

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860336

研究課題名(和文) CD2分子を介した制御性T細胞の生存維持と機能発現に関連する遺伝子制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of CD2-mediated gene regulatory mechanisms about function and survival in regulatory T cells

研究代表者

柏倉 裕志 (Kashiwakura, Yuji)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：40382890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：制御性T細胞(Treg)におけるCD2刺激の効果について検討した。CD2への単独刺激には、リガンドであるCD48の細胞外ドメインとマウスIgG-Fcとの融合タンパクを用いた。TregへのCD2刺激は、Tregのマスター制御因子Foxp3の発現を上昇させたが、TCR刺激よりもアポトーシス因子Bimの発現を低下させた。CD2刺激によるFoxp3発現上昇は、IL-2に部分的に依存し、TCR刺激との共刺激による相乗効果を認めた。TGF- β 存在下のナイーブT細胞におけるCD2からのPI3K/AKTとJAK/STATシグナルにより、抑制機能を有するTregが誘導されることを見出した。

研究成果の概要(英文)：We focused on the role of CD2 in regulatory T (Treg) cells. We examined whether the CD2 signaling solely affects the function and induction of Treg cells. CD48-Fc, which is composed of extra-cellular portion of murine CD48 and murine Fc, was used for CD2-stimulation. We found that CD2-stimuli up-regulated Foxp3 expression and maintained the regulatory functions in Treg cells. CD2-induced Foxp3 up-regulation was partially dependent on IL-2. It was found that CD2- and TCR-stimuli synergistically increased the Foxp3 expression in Treg cells. But, CD2-stimuli decrease Bim expression as compared with TCR-stimuli, supporting survival Treg cells. Furthermore, we found that CD2-stimuli induced Foxp3 expression in naive T cells in the presence of TGF- β . It was confirmed that PI3K/AKT and JAK/STAT signals were involved in CD2-induced Foxp3 expression in naive T cells. Importantly, the CD2-induced Treg cells exerted regulatory effects on CD8+ T cell activation.

研究分野：細胞免疫学

キーワード：制御性T細胞 CD2

1. 研究開始当初の背景

自己反応性の免疫細胞の活性化を抑制し、自己免疫応答を制御する細胞として見出された制御性 T (Treg) 細胞は、様々な生理的あるいは病的な免疫応答の制御や免疫恒常性の維持において必須であることが明らかとなっている。Treg 細胞を標的とした治療戦略は、自己免疫疾患の治療、移植における免疫寛容療法・癌免疫療法・感染症治療・妊娠期の免疫寛容療法など広範に及び、臨床応用が実現した際の医療への貢献は大きなものとなる。

近年、CD2 分子が Treg 細胞の分化と機能発現に重要な Foxp3 の標的遺伝子の一つであることが報告され、Treg 細胞における CD2 分子の役割は興味深い。また、多発性硬化症患者の Treg 細胞において、CD2 分子からの刺激による免疫制御活性が低下するとの研究成果が報告されており、CD2 分子が Treg 細胞の機能・増殖・生存維持を調節している可能性が考えられる。CD2 分子は CD28 分子と並び T 細胞活性化の補助刺激分子として重要な役割を果たす機能分子であることが明らかとなっているが、T 細胞の活性化と抑制の両面で免疫制御に関わるとされ、Treg 細胞におけるその分子機序の詳細は明らかとなっていない。

2. 研究の目的

これまでに、Treg 細胞上の CD2 分子が Treg 細胞の生存維持に重要な役割を果たしていることを見いだした。本研究では、CD2 分子の役割に着目し、Treg 細胞の生存維持あるいは機能発現における遺伝子制御機構を解明する。さらに、Treg 細胞特異的に CD2 分子を欠損したマウスを作製・解析することで、免疫恒常性維持における CD2 分子の重要性とその役割を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 細胞の分離・解析：マウス脾臓細胞から磁気細胞分離装置によって分離した CD4⁺T 細胞・CD4⁺CD25⁺Treg 細胞・CD4⁺CD25⁻CD62L⁺ナイーブ T 細胞を使用した。CD2 への単独刺激には、CD2 のリガンドである CD48 の細胞外ドメインとマウス IgG-Fc との融合タンパク CD48-Fc を用い、プラスチックプレートへの固相化により CD2 への刺激を誘導した。抗 CD3 ε 抗体のプラスチックプレートへの固相化による刺激誘導を TCR 刺激とした。刺激後の T 細胞をフローサイトメーターにより解析した。
- (2) Treg 細胞の免疫制御活性の評価：混合リンパ球反応 (Mix lymphocyte reaction: MLR) への Treg 細胞の添加時における、CFSE ラベルした反応性 CD8⁺細胞の細胞増殖の抑制レベルをフローサイトメーターにより解析した。

- (3) CD2-CK0 マウスの作製：CD2 遺伝子ターゲットベクターを作製し、ES 細胞への遺伝子導入後に薬剤選択により細胞コロニーを獲得し、PCR によるスクリーニングによって遺伝子組み換え細胞コロニーを同定した。

4. 研究成果

- (1) マウス脾臓由来 CD4⁺T 細胞について、CD48-Fc により CD2 を刺激したところ、CD48-Fc の濃度依存的に Treg 細胞のマスター因子である Foxp3 の発現細胞の割合と発現レベルが上昇した (図 1)。CD2 による Foxp3 の発現上昇は、抗 CD3 ε 抗体を用いた TCR への刺激と同等に Foxp3 の発現を上昇させ、IL-2 に部分的に依存していた。

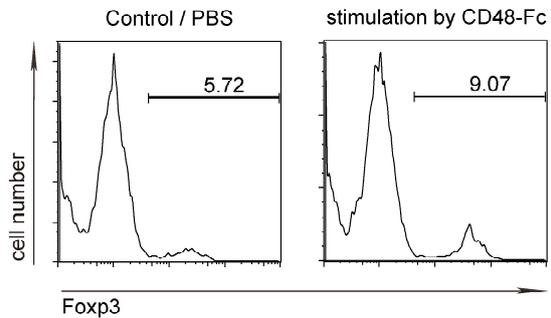


図 1. CD4⁺細胞での CD2 刺激による Foxp3 発現の上昇

- (2) マウス脾臓由来 CD4⁺CD25⁺Treg 細胞について、CD48-Fc により CD2 を刺激したところ、CD48-Fc の濃度依存的に Foxp3 の発現レベルが上昇した (図 2)。抗 CD3 ε 抗体を用いた TCR への刺激との共刺激では、低濃度の刺激時において相乗的に Foxp3 の発現を上昇させた (図 3)。CD2 刺激を受けた Treg 細胞は、未刺激よりも培養時の細胞生存率が高く、MLR における反応性 CD8⁺T 細胞の増殖を抑制する免疫制御機能を有していた (図 4)。また、CD2 刺激時のアポトーシス誘導因子 Bim の発現は、TCR 刺激よりも低い発現レベルであった (図 5)。

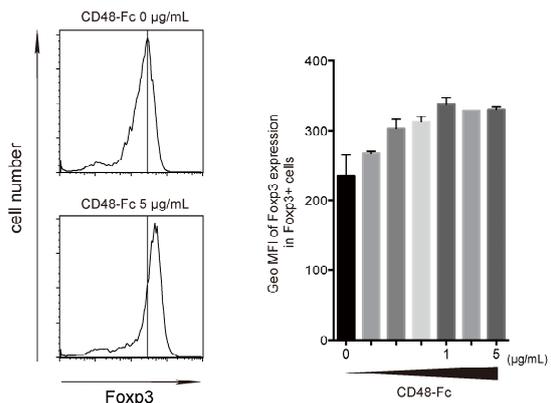


図 2. Treg 細胞での CD2 刺激による Foxp3 発現レベルの上昇

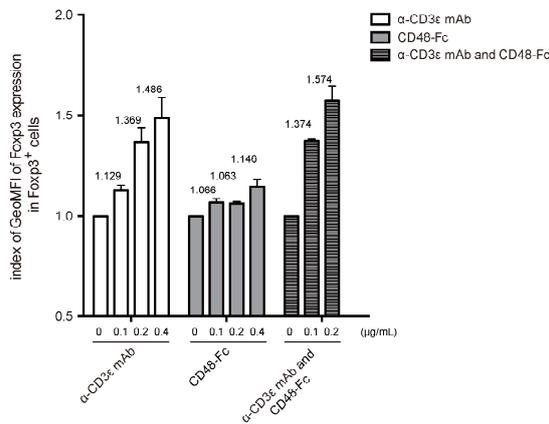


図 3. Treg 細胞における CD2 刺激と TCR 刺激による Foxp3 発現の相乗的増強

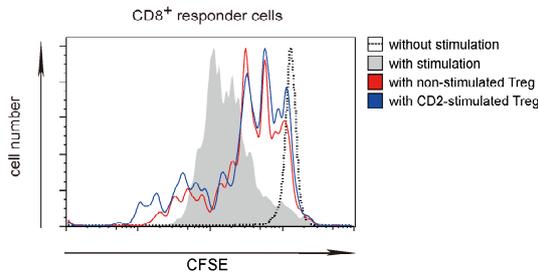


図 4. CD2 刺激後の Treg 細胞による反応性 CD8⁺T 細胞の細胞増殖抑制効果

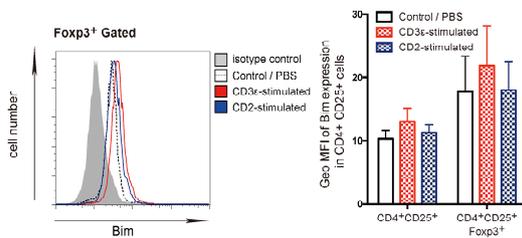


図 5. Treg 細胞への CD2 刺激によるアポトーシス誘導因子 Bim の発現レベル

(3) マウス脾臓由来 CD4⁺CD25⁺T 細胞について、TGF- β 存在下で CD48-Fc を用いて CD2 刺激をしたところ、濃度依存的に Foxp3⁺細胞の割合が上昇した(図 6 A)。この細胞は、MLR における反応性 CD8⁺T 細胞の増殖を抑制する免疫制御機能を有しており、誘導性 Treg 細胞であった(図 6 B)。CD2 刺激による誘導性 Treg 細胞の誘導効果は IL-2 によってさらに効率良く誘導され、PI3K や JAK インヒビターにより阻害された。CD2 刺激による Treg 細胞の誘導において Akt と Stat5 のリン酸化の増強が認められた(図 7)。

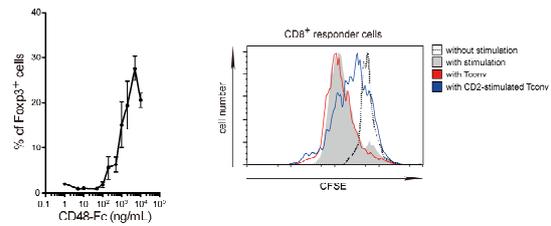


図 6. A) TGF- β 存在下での CD2 刺激による CD4⁺CD25⁺T 細胞での Foxp3 発現 B) CD2 刺激により誘導された Treg 細胞による反応性 CD8⁺T 細胞の細胞増殖抑制効果

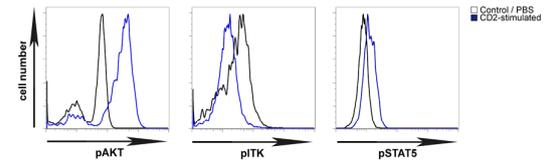


図 7. ナイーブ T 細胞における CD2 刺激によるシグナル経路因子のリン酸化

(4) CD2 遺伝子ターゲティングベクターの遺伝子導入により、遺伝子組み換え細胞コロニーが得られた(図 8)。遺伝子組み換えマウスの作製を現在検討中。

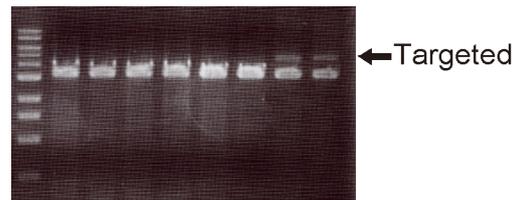


図 8. CD2 遺伝子組み換え ES 細胞クローンの同定

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 6 件)

- ① Kashiwakura, Y., Kanno, Y., Hashiguchi, M., Kobata, T., Kojima, H. Foxp3⁺ regulatory T cells are maintained and induced by CD2-stimulation ex vivo. *Eur. J. Immunol.* 2016. 46 (Suppl. 1):749-50
- ② Kojima, H., Kashiwakura, Y., Kanno, Y., Hashiguchi, M., Kobata, T. Glucose and fatty acids in T cell-metabolism and their roles in immune regulation. *Eur. J. Immunol.* 2016. 46 (Suppl. 1):444
- ③ Hashiguchi, M., Kobayashi, A., Kashiwakura, Y., Kojima, H., Kanno, Y.,

Kobata, T. Peyer's patch innate lymphoid cells regulate commensal bacteria expansion. Eur. J. Immunol. 2016. 46 (Suppl. 1):145

- ④ Hashiguchi M, Kashiwakura Y, Kojima H, Kobayashi A, Kanno Y, Kobata T. Peyer's patch innate lymphoid cells regulate commensal bacteria expansion. Immunol Lett. 2015 May;165(1):1-9.
- ⑤ Hashiguchi M, Kashiwakura Y, Kojima H, Kobayashi A, Kanno Y, Kobata T. IL-33 activates eosinophils of visceral adipose tissue both directly and via innate lymphoid cells. Eur J Immunol. 2015 Mar;45(3):876-85.
- ⑥ Hashiguchi M, Kobayashi A, Kashiwakura Y, Kojima H, Kanno Y, Kurosu A, Tokudome S, Kobata T. NF κ B attenuates IL-5 production and upregulates T-box transcription factors in Th2-like T cells. Cytotechnology. 2014 May;66(3)373-82.

[学会発表] (計 6 件)

- ① Yuji Kashiwakura, Masaaki Hashiguchi, Yumiko Kanno, Tetsuji Kobata, and Hidefumi Kojima. Anticoagulant heparin enhances the induction of regulatory T cells and regulates the immune responses. 2016.12/5-7 第 45 回日本免疫学会総会 沖縄コンベンションセンター・ラグナガーデンホテル (沖縄県宜野湾市)
- ② Yuji Kashiwakura, Yumiko Kanno, Masaaki Hashiguchi, Tetsuji Kobata, and Hidefumi Kojima. Foxp3⁺ regulatory T cells are maintained and induced by CD2-stimulation *ex vivo*. 2016.8/21-26 16th INTERNATIONAL CONGRESS OF IMMUNOLOGY. MELBLUENE (AUSTRALIA)

- ③ Kashiwakura Yuji, Hashiguchi Masaaki, Kanno Yumiko, Kobata Tetsuji and Hidefumi Kojima. CD2-stimulation induces Foxp3 in both CD4+CD25+ regulatory T cells and CD4+CD25- naïve T cells in cooperation with TGF- β . 2015.11/18-20 第 44 回日本免疫学会総会 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

- ④ Kashiwakura Yuji, Hashiguchi Masaaki, Kanno Yumiko, Kobata Tetsuji and Hidefumi Kojima. CD2 stimulation upregulates Foxp3 in murine peripheral regulatory T cells. 2014.12/10-12 第 43 回日本免疫学会総会 京都国際会館 (京都府京都市)

- ⑤ Yuji Kashiwakura : Development of cell-based therapy for hemophilic arthropathy 学術奨励賞受賞講演 第 36 回日本血栓止血学会学術集会 2014. 5/29-5/31 大阪国際交流センター (大阪府大阪市)

- ⑥ 柏倉 裕志, 大森 司, 三室 淳, 窓岩 清治, 井上 誠, 長谷川 守, 小澤 敬也, 坂田 洋一: レンチウイルスベクターによるマウス iPS 細胞からの機能的 FVIII の産生 第 36 回日本血栓止血学会学術集会 2014. 5/29-5/31 大阪国際交流センター (大阪府大阪市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柏倉 裕志 (KASHIWAKURA, Yuji)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 40382890