

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860331

研究課題名(和文) 制御性T細胞と自己反応性T細胞による自己免疫疾患発症機序の解明

研究課題名(英文) Elucidating the mechanism of autoimmune induction by self-reactive T and regulatory T cells

研究代表者

田中 淳(Tanaka, Atsushi)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教(常勤)

研究者番号：00724105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、制御性T細胞と自己反応性T細胞による自己免疫疾患の発症機序の分子基盤を明らかにするため、ZAP-70分子の量的・質的な変化により、T細胞受容体シグナルの強弱を段階的に制御できるマウスモデルを複数系統用い、制御性T細胞と自己反応性T細胞の産生やT細胞受容体レパトアの偏倚、および末梢での抑制・活性化機能を解析した。これらのマウス系統の連続的な解析から、その共通した結果として、T細胞シグナル機能を一定のレベルまで減弱すると自己免疫病を自然発症する、自己免疫惹起性T細胞シグナル領域が存在すると示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research is to elucidate the molecular mechanism of the induction of autoimmunity as a disequilibrium of regulatory T cells and self-reactive T cells. For this aim, we have developed mice with varying structural alterations of ZAP-70 or quantitative changes in ZAP-70 expression levels to control T-cell receptor signaling levels. In these mice, we have analyzed the development of regulatory T cells and self-reactive T cells as well as their changes in TCR repertoires. We have also analyzed cellular functions of respective subsets in the periphery. Our analyses on these mice have suggested that there is a critical range of TCR signaling leading to spontaneous induction of autoimmunity.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫自己寛容 自己免疫疾患

1. 研究開始当初の背景

慢性関節リウマチの惹起および炎症維持には T 細胞が重要と考えられているが、それがどのように産生され、自己免疫性関節炎を惹起するかに関して不明なところが多い。近年、ゲノムワイド関連解析により自己免疫疾患と最も関連性の高い遺伝的要因は、MHC や PTPN22 の遺伝子多型であることが明らかになったが、これらの遺伝子は T 細胞レセプター (T Cell Receptor、以下 TCR と略) シグナルあるいはその制御に重要な分子である。したがって、TCR シグナル分子の異常は、自己免疫疾患の発症機序の解明に重要と考えられる。TCR シグナル分子の変異が原因の疾患モデルとして、ヒト慢性関節リウマチに酷似した T 細胞依存性関節炎を自然発症する SKG マウスが確立されている。SKG マウスは T 細胞に特異的なシグナル分子である ZAP-70 の遺伝子変異が原因であり、通常的环境下 (Non-SPF) では生後 2 ヶ月頃から関節炎を発症し 6 ヶ月以内に全てのマウスが発症する。また、SKG マウスは SPF 環境下では関節炎を自然発症しないが、SKG マウスに Zymosan (酵母の細胞壁粗画分) などを投与、または SKG マウスの CD4⁺ T 細胞を RAG 欠損マウスに移入することによって、関節炎を発症する。したがって、SKG マウスでは、ZAP-70 遺伝子変異に加え、真菌やバクテリアによる自然免疫の刺激や、CD4⁺ T 細胞によるホメオスタティック増殖などが関節炎惹起に関与していると考えられる。これら関節炎を惹起する要因として、ZAP-70 分子の SKG 変異により胸腺での自己反応性 T 細胞の除去が妨げられ、さらに制御性 T 細胞の産生が減少していることが考えられる。制御性 T 細胞と、自己反応性 T 細胞の除去 (負の選択) は、自己抗原に対して不応答となる免疫自己寛容の中樞を担っており、自己免疫反応・疾患の阻止に不可欠である。また、この SKG 変異によって産生される自己反応性 T 細胞は、末梢で Th17 細胞に分化し、IL-17 などの炎症性サイトカインを産生し、関節炎惹起に関与している。ZAP-70 遺伝子の変異はこれまでに多数報告されているが、その殆どが重度の T 細胞欠損であり、SKG 変異以外で自己免疫性関節炎を発症した例はない。

2. 研究の目的

制御性 T 細胞と自己反応性 T 細胞の不均衡による自己免疫疾患の発症機序とその分子基盤の解明を目的とする。本研究では、TCR シグナルを段階的に制御するマウス系統を用い、TCR シグナルの減弱と自己免疫病の発症機序の明らかにする。特に、自己免疫性関節炎の自然発症につながる TCR シグナルの減弱レベルを検証し、T 細胞性関節炎の要因である自己反応性 T 細胞と制御性 T 細胞の産生や TCR レパトア偏倚、および末梢での活性・抑制能を解析する。これらの解析には、Tet-on ZAP-70 マウスと ZAP-70 遺伝子変異ノック

インマウスの 2 種の系を用いて、TCR シグナルを定量的あるいは質的に変化させ、T 細胞性自己免疫病の疾患発症頻度、および遺伝的変異の浸透度などを解析し、TCR シグナルの減弱と特定の自己免疫病の発症感受性との関係、さらに多様な自己免疫疾患へと至る共通原理の解明を目標とする。また、これらの実験系では、ZAP-70 の発現量、構造変異の程度に応じて、免疫不全と自己免疫病を同じスペクトラム上の疾患として誘導できるため、ヒトに見られる ZAP-70 遺伝子変異による複合型免疫不全から自己免疫病まで、T 細胞シグナルの面から総括的な理解を進め、遺伝的変異から疾患の表現型を予測できる原理を探索する。

3. 研究の方法

本研究では、複数系統の ZAP-70 変異ノックインマウスと Tet-on ZAP-70 トランスジェニックマウスを用い、ZAP-70 の量的・質的变化を段階的に行い比較解析することによって、自己反応性 T 細胞および制御性 T 細胞の産生や、末梢での抑制能・活性化機能など、それぞれのパラメーターがどのように変化し、自己免疫疾患の臓器特異性、疾患発症頻度などの疾患感受性、および表現系環境因子依存性など、遺伝的変異の浸透度と自己免疫発症の決定機構について解析を行う。ZAP-70 の単一遺伝子の変異により TCR シグナルを連続的に変化させる系であるため、自己免疫疾患の原因となる細胞群の産生、疾患惹起、炎症維持を連続して解析し、それらの臓器特異性、疾患惹起条件などの発症感受性を検証する。

4. 研究成果

本研究では、制御性 T 細胞と自己反応性 T 細胞による自己免疫疾患の発症機序とその分子基盤を明らかにするため、TCR シグナルに不可欠な ZAP-70 分子の機能あるいは発現を段階的に調整できるマウスモデルを確立した。まず、SKG 変異がどのようにして自己免疫性関節炎を特異的に惹起するかを明らかにするために、SKG 変異による ZAP-70 分子のアミノ酸変異と構造変異の *In silico* 解析や生化学解析の結果を基に、ZAP-70 と TCR:CD3 鎖の結合度が様々な程度に低下する点突然変異 ZAP-70 遺伝子ノックインマウスを複数作製した。これらのマウスでは、その内の一系統が、SPF 環境下で関節炎と腸炎を自然発症し、自己免疫疾患を自然発症する TCR シグナルの減弱レベルを同定した。また、第二の系では、正常な ZAP-70 分子の発現レベルを Doxycycline 投与量により制御する Tet-on ZAP-70 トランスジェニックシステムを用い、ZAP-70 低発現域で関節炎、腸炎、皮膚炎を含む様々な自己免疫疾患を SPF 環境下で自然発症する。Tet-on ZAP-70 システムは、正常 ZAP-70 の発現を制御するために、ヒト CD2 プロモーター下に rtTA (Reverse tetracycline transactivator) を発現するト

ランスジェニックマウス、および TRE (tetracycline response element)/CMV promoter、Human ZAP-70 遺伝子、EGFP 遺伝子を発現するランスジェニックマウスと、ZAP-70 KO マウスを掛け合わせ、内在性 ZAP-70 を発現せず、Doxycycline 濃度により全 ZAP-70 発現量が調整可能なマウスモデルである。これらの、ZAP-70 分子を量的・質的に変化させるマウス系統において、自己免疫性関節炎を自然発症したマウスでは、共通して、自己反応性 T 細胞の産生が増加し、制御性 T 細胞の産生が減少した。さらに、ZAP-70 分子の量的・質的变化により自己免疫疾患を自然発症する T 細胞シグナル領域、また、それに伴う胸腺での制御性 T 細胞と自己反応性 T 細胞の産生や TCR レパトアの偏倚、および末梢での抑制・活性化機能を連続的に解析し、自己免疫性関節炎をはじめとした T 細胞性自己免疫疾患の発症頻度、疾患感受性、遺伝的浸透度の関係を解析した。さらに、これらの ZAP-70 変異ノックインマウスや Tet-on ZAP-70 トランスジェニックマウスを、TCR トランスジェニックマウス、および TCR 認識抗原トランスジェニックマウスと交配し、抗原刺激によるシグナルを均一化したマウスにおいて、制御性 T 細胞と自己反応性 T 細胞産生について比較解析を行い、両者の産生には TCR シグナル減弱に対する感受性の差異が認められた。制御性 T 細胞と通常 T 細胞は、T 細胞シグナル減弱に対し、異なった感受性を持つことが明らかになり、その分子的機序について解析を進めた。

本研究では、ZAP-70 分子を量的・質的に変化させる複数のマウス系統の連続的な解析により、その共通した結果として、ZAP-70 の親和性減弱、あるいは発現量低下により、その減弱レベルと相関して、マウスの免疫学的状態は、正常 T 細胞の産生から、自己免疫病の惹起、免疫不全状態という 3 つの状態に誘導されることを示した。この結果は、T 細胞シグナル機能を、一定のレベルに減弱すると自己免疫病を自然発症する自己免疫惹起性 T 細胞シグナル領域が存在すると示唆する。また、これらの結果は、TCR シグナル分子の変異から、自己免疫疾患感受性および遺伝的浸透度を予測できる可能性を示唆している。

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 7 件)

Tanaka, A., and Sakaguchi, S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Res.* 2017, Jan;27(1):109-118. 査読有

田中淳、坂口志文、「Treg は本当にがん免疫療法に役立つのか?」『腫瘍内科』、19 (1): 41-46、2017、査読無

Okubo, K., Wada, H., Tanaka, A., Eguchi, E., Hamaguchi, M., Tomokuni, A., Tomimaru, Y., Asaoka, T., Hama, N., Kawamoto, K., Kobayashi, S., Marubashi, S., Nagano, H., Sakaguchi, N., Nishikawa, H., Doki, Y., Mori, M., Sakaguchi, S. Identification of novel and noninvasive biomarkers of acute cellular rejection after liver transplantation by protein microarray. *Transplantation Direct.* 2016, Nov 18;2(12):e118. 査読有

田中淳、坂口志文、「制御性 T 細胞の同定とその役割」『がん分子標的治療』、2015, 13 (4); 66-70、査読無

Tanaka, A. and Sakaguchi, S. (2015) Early life Aire. *Science.* 348:506-507 (DOI: 10.1126/science.aab2998) 査読無

Levenson, J.D., Zhang, H., Chen, J., Tahir, S.K., Phillips, D.C., Xue, J., Nimmer, P., Jin, S., Smith, M., Xiao, Y., Kovar, P., Tanaka, A. et al. (2015). Potent and selective small-molecule MCL-1 inhibitors demonstrate on-target cancer cell killing activity as single agents and in combination with ABT-263 (navitoclax). *Cell Death Dis.* 6, e1590. 査読有

Ito, Y., Hashimoto, M., Hirota, K., Ohkura, N., Morikawa, H., Nishikawa, H., Tanaka, A., Furu, M., Ito, H., Fujii, T., et al. (2014). Detection of T-cell responses to a ubiquitous cellular protein in autoimmune disease. *Science.* 346, 363-368. 査読有

[学会発表](計 4 件)

田中淳、制御性 T 細胞の特異的な TCR シグナル制御とその応用、第 16 回 LEGEND Seminar 2016, 2016 年 12 月 4 日、沖縄県那覇市

Atsushi Tanaka, Selective control of regulatory T cells through TCR signaling molecule, 16th International Congress of Immunology, 2016 August 21-26, Melbourne Australia

田中淳、Selective control of regulatory T cells through TCR signaling molecule, 第 26 回 Kyoto T Cell Conference, 2016 年 5 月 21 日、滋賀県大津市

Atsushi Tanaka, Autoimmune range of T cell receptor signaling, Keystone symposia T cells: Regulation and Effector function, March 29 - April 3, 2015, Utah,

USA.

〔図書〕(計1件)

Wing, J., Tanaka, A., Sakaguchi, S. (2016). Devising novel methods to control chronic inflammation via regulatory T cells. In Chronic Inflammation: Mechanisms and Regulation, K. Takatsu & M. Miyasaka, ed. (Springer, Japan). Chapter 36 475-488

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：腫瘍免疫又は感染免疫を増強させる免疫増強剤
発明者：西川博嘉・坂口志文・田中淳
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2014-146031
出願年月日：2014年7月16日
国内外の別：国内

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
<http://exp.immunol.ifrec.osaka-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 淳 (TANAKA, Atsushi)
大阪大学免疫学フロンティア研究センター・特任助教
研究者番号：00724105

(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

()