generation of functional Treg cells

研究代表者

関谷 高史 (Sekiya, Takashi)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・室長

研究者番号：80519207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,300,000円

研究成果の概要(和文)：まず、Tregの前駆細胞を複数のステージに分類し、それぞれのステージにある細胞を解析した結果、Nr4aにより担われる分子イベント、担われないイベントそれぞれを明らかとし、Nr4aはTreg分化過程で、中期から後期にかけて重要な機能を担っていることを明らかとした。また、Nr4aにより発現誘導されたFoxp3は、今度はNr4aの発現を正に制御すること、つまり両分子間でポジティブフィードバック的相互作用が存在することを明らかとした。さらに、Nr4aを欠損したTreg前駆細胞は、Treg分化を完了できないのみならず、アポトーシスの減弱により生存し、自己攻撃性のヘルパーT細胞に転換することを突き止めた。

研究成果の概要(英文)：By classifying Treg precursor cells according to their developmental stages, we revealed Treg cell developmental programs which are dependent on Nr4a factors, as well as programs that are independent of Nr4a factors. In the analysis, we further elucidated that Nr4a factors act at relatively later stages in Treg cell development. Foxp3, that were induced by Nr4a factors then found to induce Nr4a factors, thus forming a positive feedback loop, sustaining Treg cell development. Furthermore, Nr4a-deficient Treg precursor cells not only complete their development to Treg cells, but they survive with an attenuated expression of apoptotic factors including Bim, thus converting to helper-T like cells with elevated expression of inflammatory cytokines that are usually not to be expressed by Treg cells but by helper T cells.

研究分野：免疫学

キーワード：CD4T細胞 免疫寛容 制御性T細胞 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

免疫システムは多種多様な病原体の排除に機能する一方、自己抗原に対しては抑制的に機能しなければならない。その制御された免疫応答の根幹を担うのが、胸腺における CD4⁺T 細胞の適切な発生分化である。CD4⁺T 細胞は胸腺で、Tnaive もしくは Treg いずれかの形で前駆細胞から発生分化する。しかし、この分化はランダムに起こるものではなく、発生過程で提示される自己抗原に対する親和性に大きく依存する (図 1A)。

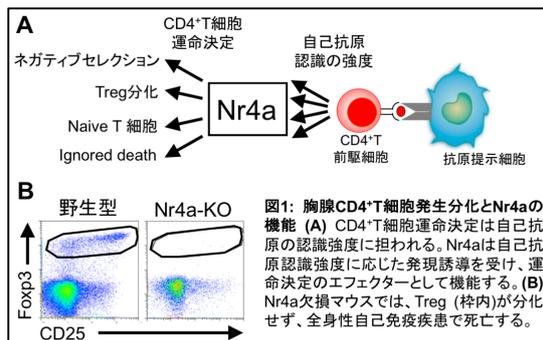


図1: 胸腺CD4⁺T細胞発生分化とNr4aの機能 (A) CD4⁺T細胞運命決定は自己抗原の認識強度に担われる。Nr4aは自己抗原認識強度に応じた発現誘導を受け、運命決定のエフェクターとして機能する。(B) Nr4a欠損マウスでは、Treg (枠内)が分化せず、全身性自己免疫疾患で死亡する。

まず、提示された自己抗原に対し強く反応する細胞にはネガティブセレクションと呼ばれる細胞死が誘導される。次に、自己抗原に対し強めの親和性を示す細胞が Treg への分化誘導を受ける。これらの細胞よりも弱く自己抗原を認識する細胞が Tnaive となる。また、自己抗原に対し全く親和性を示さない細胞にも、ignored death と呼ばれる細胞死が誘導される。このように、自己反応性の CD4⁺T 細胞クローンには細胞死による排除、もしくは Treg 分化が誘導されることにより、自己細胞や自己組織に対する免疫反応が防がれている。申請者は先行研究で、核内受容体スーパーファミリーに属する転写因子・Nr4a が、自己抗原に対する親和性に応じた CD4⁺T 細胞運命決定において主要な役割を担っていることを見出してきた (図 1A,B)。しかし一方でその詳細な分子機構は多くが未解明であった。特に、Treg 分化イベントの中で、Nr4a 依存的なもの、非依存的なもの、それぞれの同定がされおらず、Nr4a により誘導された Treg 様細胞は、Treg 細胞としての機能を完全には示していなかった。

2. 研究の目的

免疫システムは多種多様な病原体の排除に機能する一方、自己抗原に対しては抑制的に機能しなければならない。その制御された免疫応答の根幹を担うのが、胸腺における CD4⁺T 細胞の適切な発生分化である。申請者は先行研究で、転写因子 Nr4a が CD4⁺T 細胞の分化制御において必須の役割を担っていることを見出してきた。本研究では、胸腺における CD4⁺T 細胞の発生分化を制御する分子機構を Nr4a に焦点を当て解析し、免疫系の恒常性が形作られる仕組みや自己免疫疾患の発症機序を解明する。特に、Nr4a による CD4⁺T 細胞運命決定の分子機構を、①多段階で進行し、多数の遺伝子が発現制御を受ける Treg 分化プログラムのうち、どの部分が Nr4a に担われるか? ②Nr4a の活性強度が中程度の時は Treg が誘導され、強度の時はネガティブセレクションが誘導されるが、それぞれにおける転写標的遺伝子は何か? ③Nr4a と共役し機能する因子は何か? という、主に 3 つの疑問点を中心に解明を試みる。これらの研究により、'自己抗原に対する親和性がどのような分子機構で CD4⁺T 細胞の運命決定を引き起こすか' という、免疫システムの恒常性を理解する上での重要な疑問点に答えを与え、ひいては自己免疫疾患発症機序の解明に手掛かりを与えることを目的とする。さらに解析結果の応用により、機能的な Treg の in vitro での創出法を提案し、自己免疫疾患の新規治療法の開発に貢献することを目的とする。

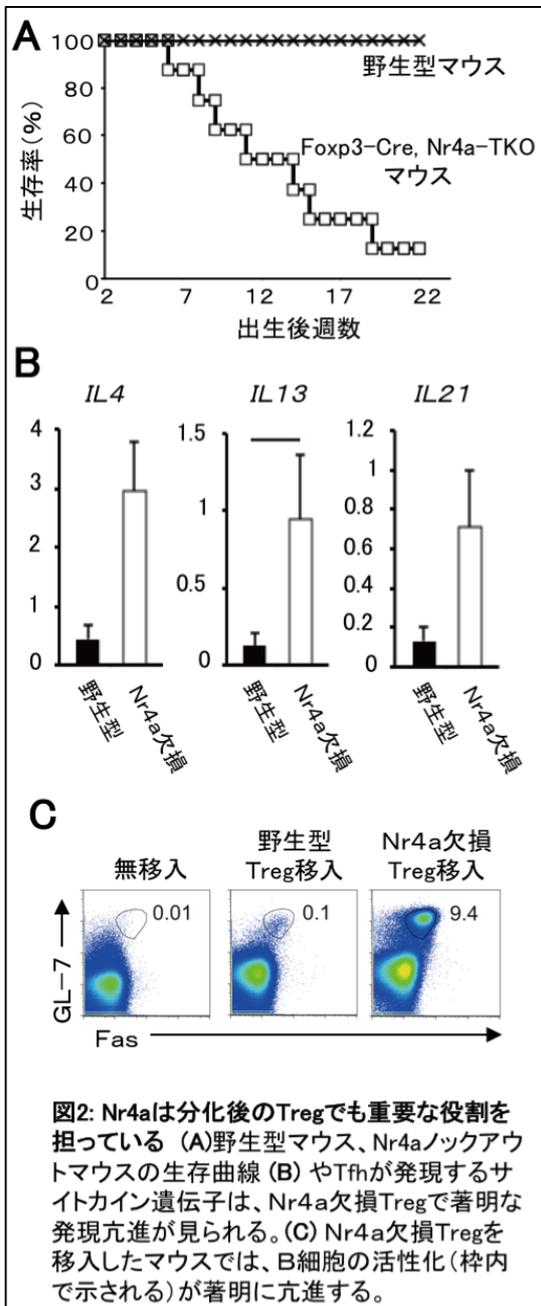
3. 研究の方法

本研究では、'Treg 分化が Nr4a 発現誘導の直前で止まった前駆細胞'を遺伝学的手法で捉えることで、Treg 分化における Nr4a 依存的および非依存的分子イベントの網羅的解析を行った。さらに、本研究では Nr4a 共役因子の探索を行った。因子の同定に留まらず、転写活性化型複合体と不活性化型複合体を明確に区別し、それぞれの Treg 分化における機能も解析した。以上の研究を手掛かりとして見出された候補因子の中から、Nr4a との共発現により Treg と同様の遺伝子発現パターンや抑制能を誘導する遺伝子セットを同定し、機能的な Treg の in vitro

での創出を試みた。

4. 研究成果

まず、Nr4a が分化後の Treg でも高い発現量を維持していることに着目し、分化後の Treg 特異的に全ての Nr4a ファミリー分子・Nr4a1, Nr4a2, Nr4a3 を欠損させたマウス(Foxp3-Cre, Nr4a-TKO マウス)を作製し、解析を行った。その結果、このマウスは全身性の自己免疫疾患を発症することが確認されたため、Nr4a は分化後の Treg でも重要な役割を担っていることが明らかとなった。その結果、Foxp3-Cre, Nr4a-TKO マウスは多臓器性の自己免疫疾患を発症し、大部分



のマウスが生後4ヶ月以内に死亡することを見出した (図 2A)。

この結果から、Nr4a は Treg でも重要な機能を持っていることを明らかとした。次に、Foxp3-Cre, Nr4a-TKO マウスの血清を解析したところ、このマウスでは抗体産生が著明に亢進していることを明らかとした。自己分子を認識する抗体の産生も確認され、特に、IgE タイプの抗体産生の亢進が著明に見られたため、このマウスでは Th2 や Tfh タイプのヘルパーT細胞が活性化していることが強く示唆され。次に、Foxp3-Cre-Nr4a-TKO マウスから Treg 細胞を分離取得し、遺伝子発現解析を行ったところ、Nr4a を欠損した Treg では、Foxp3 を始めとした、Treg で重要な役割を担う遺伝子の大部分の発現が低下していることを見出した。一方で、この細胞では IL-4 や IL-13 のような、Th2 タイプのヘルパーT細胞が産生するサイトカイン遺伝子や、IL-21 のような、Tfh タイプのヘルパーT細胞が産生するサイトカイン遺伝子の発現が亢進していることを見出した (図 2B)。これらの結果から、Nr4a を欠損した Treg は、Treg としての性質を失う一方、Th2 や Tfh タイプのヘルパーT細胞の機能を持つ細胞に変換することを、遺伝子発現のレベルで証明した。

次に、Foxp3-Cre-Nr4a-TKO マウスから分離取得した Treg を、T細胞を持たないマウスに移入することで、Nr4a を欠損した Treg の機能を生体内で解析した。その結果、Nr4a を欠損した Treg を移入したマウスでは、B細胞の著明な活性化が確認された (図 2C)。さらにこのマウスでは IgE タイプの抗体産生や、肺気道細胞からの粘液産生の著明な亢進がみられ、喘息様の症状が引き起こされていることを確認した。

以上の研究により、Nr4a は Treg の性質を維持する重要な分子であり、Nr4a を欠損した Treg は Treg としての性質を失うだけでなく、Th2 や Tfh タイプのヘルパーT細胞の機能を持つ細胞に変換し、免疫システムを異常な活性化に導くことを明らかとした。

次に、Treg が分化する過程の前駆細胞を、複数のステージに分類し、それぞれのステージにある細胞の詳細な解析を行った結果、Nr4a により担われる分子イベント、担われないイベントそれぞれを明らかとし、Nr4a は Treg 分化において、中期から後期にかけて重要な機能を担っていることを明らかとした。さらに、Nr4a はその中期から後期にかけての分化段階で、IL-2/CD25 や TNFSF/TNFRSF といった、Treg 分化で重要とされてきたシグナル伝達経路と協調的に作用し、Treg の主要転写因子「Foxp3」の発現を促進する機能を持つことを明らかとした。また、Nr4a により発現誘導された Foxp3 は、今度は Nr4a の発現を正に制御すること、つまり両分子間でポジティブフィードバック的相互作用が存在することを明らかとした。さらに、Nr4a を欠損した Treg 前駆細胞は、Treg 分化を完了できないのみならず、アポトーシスの減弱により生存し、自己攻撃性のヘルパーT 細胞に転換することを突き止めた。以上の研究成果の前半部を論文発表し (Sekiya et al., *JEM*, 2015), 後半部も論文投稿後、現在査読中である。

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 2 件)

1. *Takashi Sekiya, Hiroko Nakatsukasa, Qignjin Lu, *Akihiko Yoshimura
Roles of transcription factors and epigenetic modifications in differentiation and maintenance of regulatory T cells
Microbes and Infection 2016 18: 378-386 (*: co-corresponding authors)

2. *Takashi Sekiya, Taisuke Kondo, Takashi Shichita, Rimpei Morita, Hiroshi Ichinose, *Akihiko Yoshimura.
Suppression of Th2 and Tfh immune reactions by Nr4a receptors in mature Treg cells.
J. Exp. Med. 2015 212: 1623-1640 (*: co-corresponding authors)

[学会発表] (計 2 件)

1. Takashi Sekiya and Akihiko Yoshimura
Nr4a receptors promote completion of Treg cell developmental program and prevent conversion of labile Treg precursors into pathogenic cells
16th International Congress of Immunology, Melbourne, Australia, Aug 2016

2. Takashi Sekiya

Roles of the nuclear orphan receptor Nr4a in CD4⁺ T cell development and functions.
AAI Annual meeting, Pittsburgh, USA, May 2014

[図書] (計 1 件)

1. Takashi Sekiya, Akihiko Yoshimura
In Vitro Th Differentiation Protocol.
Methods in Molecular Biology 2015
1344: 183-191

[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

6. 研究組織
(1) 研究代表者
関谷 高史 (Sekiya, Takashi)
国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・室長
研究者番号：80519207

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()