

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 4 月 27 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19137

研究課題名(和文) CD28シグナルによる末梢由来制御性T細胞の生体内維持機構の解明

研究課題名(英文) Role of CD28 co-stimulation in homeostasis of peripherally-derived regulatory T cells

研究代表者

若松 英 (Wakamatsu, Ei)

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・助教

研究者番号：40632617

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)は生体内において、胸腺で分化する胸腺由来Treg(tTreg)と末梢組織で分化する末梢由来Treg(pTreg)に分類される。pTregの恒常性にCD28がどのような影響を与えるかは不明である。そのため、本研究ではpTregの恒常性におけるCD28の役割の解明を試みた。本研究から、CD28欠損マウスの末梢リンパ組織においてpTregが減少していることを見出した。CD28欠損マウスにおけるpTregの減少は増殖能の欠如が原因であった。これらのことから、CD28は増殖を制御することでpTregの恒常性維持に寄与していることが示唆される。

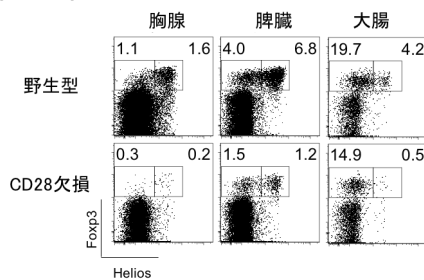
研究成果の概要(英文)：Regulatory T cells (Tregs) are classified into thymus-derived Tregs and peripherally-derived Tregs (pTreg). It has not been fully understood how CD28 influences on homeostasis of pTreg. Thus, we attempted to investigate the role of CD28 in homeostasis of pTreg. We found that pTreg was significantly reduced in secondary lymphoid organs (SLOs) of CD28 knockout mice. And we clarified that the reduction of pTreg in SLOs of CD28 KO mice was due to the impairment of proliferation. Our study indicate that CD28 regulates proliferation of pTreg, leading to the maintenance of homeostasis of pTreg.

研究分野：免疫学

キーワード：制御性T細胞 CD28 末梢由来制御性T細胞 分化 増殖

### 1. 研究開始当初の背景

制御性 T 細胞 (Treg) は末梢における免疫寛容、及び免疫応答の恒常性の維持に寄与している。Treg は生体内において胸腺由来 Treg (tTreg、Foxp3<sup>+</sup> Helios<sup>+</sup>) と末梢由来 Treg (pTreg、Foxp3<sup>+</sup> Helios<sup>-</sup>) に分類される。過去の報告から、T 細胞活性化分子である CD28 が tTreg の分化、および末梢リンパ組織での増殖に寄与していることが明らかとなっている。一方で、CD28 が pTreg にどのような影響を与えるかは十分には理解されていない。当研究室では、腸管における pTreg 分化が CD28 非依存的に起こることを見出している。しかし、腸管での pTreg 分化が CD28 非依存的に起こるにも関わらず、CD28 欠損マウスの脾臓などの末梢リンパ組織では tTreg と同様に、pTreg の顕著な減少していた (下図)。



CD28 欠損 pTreg の減少は骨髄キメラにおいても認められたことから、pTreg における CD28 の内在性の欠損が pTreg の減少に起因していることが示唆される。我々は、末梢リンパ組織における pTreg の維持に CD28 がどのような影響を及ぼしているかを詳細に解析するために、細胞死に注目した。予備的実験の結果から、野生型と比較して、CD28 欠損 tTreg は細胞死の割合が増加していたが、pTreg においては顕著な違いは認められなかった。CD28 は T 細胞の細胞死抑制に寄与していることが報告されているが、CD28 を介した細胞死抑制は細胞によって異なることが考えられる。分化、及び細胞死の解析から、CD28 は細胞特異的な役割を持っている可能性が考えられる。

### 2. 研究の目的

これまでの結果から、tTreg と pTreg における CD28 シグナルの役割が異なる可能性が示唆されている。そのため、tTreg で得られてきた Treg における CD28 の役割に関する知見は pTreg には一致しない可能性が考えられる。そのため、本研究では pTreg の恒常性維持における CD28 の役割を解明することを目的とした。また、本研究を通して、Treg サブセット間での CD28 の役割の違いを明らかにすることを試みた。

### 3. 研究の方法

#### 骨髄キメラマウスの作製

野生型細胞と CD28 欠損細胞を同条件下で解析を行うために、それぞれのマウスから骨髄

細胞を単離し、骨髄キメラマウスを作製した。

#### 細胞死の解析

生体内における細胞死を検討するために、活性型カスパーゼ 3 の発現を指標に解析を行った。また、CD28 欠損 Treg (CD45.2/45.2) および野生型 Treg (CD45.1/45.1) を野生型マウス (CD45.1/45.2) に移入し、細胞死によって移入した細胞が減少するかを確認した。

#### 細胞増殖の解析

細胞周期を解析するために、細胞周期エントリーマーカーである Ki67 発現、および細胞周期進行マーカーである BrdU の取り込みを解析した。Treg の増殖を解析するために、CD28 欠損マウス、Treg 特異的 CD28 欠損マウスから Treg を単離し、CellTrace Violet で染色し、Treg 欠損マウスである CD28 欠損マウスに移入した。

#### トランスクリプトーム解析

CD28 がそれぞれの Treg サブセットの遺伝子発現にどのような影響を与えるかを詳細に解析するために、RNAseq 解析による網羅的な遺伝子発現解析を行った。

#### CD28 シグナル解析

CD28 下流のどのシグナルがそれぞれの Treg サブセットの恒常性に寄与しているかを検討するために、以下に示す CD28 細胞内領域に変異を導入したノックインマウスを用いて解析を行った。YMMN->FMMN:CD28 を介した PI3K の活性化が起こらない。PYAP->AYAA:CD28 を介した NFκB の活性化が起こらない。

### 4. 研究成果

#### CD28 を介した細胞死抑制

細胞死マーカーである活性型カスパーゼ 3 を指標にした予備的実験から CD28 欠損マウス脾臓における tTreg は野生型と比較して細胞死の割合が増加していた。一方で pTreg は CD28 欠損マウスと野生型マウスで違いが認められなかった。同様の解析を骨髄キメラマウスを用いて行った。予備的実験の結果と同様に、CD28 欠損 tTreg の細胞死の割合は高かった。一方で、pTreg には違いが認められなかった。CD28 欠損 pTreg で細胞死の増加が認められなかったことに関して、細胞を単離する段階で細胞死を起こしている細胞が脱落している可能性が考えられた。そのため、CD28 欠損マウス、及び野生型マウスから単離した Treg を野生型マウスに移入した。この実験によって、tTreg と同様に pTreg の細胞死抑制にも CD28 が寄与していれば、CD28 欠損 pTreg は顕著に減少することが予想された。しかし、活性型カスパーゼ 3 を指標にした実験と一致して、移入前後での CD28 欠損 pTreg と野生型 pTreg の割合に変化はなかった。このことから、CD28 を介した細胞死の抑制は

pTreg では起こっていない可能性が示唆された。また、カスパーゼ3の結果と異なり、CD28欠損 tTreg の減少は認められなかった。この結果から、CD28 は tTreg の細胞死を抑制するが、CD28 を介した細胞死抑制の破綻が CD28欠損 tTreg の減少には直接的には寄与していない可能性が示唆された。

#### CD28 を介した細胞増殖の亢進

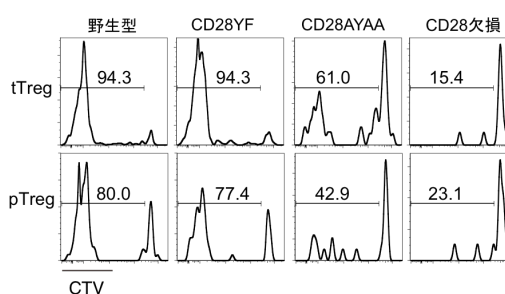
CD28 を介した増殖活性の亢進がそれぞれの Treg サブセットの恒常性の維持に寄与しているかを検討した。CD28 欠損マウスは Treg 欠損状態にも関わらず、tTreg、及び pTreg における Ki67 発現、及び BrdU の取り込みは野生型マウス由来の細胞と顕著な違いが認められなかった。次に、CD28 欠損 Treg および野生型 Treg を Treg 欠損マウスに移入し増殖能を解析した。その結果、CD28 欠損 tTreg、及び pTreg はほとんど細胞分裂を起こさなかった。これらの結果から、CD28 を介した増殖能の亢進が、CD28 欠損 tTreg、及び pTreg の減少に起因していることが示唆された。

CD28 がそれぞれの Treg サブセットの増殖にどのように寄与しているのかを検討するために、RNAseq 解析による発現遺伝子の網羅的解析を行った。その結果、CD28 欠損 pTreg において細胞周期の G2/M 期に関連する遺伝子の発現が低下していた。一方で、CD28 欠損 tTreg は G1/S、G2/M 期に関連する遺伝子の発現が低下していた。これらの結果から、CD28 はそれぞれの Treg サブセットの増殖を促進するが、CD28 がそれぞれのサブセットに与える影響は異なる可能性が示唆された。

#### Treg サブセットの増殖に寄与する CD28 下流シグナルの同定

CD28 下流のどのシグナルがそれぞれの Treg サブセットの増殖に寄与しているかを同定するために、CD28 細胞内領域に存在するシグナル活性化モチーフを置換したノックイン (KI) マウスを用いて解析を行った。用いた KI マウスは PI3K 経路の起点となる細胞内領域に変異を挿入したマウス (CD28YF) と NFκB 経路の起点となる部位に変異を挿入したマウス (CD28AYAA) を用いた。それぞれのシグナル経路はエフェクター T 細胞の活性化に寄与することが報告されている。

CD28KI マウス由来の Treg を Treg 欠損マウスに移入した結果、CD28PYAP を CD28AYAA に置換した pTreg は CD28 欠損細胞と同様に増殖活性を失っていた。一方で、CD28AYAA tTreg は完全には増殖活性を失っていなかった。これらの結果から、それぞれの Treg サブセットの増殖に寄与する CD28 下流シグナルは完全には一致しないことが示された (右図)。



本研究から、末梢リンパ組織における pTreg の維持には CD28 を介した増殖活性の亢進が寄与していることが示された。また、CD28 が細胞間で異なる効果を引き起こす可能性が示唆された。

#### 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 3 件)

Toyoshima S, Wakamatsu E, Ishida Y, Obata Y, Kurashima Y, Kiyono H, Abe R. The spleen is the site where mast cells are induced in the development of food allergy. *Int Immunol*, 査読あり, vol.29,2017, p31-45.

Ohtsuka S, Ogawa S, Wakamatsu E, Abe R. Cell cycle arrest caused by MEK/ERK signaling is a mechanism for suppressing growth of antigen-hyperstimulated effector T cells. *Int Immunol*, 査読あり, vol. 28, 2016, p547-57.

Akieda Y, Wakamatsu E, Nakamura T, Ishida Y, Ogawa S, Abe R. Defects in regulatory T cells due to CD28 deficiency induce a qualitative change of allogenic immune response in chronic graft-versus-host disease. *J Immunol*, 査読あり, vol. 194,2015, p4162-74.

##### [学会発表](計 8 件)

Wakamatsu E, Omori H, Ogawa S, Abe R. The responsiveness to TCR stimulation of Treg subsets influences the dependency of their proliferation on CD28. The 7<sup>th</sup> International Kyoto T cell Conference. Mar 13<sup>th</sup>-Mar 17<sup>th</sup>, 2017, Shirankaikan, Kyoto, Kyoto.

Ogawa S, Watanabe S, Wakamatsu E, Ohtsuka S, Abe R. The effect of TCR and CD28 stimulation on tyrosine phosphorylation of CD28. The 45<sup>th</sup> Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. Dec 5<sup>th</sup>- Dec 7<sup>th</sup> 2016. Okinawa Convention Center, Okinawa, Ginowan.

若松英、大森宏樹、田畑由紀、小川修平、

安部良.細胞増殖への CD28 シグナルの効果は制御性 T 細胞サブセット間で異なる. 第 26 回 Kyoto T Cell Conference.2016 年 5 月 20-21 日.芝蘭会館,京都府,京都市.

Wakamatsu E, Omori H, Ogawa S, Abe R. CD28 makes different impacts on thymus- and peripherally-derived regulatory T cell for their maintenance. The 44<sup>th</sup> Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. Oct 18<sup>th</sup>- Oct 20<sup>th</sup> 2015.Sapporo Convention Center, Hokkaido,Sapporo. Omori H, Wakamatsu E, Kawano A, Tabata Y, Ogawa S, Abe R. CD28 co-stimulation is dispensable for the development of peripherally-derived regulatory T cells. The 44<sup>th</sup> Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. Oct 18<sup>th</sup>- Oct 20<sup>th</sup> 2015. Sapporo Convention Center,Hokkaido,Sapporo.

Toyoshima S, Wakamatsu E, Obata Y, Ogawa S, Abe R. Activated T cells control pathogenic mast cells under allergic conditions. The 44<sup>th</sup> Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. Oct 18<sup>th</sup>- Oct 20<sup>th</sup> 2015. Sapporo Convention Center, Hokkaido, Sapporo.

Ogawa S, Watanabe S, Wakamatsu E, Ohtsuka S, Abe R. Differential roles of CD28 YMM and PYAP motifs in acute GVHD induction. The 44<sup>th</sup> Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. Oct 18<sup>th</sup>- Oct 20<sup>th</sup> 2015.Sapporo Convention Center, Hokkaido Sapporo.

Wakamatsu E, Omori H, Akieda Y, Ogawa S, Abe R. Role of CD28 co-stimulation in the homeostasis of peripherally derived regulatory T cells. 第 25 回 Kyoto T Cell Conference.2015 年 5 月 15-16 日. 芝蘭会館,京都府,京都市.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

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

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

若松 英 (WAKAMATSU Ei)

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究  
所・助教

研究者番号：40632617

##### (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

( )