

令和 6 年 5 月 2 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20850

研究課題名（和文）Heliosを中心とした胎児期から小児期の免疫寛容発達システムの解明

研究課題名（英文）Immune Tolerance Developmental System from Fetal to Childhood with a Focus on Helios

研究代表者

武藤 浩司（Mutoh, Hiroshi）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60968262

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：Helios（遺伝子名IKZF2）は制御性T細胞のマーカーとして知られており、ナイーブCD4+T細胞では陰性とされている。今回の研究では、フローサイトメトリー、ウエスタンブロッティング、real-time PCRなどの手法を用いて、各年齢群（新生児期（早産含む）から乳児、小児、若年成人、高齢成人）を分析した結果、Helios発現は新生児期・小児期など若年では高発現であるが、それが成長や老化に伴い減少することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの免疫機能は、免疫記憶の獲得など成長・老化によって変化するが、免疫寛容と免疫応答のバランスも世代によって変化していく。新生児期や小児期は細菌感染症などが重篤しやすい一方で、一部の過剰な免疫応答が原因と思われる感染症（麻疹・風疹や新型コロナウイルス感染など）については成人ほど重篤化しない。これらの現象は免疫寛容優位から免疫応答優位に成長・老化によって変化していくことが原因の一つとして考えられる。今回の研究で見出されたナイーブCD4+ T細胞でのHelios発現の変化は、新生児期から小児期に見られる免疫寛容優位などの特徴と、成長・加齢に伴う変化と深く結びついている可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：Helios (gene name: IKZF2) is a known marker of regulatory T cells and is negative in naive CD4+ T cells. In this study, using flow cytometry, Western blotting, and real-time PCR, we analyzed each age group (from neonatal period including preterm birth to infants, children, young adults, and older adults). We found that Helios expression is highly expressed in young, including neonatal and childhood, but that it Helios expression is high in the young, such as in newborns and children, but decreases with growth and aging.

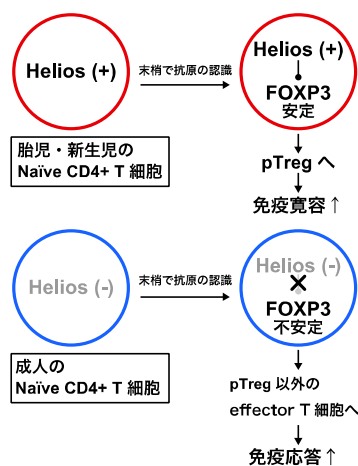
研究分野：小児医学

キーワード：Helios IKZF2 免疫寛容 ナイーブT細胞 臍帯血 新生児 小児

1. 研究開始当初の背景

現代においても新生児期から幼少期の死因として、細菌やウイルスなどの感染症は引き続き大きな位置を占める。その理由として漠然と成人と比べて小児は免疫が未熟・弱いためとされてきたが、新型コロナウイルス感染、水痘、流行性耳下腺炎など小児の方が明らかに軽症な疾患も多数存在する。細菌やウイルスなどの外部抗原を許容して過剰な免疫応答を起こさないこと、すなわち免疫寛容は、個体にとって未知の外来抗原に曝露される胎児から小児期間に必須な免疫の特徴の一つである。免疫寛容では、CD4+ T細胞の一種の制御性T細胞(以下Treg)が重要な働きをしており、ヒトの胎児や小児においてもTregの関与を示す研究結果は後述の自験例も含め出ているが、その詳細は不明な点も多い。

Helios (遺伝子名 *IKZF2*) は、Tregのマスター遺伝子であるFOXP3の安定化など、Tregの機能に関与しており、胸腺由来のnatural Treg (nTreg)に特異的に発現する転写因子として知られている。しかし、我々の先行研究において、正期産(在胎37週以降)の臍帯血ではナイーブT細胞にHeliosの発現があると示唆する結果が得られた。新生児期から成人期のいずれかの時点までは、ナイーブT細胞のHeliosの発現があり、それによって末梢においてperipheral Treg (pTreg)への分化が進み、免疫寛容に傾く可能性が考えられる。HeliosはTregの研究において非常に注目されているが、ナイーブT細胞でのHeliosの発現の研究報告はほとんどない。比較的最近のT細胞でのHeliosの総説(Thornton AM, Shevach EM. Immunology. 2019 Nov;158(3):161-170)においても、臍帯血でのHeliosの高発現に触れているが、CD4+T細胞での発現が高いのは臍帯血のTregのほとんどがnTregであるためと結論づけられている。上記の胎児期のナイーブT細胞でのHeliosの研究はあるが、小児での検討、成長での変化の報告は現時点で確認できなかった。



図：Helios が Naive T 細胞の分化に与える影響

2. 研究の目的

本研究の目的はHeliosの発現を中心とした胎児期から成人期でのナイーブCD4+T細胞の評価・解析である。同時に今後の研究のために各年代の凍結単核球のライブラリーの作成も行う。

3. 研究の方法

様々な年代の血液を採取し、単核球分離し液体窒素中に凍結保存した。

早産児(在胎週数36週以下)、正期産児(在胎37週以降)、乳児(生後2歳未満)、小児(2歳以降18歳未満)、若年成人(18歳以降50歳未満)、高齢成人(50歳以降)の6群に年代を分けた。

ナイーブT細胞の評価は主に3つの方法で行った。すなわちフローサイトメトリー(細胞内染色を含む)と、ウェスタンブロッティング、real time PCRである。

フローサイトメトリーでは、単核球を染色して、ナイーブCD4+ T細胞のHeliosの発現を評価すること、またCD4+ T細胞におけるFOXP3とHeliosの発現パターンを評価した。

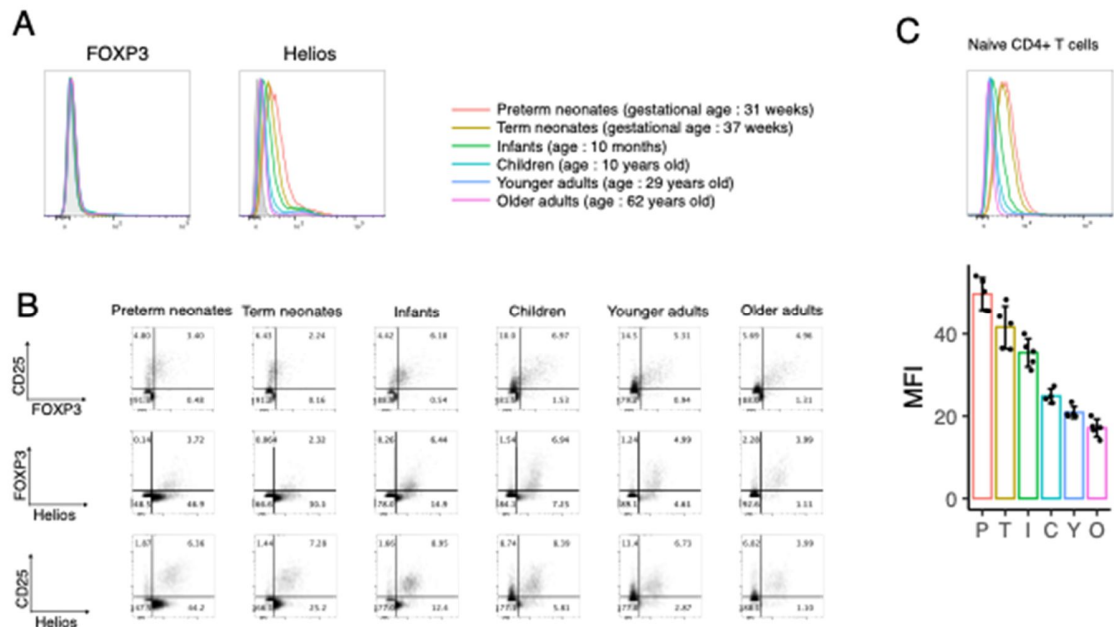
ウェスタンブロッティングとreal time PCRを行うにあたり、単核球からナイーブCD4+ T細胞(CD45+ CD3+ CD4+ CD8- CD45RA+ CCR7+ CD25-)を蛍光標識抗体で染色し、フローサイトメトリーで高純度にソーティングした。

ウェスタンブロッティングでは、ソーティングした細胞をRIPA bufferで溶出し、セルライゼート中のHeliosの発現を測定した(ハウスキーピングタンパクのβアクチンとの比で評価)。

当初転写産物(遺伝子名 *IKZF2*)の評価はRNA-seqでその他の遺伝子も含めて網羅的に行う予定であったが、検体数を増やす目的で、real time PCRを行うこととした。ナイーブCD4+ T細胞からRNAを抽出し、RT-PCRにてcDNAに変換、real time PCRを行った。評価項目はACTBとの発現比(ΔCt)である。

4. 研究成果

■フローサイトメトリー（細胞内染色）

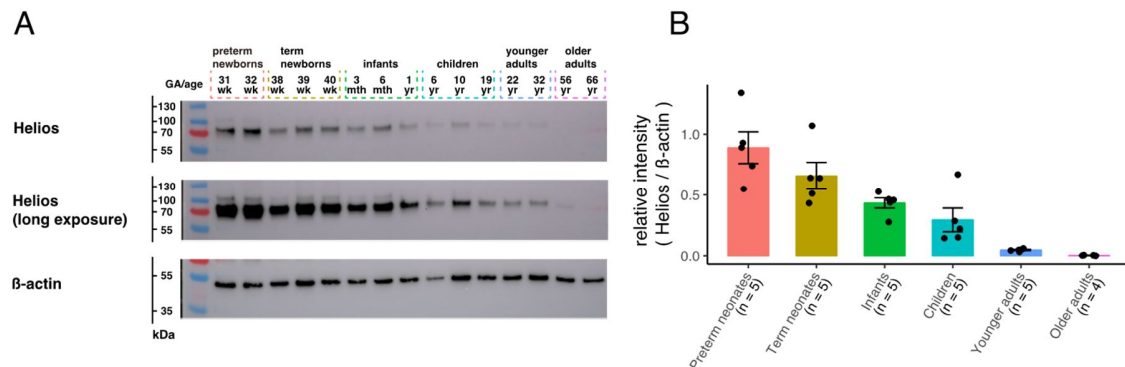


A 各年代の代表例のCD4+ T細胞におけるFOXP3及びHeliosの発現。どちらも大部分の陰性細胞と少数の陽性細胞からなる二相性の分布を示している。FOXP3では陰性領域は各年代で共通しているものの、Heliosについては陰性領域が若年ほど発現が高いことがわかる。

B 各年代の代表例のCD4+ T細胞を各種マーカーで展開。Tregs(FOXP3+CD25+)の割合は各年代で大きな違いはないが、Helios+FOXP3-もしくはHelios+CD25-（すなわち非TregsでのHelios陽性細胞）の割合は若年ほど高い。

C ナイーブCD4+ T細胞（CD3+ CD4+ CD8- CD45RA+ CCR7+ CD25-）におけるHeliosのMFI(mean fluorescence intensity)の各年代での比較。年代が高いほど低い傾向にある（Jonckheere-Terpstra検定にて $p < 0.001$ ）。

■ウェスタンブロッティング

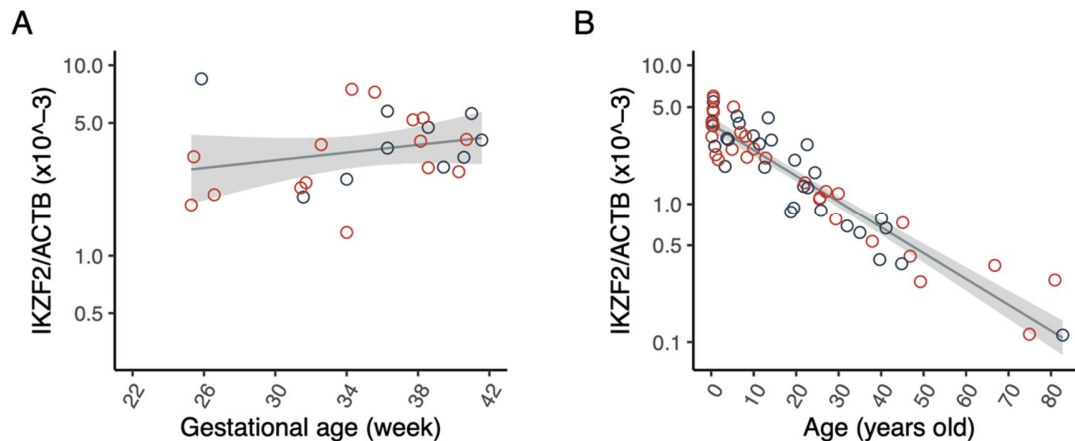


A ナイーブCD4+ T細胞（CD45+ CD3+ CD4+ CD8- CD45RA+ CCR7+ CD25-）でのHelios発現を各年代で5or4サンプルで評価した元データの一部。

B Aのまとめ。Heliosの発現を反映するハウスキーピングタンパクのβ-actinに対するrelative

intensityは、年代が高いほど低い傾向にある（Jonckheere-Terpstra検定にて $p < 0.001$ ）

■real time PCR



A 早産・正期産児における、在胎週数とナイーブCD4⁺ T細胞でのIKZF2の発現 (IKZF2とACTBの ΔCt 値で評価)の関連をreal time PCRで評価。回帰分析にて在胎週数と発現の間に明らかな相関関係はなし ($R^2 = 0.11$, $p = 0.102$)。

B 乳児期以降の在胎週数とナイーブCD4⁺ T細胞でのIKZF2の発現 (IKZF2とACTBの ΔCt 値で評価)の関連をreal time PCRで評価。回帰分析にて在胎週数と発現の間に有意に強い相関関係が見られる ($R^2 = 0.87$, $p < 0.001$)。

(A,Bとも赤丸が女性例、黒丸が男性例である)

Real time PCRの評価における新生児期（臍帯血）でのIKZF2の発現を除いて、いずれの結果においても若年ほど有意にHelios及びIKZF2の発現が高いことが分かった。Heliosは制御性T細胞、その中でもnatural Tregsのマーカーとされていることから少なくともヒトの成人ではナイーブCD4⁺ T細胞でのHeliosの発現は陰性であり、予備実験にて臍帯血のナイーブCD4⁺ T細胞のHelios高発現をフローサイトメトリーの細胞内染色で確認していたため、当初は、新生児期～小児期でHelios陽性であるが、その後は陰性となると予想していた。

しかし、実際に各年代における解析を複数の方法で行って判明した事実としては、すべての年代、すなわち胎児期、免疫機能が成熟していく成長期、免疫機能が衰えていく老化期、すべてにおいてナイーブCD4⁺ T細胞でのHelios発現は下がり続けるということである。言い換えれば、成人期にも全くの陰性にはならないということである。

老化がT細胞に与える影響は、成長に伴う影響に比べて研究が進んでいる分野である。本研究を開始後の2023年に、高齢者のナイーブCD4⁺ T細胞はHeliosの発現（及び遺伝子のIKZF2の発現）が低下しており、そのことによって、ナイーブT細胞がエフェクターT細胞に誘導されやすく、老化に伴う免疫応答優位の状況に関わっているという報告が出された（Zhang, Huimin et al. "Nature immunology vol. 24,1 (2023): 96-109."）。この報告では小児例以下には触れられておらず、現在検索し得る範囲で、本研究のようにすべての年代で横断的にナイーブCD4⁺ T細胞でのHelios発現を評価したものはない。

今回の研究において機能解析は行っていないが、先述の既報ではナイーブCD4⁺におけるHelios発現のKOにより免疫応答が高まることが示されており、またHeliosはTregsの主要転写因子であるFOXP3の安定化に寄与しているということから、今回の研究で見られた現象が若年者の免疫寛容性に関わっている可能性は非常に高いと考える。

本研究の成果については、2023年11月に国際学会で発表した。また、本研究の結果に加えて、各年

代のナイーブ CD4⁺ T 細胞のメチル化解析の結果を加えて、論文投稿の準備中である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 Hiroshi Mutoh
2 . 発表標題 Helios expression in naive CD4+ T cells changes with growth in humans
3 . 学会等名 The 18th congress of Asian Society for Pediatric Research (ASPR)
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 高橋尚人
2 . 発表標題 新生児の免疫応答と各種疾患の病態との関係
3 . 学会等名 第138回日本小児科学会福島地方会
4 . 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------