

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790940

研究課題名（和文）T細胞アナジー誘導遺伝子関連新規制御性T細胞による経口免疫寛容誘導機序の解明

研究課題名（英文）Mechanism of oral tolerance controlled by a novel regulatory T cell subset associated with a T cell anergy inducing gene

研究代表者

岡村 僚久 (OKAMURA TOMOHISA)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：10528996

研究成果の概要（和文）：自己免疫寛容は制御性T細胞により維持されている。抑制性サイトカイン IL-10 は、免疫恒常性維持において重要な役割を果たしているが、IL-10 産生性制御性T細胞は、その特異的マーカーが不明なことより機能解析が困難であった。近年申請者は、lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)を特異的に発現する CD4 陽性 CD25 陰性 Fosp3 陰性 T細胞が、IL-10 産生性制御性T細胞サブセットであることを報告した。この新規 CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性T細胞（以下、LAG3 Treg）は、アナジー関連転写因子 Egr2 を発現する。また、Egr2 は CD4 陽性T細胞における Blimp-1、IL-10 および、LAG3 発現を誘導する。本課題では、Egr2 が Blimp-1 発現増強を介して IL-10 を誘導することおよび、経口免疫寛容誘導系において LAG3 Treg がT細胞、B細胞の共通認識抗原により誘導されることを明らかにした。経口免疫寛容誘導における LAG3 Treg による抑制メカニズムおよび、その誘導機序を明確にしたこれらの成果は、抗原特異的な新規免疫抑制療法開発の一助となると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Regulatory T cells (Tregs) are engaged in the maintenance of immunological self-tolerance. IL-10 has an important role in maintaining the normal immune state. However, it is difficult to assess the *in vivo* physiological function of IL-10-secreting Tregs because of the lack of its specific markers. Recently, we reported that IL-10-secreting Tregs can be delineated as CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T cells that characteristically express lymphocyte activation gene-3 (LAG-3). Moreover, this novel CD4⁺CD25⁻LAG3⁺ Tregs (LAG3 Tregs) express anergy associated transcription factor Egr2, which confers Blimp-1, IL-10 and LAG3 expression of CD4⁺ T cells. In this study, we confirmed the factors controlling LAG3 Treg-induction in an antigen specific manner. These findings could lead to the novel antigen-specific therapy for autoimmune diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：臨床免疫、制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

免疫学的恒常性は、主に胸腺で誘導される転写因子 Foxp3 をマスター制御遺伝子とする CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞と、末梢（胸腺外）で誘導される制御性 T 細胞により維持されている。末梢で誘導される制御性 T 細胞として、抑制性サイトカイン IL-10 産生を特徴とする Tr1 細胞などが知られているが、人工的な実験系で誘導されるサブセットとしての報告であり、特異的な細胞表面マーカーおよび、マスター制御遺伝子の同定が望まれてきた。

近年申請者は、末梢で誘導され抗原特異的抑制能を有する「新規 CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞」（以下、LAG3 Treg）を同定し、アナジー誘導遺伝子 early growth response gene 2 (Egr2) がそのマスター制御因子となることを報告している。LAG3 Treg は機能的 Foxp3 欠損マウスにおいても認められ、その抑制能は Foxp3 には依存せず、CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞とは異なる Treg サブセットと考えられている。

さらに LAG3 Treg は、抑制性サイトカイン IL-10 を高産生するという特徴を有する。IL-10 欠損マウスは腸炎を自然発症することより、IL-10 は腸管における免疫恒常性維持に重要な役割を果たすと考えられている。LAG3 Treg は、小腸パイエル板に強い集積傾向を認め、IL-10 依存性に腸炎モデルマウスの治療効果を示す。また、germ-free マウスでは LAG3 Treg が欠損する。以上の知見より、経口抗原に対する免疫寛容誘導において LAG3 Treg が重要な役割を果たすことが推測され、その機能解析は制御性 T 細胞による免疫恒常性維持、特に経口免疫寛容誘導メカニズムの理解に大きな手掛かりとなる。

2. 研究の目的

抑制性サイトカイン IL-10 を高産生する新規 CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞 (LAG3 Treg) による免疫抑制メカニズムおよび、その誘導機序を解明する。

3. 研究の方法

(1) LAG3 Treg のマスター制御遺伝子である Egr2 と IL-10 産生関連遺伝子 B lymphocyte induced maturation protein 1 (Blimp-1) との相互作用を ChIP アッセイを用いて検討した。

(2) 経口投与抗原に対する LAG3 Treg 誘導における抗原特異性につき、T 細胞受容体トランスジェニックマウスを用いて検討した。

(3) 経口免疫寛容誘導時の LAG3 Treg 誘導において、T 細胞、B 細胞の共通抗原認識の必要性につき、T 細胞および B 細胞受容体トランスジェニックマウスを用いて検討した。

4. 研究成果

(1) マスター制御遺伝子 Egr2 と Blimp-1 との相互作用に関して

IL-10 産生性 LAG3 Treg は、Egr2 および、IL-10 産生関連遺伝子 Blimp-1 の高発現を認めた。また、Egr2 をレトロウイルスを用いて遺伝子導入した CD4 陽性 T 細胞は、LAG3 Treg の形質を獲得すると同時に、Blimp-1 発現も誘導された。さらに、ChIP アッセイにて Egr2 が Blimp-1 promoter 領域に結合することを確認した。これらのことより、LAG3 Treg による IL-10 を介した抑制メカニズムが明らかとなった。

(2) 経口投与抗原に対する LAG3 Treg の抗原特異性に関して

B 細胞欠損 μ MT マウスは、LAG3 Treg を認めず、同マウスに B 細胞を養子移入することで、LAG3 Treg が誘導されるという知見を得ている。そこで、Rag1 遺伝子を欠損した鶏卵白アルブミン (OVA) 特異的 T 細胞受容体トランスジェニックマウス (OT-II/Rag1^{-/-} マウス) に B 細胞を移入し、OVA を経口投与したところ、抗原特異的 LAG3 Treg の誘導を認めた。誘導された LAG3 Treg は、遺伝子発現プロファイルも定常状態のものと同様であり、経口抗原により誘導される LAG3 Treg の抗原特異性が確認された。

(3) 経口免疫寛容誘導における LAG3 Treg 誘導条件に関して

鶏卵リゾチーム (HEL) 特異的 B 細胞受容体トランスジェニックマウス (MD4 マウス) より回収した B 細胞および、OT-II マウスより回収した T 細胞を μ MT マウスへ共移入し、HEL-OVA 結合抗原を経口投与した。その結果、LAG3 Treg が B 細胞、T 細胞の共通認識抗原により誘導されることが明らかとなった。

以上の結果より、LAG3 Treg が経口免疫寛容において、T 細胞および B 細胞の共通抗原認識により誘導され、転写因子 Egr2 による Blimp1-IL-10 誘導系を介して腸管免疫寛容を担っていることが明らかとなった。これらの成果は、新規抗原特異的免疫抑制療法開発の手掛かりとなると考えられた。

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5件)

1. 岡村僚久 「CD4 陽性CD25 陰性LAG3 陽性制御性T細胞の機能」(先端医学社)「炎症と免疫」Vol. 19, no. 1, 2011, p29-33 査読(無)
 2. Fujio K., Okamura T., Yamamoto K. The Family of IL-10-secreting CD4⁺ T cells. *Adv. Immunol.* 2010;105:99-130. 査読(有)
 3. Myouzen K., Kochi Y., Shimane K., Fujio K., Okamura T., Okada Y., Suzuki A., Atsumi T., Ito S., Takada K., Mimori A., Ikegawa S., Yamada R., Nakamura Y., and Yamamoto K. Regulatory polymorphisms in EGR2 are associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Hum. Mol. Genet.*, 2010, 19 (11): 2313- 2320. 査読(有)
 4. 岡村僚久 「IL-10 産生制御性T細胞(IL-10-producing regulatory T cells)」(医歯薬出版株式会社)「医学のあゆみ」最新・自己免疫疾患Update 第230巻9号 Aug. 2009, p679-684 査読(無)
 5. Okamura T., Fujio K., Shibuya M., Sumitomo S., Shoda H., Sakaguchi S., Yamamoto K. CD4⁺CD25⁻LAG3⁺ regulatory T cells controlled by the transcription factor Egr-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, August 18, 2009; 106 (33) 13974-13979 査読(有)
- [学会発表] (計7件)
1. Tomohisa Okamura: “A critical role of CD4⁺CD25⁻LAG3⁺ regulatory T cells in suppression of B cell responses.” , The 3rd Global COE Retreat in Makuhari (Global Center of Education and Research for Chemical Biology of the Disease), Chiba, Japan, December 11 - 12, (2010)
 2. Tomohisa Okamura : “CD4⁺CD25⁻LAG3⁺ regulatory T cells suppress lupus glomerulonephritis in MRL/*Ipr* mice” , 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, Aug. 22-27, (2010)
 3. 岡村僚久 : CD4⁺CD25⁻LAG3⁺ 制御性T細胞はMRL/*Ipr*マウスにおける自己免疫疾患を改善する : 第31回日本炎症・再生医学会, Tokyo, Japan, August 5-6, (2010)
 4. Tomohisa Okamura : “CD4⁺CD25⁻LAG3⁺ Regulatory T Cells Attenuate Autoimmune Disease in MRL/*Ipr* Mice” , The 2nd Global COE Retreat in Tomiura (Global Center of Education and Research for Chemical Biology of the Disease), Chiba, Japan, February 13 - 14, (2010)
 5. Tomohisa Okamura : “CD4⁺CD25⁻LAG3⁺ Regulatory T Cells Suppress a Mouse Model of Colitis” , American College of Rheumatology Scientific Meeting, Philadelphia, USA, Oct 17-21, (2009)
 6. 岡村僚久 : CD4⁺CD25⁻LAG3⁺ 制御性T細胞はMRL/*Ipr*マウスにおける自己免疫疾患を改善する : 第31回日本炎症・再生医学会, Tokyo, Japan, Aug. 5-6, (2010)
 7. Tomohisa Okamura : “Identification of a Novel Egr-2 Dependent IL-10-secreting CD4⁺CD25⁻LAG3⁺ Regulatory T cell” , The 9th World Congress on Inflammation, July 6-10,

Kyoto, Japan, (2009)

[その他]

平成21年 第31回 日本炎症・再生医学会
優秀発表演題 選出

ホームページ:

<http://plaza.umin.ac.jp/areriul8/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡村 僚久 (OKAMURA TOMOHISA)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号: 10528996

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし