

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2011

課題番号：19059014

研究課題名（和文） 制御性T細胞による自己認識と自己免疫の制御

研究課題名（英文） Regulation of autoimmunity by self-reactive regulatory T cells

研究代表者

堀 昌平 (HORI SHOHEI)

独立行政法人理化学研究所・免疫恒常性研究ユニット・ユニットリーダー

研究者番号：50392113

研究成果の概要（和文）：

Foxp3<sup>+</sup>制御性T細胞(regulatory T cells; Treg)は自己免疫寛容の確立・維持に重要な役割を担っている。本研究では、次世代DNAシーケンサーを用いてT細胞レセプター(TCR)レパトアのhigh-throughput解析法を確立し、Foxp3<sup>+</sup>T細胞とFoxp3<sup>-</sup>T細胞のTCRレパトア解析を行った。その結果、両者のレパトアは大きく異なっており、その違いは胸腺分化の段階で確立されるものの、Tregレパトアは末梢においてさらに再編成を受けることが明らかになった。また、正常個体においてはFoxp3<sup>+</sup>T細胞に由来するFoxp3<sup>-</sup>ヘルパーT細胞が存在するが、それらのTCRレパトアはTregのTCRレパトアとは大きく異なっていた。以上の結果から、TregへのコミットメントにはTCR特異性が重要な役割を担っていると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Foxp3<sup>+</sup> regulatory T (Treg) cells play a key role in establishing and maintaining natural self-tolerance. We have established a novel method for high-throughput analysis of the T cell receptor (TCR) repertoire using the next generation sequencing technology. By applying this method, we have analyzed the TCR repertoires of Foxp3<sup>+</sup> and Foxp3<sup>-</sup> T cells and found that they are largely distinct. While this dissimilarity was established within the thymus, the repertoire of Foxp3<sup>+</sup> T cells was reshaped substantially in the periphery. In addition, we have also found that the normal T cell repertoire harbored a population of Foxp3<sup>-</sup> helper T cells with previous history of Foxp3 expression and that their TCR repertoire was distinct from Foxp3<sup>+</sup> Treg cells. Our results suggest that TCR specificity plays a central role in the lineage commitment of Treg cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	16,600,000	0	16,600,000
2008年度	16,600,000	0	16,600,000
2009年度	16,600,000	0	16,600,000
2010年度	16,600,000	0	16,600,000
2011年度	16,600,000	0	16,600,000
総計	83,000,000	0	83,000,000

研究分野：免疫学領域

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：自己免疫、免疫寛容、自己反応性、T細胞レセプター、抗原特異性、制御性T細胞

## 胞、細胞分化

### 1. 研究開始当初の背景

免疫系が「自己」「非自己」を識別し、「自己」に対する寛容性を獲得・維持するメカニズムを解明することは免疫学における最も本質的な課題の一つであり、またその破綻が関係する様々な疾患（自己免疫病、アレルギー、炎症性疾患、がん、慢性感染症など）を克服する上でも重要である。近年、末梢二次リンパ組織には胸腺における負の選択（クローン除去）を免れた自己反応性 T 細胞が多数存在し、これらは免疫応答を抑制する機能にコミットした制御性 T 細胞 (regulatory T cells, Treg) と呼ばれる別個の T 細胞系列によって能動的に抑制されて自己寛容が成立していることが明らかになってきた(Hori et al., *Adv Immunol*, 2003)。我々は、ヒトおよびマウスに自然発症する自己免疫疾患 IPEX の原因遺伝子 Foxp3 が Treg の発生・分化と抑制機能を司るマスター遺伝子として機能することを初めて明らかにし、Treg の発生・機能異常が実際に IPEX という重篤な自己免疫疾患の直接的な原因であることを示し、Treg が自己免疫寛容の成立に中心的な役割を果たしていることを証明した(Hori et al., *Science*, 2003; Komatsu and Hori, *PNAS*, 2007)。

Treg がどのような抗原を認識することで分化し、どのような抗原を認識することで活性化して免疫応答を抑制するのかという、抗原特異性の問題を解明することは、Treg を介した「自己」「非自己」の識別ルールを知る上で本質的な課題である。また、Treg の抗原特異性を明らかにすることは、抗原特異的な Treg を活性化・増殖させてこれを様々な免疫疾患の抗原特異的な治療に応用するためにも重要な課題である。

本研究開始時、Foxp3<sup>+</sup> T 細胞 (Treg) 及び Foxp3<sup>-</sup> T 細胞 (conventional T cells, Tconv) の TCR レパトア解析から、Treg と Tconv の TCR レパトアは (重なりはあるものの) 異なっており、両者は異なった抗原を認識すると考えられていた。しかしながら、従来の方法は TCR の RT-PCR クローニングとサンガー法による個々のクローンのシーケンス解析という low-throughput な方法によっており、解析可能な範囲は 10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> クローン程度に限られていた。マウス末梢リンパ組織には Treg, Tconv はそれぞれ 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup> 個のオーダーで存在しており、従来の研究から得られた、TCR レパトアのごく限られた一部に関する情報がどの程度全体を反映しているのか不明で

あった。

一方、Treg は主に胸腺において T 細胞レセプター(TCR)を介して胸腺上皮細胞、樹状細胞に提示される自己抗原を強く認識することで Foxp3 が誘導されて分化すると考えられている(thymus-derived Treg, tTreg)。また、末梢においてナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞が特定の“文脈” (例えば TGF-β 存在下) で抗原を認識することで Foxp3 を発現して Treg に分化することも示されている(inducible Treg, iTreg)。しかしながら、これらの研究は主に外来抗原をモデル抗原として認識する TCR トランスジェニックマウスを用いて成されており、正常個体に存在する Treg 分化における TCR 特異性の役割は不明であった。また、正常個体に存在する Treg における tTreg と iTreg の寄与の程度に関しても不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究は、Treg 分化における TCR 特異性の役割を明らかにするために、従来のアプローチの問題点を克服し、正常個体に存在する Treg の TCR レパトアを解析することを目指した。このために、まずクローン技術を用いし、若山照彦博士 (理科学研究所発生・再生科学総合研究センター) と共同で正常マウスから単離した Treg の核を移植した ES (nuclear transfer ES, ntES) 細胞を 6 クローン樹立した。そしてこの ntES 細胞を用いて Treg 由来 TCR をモノクローナルに発現する“Treg-TCR”マウスモデルの樹立を試みた。さらに、従来の TCR レパトア解析の low-throughput という問題点を克服するために、次世代 DNA シーケンシング技術を活用した high-throughput 解析法の確立を目指した。

一方、我々は本研究の途上で、正常個体に存在する Foxp3<sup>+</sup> T 細胞のうち少なくとも一部は炎症などの環境変化に応じて Foxp3 発現を失ってヘルパー T 細胞へ分化する可塑性を示すことを明らかにした(Komatsu et al., *PNAS*, 2009; Tsuji et al., *Science*, 2009)。Treg の多くが胸腺においてその自己反応性に基づいて分化することを考えれば、このような Foxp3<sup>+</sup> T 細胞の可塑性は自己免疫疾患の発症に直結すると考えられた。そこで、本研究ではこのような Foxp3 発現を失った“ex-Foxp3”ヘルパー T 細胞と Foxp3<sup>+</sup> T 細胞の TCR レパトアを比較解析し、どのような特異性を持った Foxp3<sup>+</sup> T 細胞がそのような可塑性を示すのか検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) “Treg-TCR”マウスの作製・解析

Treg に発現している TCR をモノクローナルに発現するマウスモデルを作製するために、樹立した ntES 細胞からキメラマウスを作製し、germ-line transmission により Treg 由来 TCR を発現する Treg-TCR マウスの樹立を試みた。最終的に1つの ES クローン(1D2)から、遺伝子再構成を受けた機能的な TCR $\beta$  遺伝子を受け継いだ 1D2 $\beta$  マウスが樹立されたが、機能的な TCR $\alpha$  遺伝子(1D2 $\alpha$ )を受け継いだマウスを樹立することができなかった。そこで、1D2 $\alpha$  cDNA をクローニングし、これを CD4 プロモーター・エンハンサーの制御下で CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>胸腺細胞以降の T 細胞分化段階で発現するトランスジェニックマウスを樹立した。さらに、交配によりこのマウスを TCR $\beta$ <sup>1D2/1D2</sup>・TCRC $\alpha$ <sup>-/-</sup>・Foxp3<sup>hCD2</sup> 背景とし、1D2 $\alpha\beta$  TCR のみをモノクローナルに発現するマウスを作製して、flow cytometry により Treg 分化を解析した。

#### (2) 次世代 DNA シーケンサーを用いた high-throughput TCR レパトア解析

本研究で得られた 1D2 $\beta$  マウスを活用し、このマウスを用いて TCR $\alpha$  レパトア解析を行った。交配によりこれを TCR $\beta$ <sup>1D2/1D2</sup>・TCRC $\alpha$ <sup>+/-</sup>・Foxp3<sup>hCD2</sup> 背景とすることで1個の Va 配列=1 クローンであることを保証した。胸腺および末梢二次リンパ組織(脾臓・リンパ節)から Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>細胞(Treg)および Foxp3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞(Tconv)をソーティングにより純化し、そこから Va2 cDNA 断片を RT-PCR により増幅して PCR 産物を精製した。この DNA を 454 GS FLX+または GS Junior System (Roche)を用いて high-throughput sequencing 解析を行った。そして、専用のデータ解析パッケージを開発して得られた大容量データを解析し、さらに複数の統計学的解析手法(PCA 解析、クラスター解析など)および生態学的解析手法(Morisita-Horn similarity index など)を用いてレパトアの多様性と相同性を解析した。

#### (3) exFoxp3 T 細胞の TCR レパトア解析

正常個体において Foxp3<sup>+</sup> T 細胞の fate mapping 解析を行うため、Foxp3 遺伝子座に GFP-Cre 融合蛋白をノックインし、これを Cre レポーターマウスである ROSA26<sup>tdRFP</sup> ノックインマウスと交配させた。Foxp3<sup>GFP-Cre</sup>・ROSA26<sup>tdRFP</sup> マウスの末梢 CD4<sup>+</sup> T 細胞中に確かに GFP<sup>+</sup>RFP<sup>+</sup> exFoxp3 T 細胞が分化し、それらは様々な炎症性サイトカインを産生するエフェクター・メモリーT 細胞としての形質を示した(Miyao et al., *Immunity*, 2012)。この

マウスを交配により TCR $\beta$ <sup>1D2/1D2</sup>・TCRC $\alpha$ <sup>+/-</sup>背景とし、末梢 CD4<sup>+</sup> T 細胞を GFP<sup>+</sup>RFP<sup>-</sup>CD44<sup>low</sup> (naïve, Tn), GFP<sup>+</sup>RFP<sup>-</sup>CD44<sup>high</sup> (RFP<sup>-</sup> memory, Tm), GFP<sup>+</sup>RFP<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup> (RFP<sup>+</sup> Tm), GFP<sup>+</sup> (Treg)に分画してその Va2 レパトアを解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) “Treg-TCR”マウスにおける Treg 分化

得られた 1D2 $\alpha$  Tg. TCR $\beta$ <sup>1D2/1D2</sup>・C $\alpha$ <sup>-/-</sup>マウスを解析したところ、末梢リンパ組織において CD4<sup>+</sup>細胞中約 0.5%が Foxp3<sup>+</sup>であり、この 1D2 $\alpha\beta$ TCR によって Treg 分化が誘導され得ることが分かった。興味深いことに、胸腺においては Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>細胞は検出されなかったことからこのマウスに分化する Treg は iTreg であると考えられた。

#### (2) 次世代 DNA シーケンサーを用いた high-throughput TCR レパトア解析

各 T 細胞サブセットから、最大 10<sup>5</sup> 個程度の配列が得られ、従来よりも 10<sup>2-3</sup> 大きいデータを得ることができた。これにより、Treg と Tconv の TCR レパトアの網羅的かつ定量的な解析が初めて可能になった。

解析の結果、Treg, Tconv 両者において、個々の TCR クローンは均等に発現されているわけではなく、集団は、abundant に発現する比較的少数のクローンと多数の rare クローンから構成されることがわかった。

末梢 Treg と Tconv とで共通に発現するクローンは全体の約 10%程度あったが、その共通に存在するクローンも Treg と Tconv の間で発現レベルに差があった。従って、Treg と Tconv の TCR レパトアは定量的に異なっていると結論された。この Foxp3<sup>+</sup> T 細胞と Foxp3<sup>-</sup> T 細胞の TCR レパトアの違いは既に胸腺細胞においても認められたことから、胸腺における Treg への運命決定における自己抗原認識の重要性が支持された。

一方、胸腺と末梢の間で比較を行うと、Treg の相同性は Tconv と比べて低く、Treg レパトアは末梢において大きく再編成されることが明らかになった。

#### (3) exFoxp3 T 細胞の TCR レパトア解析

Tn, RFP<sup>-</sup> Tm, RFP<sup>+</sup> Tm, Treg のレパトアを解析し、クラスター解析を行った。その結果、RFP<sup>+</sup> Tm は Treg とは異なっており、むしろ RFP<sup>-</sup> Tm とより近縁の関係にあることが明らかになった。この結果は、exFoxp3 T 細胞は Treg に由来するのではなく、Tconv 細胞の活性化に伴う、無差別で一過的な Foxp3 発現を反映するという我々の結果(Miyao et al., *Immunity*, 2012)を強く支持するものである。さらに、exFoxp3 T 細胞と Foxp3<sup>+</sup> T 細胞の

TCR レパトアが異なるという知見は、TCR シグナルが Foxp3<sup>+</sup> T 細胞が Treg に安定にコミットするか exFoxp3 ヘルパー T 細胞に分化するかの運命を決定している可能性を示唆する。

#### 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 10 件)

1. Miyao T, Floess S, Setoguchi R, Luche H, Fehling HJ, Waldmann H, Huehn J, Hori S. Plasticity of Foxp3<sup>+</sup> T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells. *Immunity* 36: 265-275, 2012 査読有
2. Hori S. Stability of regulatory T-cell lineage. *Advances in Immunology* 112: 1-24, 2011 査読有
3. Kendal AR, Chen Y, Regateiro FS, Ma J, Adams E, Cobbold SP, Hori S, Waldmann H. Sustained suppression by Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells is vital for infectious transplantation tolerance. *Journal of Experimental Medicine* 208: 2043-2053, 2011 査読有
4. Hori S. Regulatory T cell plasticity: beyond the controversies. *Trends in Immunology* 32: 295-300, 2011 査読有
5. Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, Cheng G, Yamasaki S, Saito T, Ohba Y, Taniguchi T, Takeda K, Hori S, Ivanov II, Umesaki Y, Itoh K, Honda K. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* 331: 337-341, 2011 査読有
6. Hori S. Developmental plasticity of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Current Opinion in Immunology* 22: 575-582, 2010 査読有
7. Tomura M, Honda T, Tanizaki H, Otsuka A, Egawa G, Tokura Y, Waldmann H, Hori S, Cyster JG, Watanabe T, Miyachi Y, Kanagawa O, Kabashima K. Activated regulatory T cells are the major T cell type emigrating from sensitized skin. *Journal of Clinical Investigation* 120:883-893, 2010 査読有
8. Tsuji M, Komatsu N, Kawamoto S, Kanagawa O, Honjo T, Hori S, Fagarasan S. Preferential generation of follicular B helper T (T<sub>FH</sub>) cells from Foxp3<sup>+</sup> T cells in gut Peyer's patches. *Science* 323: 1488-1492, 2009 査読有
9. Komatsu N, Mariotti-Ferrandiz ME, Wang Y, Malissen B, Waldmann H, Hori S. Heterogeneity of natural Foxp3<sup>+</sup> T cells: a

committed regulatory T cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 1903-1908, 2009 査読有

10. Hori S. Rethinking the molecular definition of regulatory T cells. *European Journal of Immunology* 38: 928-930, 2008 査読有

[学会発表] (計 5 件)

1. Hori S. Resolving the controversy over regulatory T cell plasticity. The 14<sup>th</sup> International Conference on Lymphocyte Activation and Immune Regulation: T cell Differentiation and Plasticity. 2012 年 2 月 3 日-5 日, Newport Beach, CA, USA
2. Hori S. Stability and plasticity in regulatory T cell differentiation. The 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology. 2010 年 8 月 22 日-27 日, 2010, Kobe, Japan
3. Hori S. Stability and plasticity in regulatory T cell differentiation. Keystone Symposia "Tolerance and Autoimmunity". 2010 年 2 月 21 日-26 日, Taos, New Mexico, USA
4. Hori S. Foxp3 and its essential function for T cell regulation, International Symposium "Frontiers in Allergy and Autoimmunity". 2008 年 5 月 30 日-31 日, Mainz, Germany
5. Hori S. Molecular mechanisms of dominant tolerance: lessons learned from naturally occurring *Foxp3* gene mutations. The 13<sup>th</sup> International Congress of Immunology. 2007 年 8 月 21-25 日, Rio de Janeiro, Brazil

[その他]

ホームページ:

<http://www.riken.jp/r-world/research/lab/rcai/home/index.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀 昌平 (HORI SHOHEI)

独立行政法人理化学研究所・免疫恒常性研究  
ユニット・ユニットリーダー

研究者番号: 50392113

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし