

令和元年6月21日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15723

研究課題名(和文) 制御性T細胞の特異的TCRシグナル制御と抑制機能の分子的基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular basis of Treg-specific TCR signaling regulation

研究代表者

田中 淳(Tanaka, Atsushi)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教(常勤)

研究者番号：00724105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、T細胞受容体(TCR)シグナル分子について、制御性T細胞における特異的な分子制御の解明を目的とした。制御性T細胞を含む各T細胞群について、生理的狀態やTCR刺激後など、細胞動態や免疫学的機能が異なる条件下において、TCRシグナル分子の遺伝子発現、タンパク発現レベルや分子修飾を比較し、各細胞群の弁別的なシグナル分子制御を解析した。特に、制御性T細胞は通常T細胞に比して、一部のTCRシグナル分子の機能を恒常的に低く維持することを明らかにし、制御性T細胞の機能と増殖の維持に重要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

制御性T細胞は異常・過剰な免疫応答を抑制することから、自己免疫病をはじめとする多様な免疫関連疾患の予防に必須な細胞である。特に、制御性T細胞はTCR刺激に対して特異的な反応を示すことから、その分子的基盤の解明は制御性T細胞による免疫応答制御や免疫疾患予防において重要である。さらに、TCRシグナルに関わる遺伝子の多型は、自己免疫疾患に最も関連性が高いことから、制御性T細胞におけるTCRシグナル制御の理解は、疾患治療法の開発など社会的にも重要だと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of the research was to elucidate the molecular mechanism specific to the regulation of T-cell receptor (TCR) signaling molecules in regulatory T cells. For this aim, we have analyzed transcriptional expression levels as well as protein expression levels and their modifications among each T-cell subset including regulatory T cells at physiological condition or upon TCR stimulations. Differentially expressed or modified TCR signaling molecules between regulatory T and conventional T cells were further compared with their immunobiological functions and kinetics of proliferation responses with or without TCR stimulation. The results indicated that regulatory T cells, compared with conventional T cells, constitutively maintain the activity of particular TCR signaling molecules at low levels and suggested their roles in maintaining the functions and proliferation kinetics specific to regulatory T cells

研究分野：免疫自己寛容

キーワード：免疫自己寛容 自己免疫病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

正常自己組織に対する免疫不応答、すなわち免疫自己寛容は免疫系の根幹であり、その破綻は致死的な自己免疫疾患の要因となる。制御性T細胞(regulatory T, 以下Tregと略)は、免疫自己寛容の確立と維持に枢要な細胞である。Tregは、異常・過剰な免疫反応の抑制に特化したT細胞群であり、自己抗原に対する免疫応答、あるいはアレルギーなどの過剰な免疫応答を抑制する。そしてTregの欠損は、IPEX症候群などの致死的な自己免疫疾患、炎症性腸疾患、重度のアレルギーを発症する。また、移植臓器拒絶、腫瘍免疫などのT細胞性免疫応答の抑制的制御や、微生物免疫応答の調節、血管の慢性炎症に基づく動脈硬化症の抑制、胎児母体免疫寛容維持と流産の阻止にも重要な役割を果たすと考えられている。一方、Tregは多くの腫瘍に浸潤するため、腫瘍内のTregの数的減少あるいは抑制能の減弱は、免疫応答の抑制を解除し、抗腫瘍免疫応答を増強する。近年、これらの疾患の新しい治療法として、Tregを標的とした免疫応答の抑制あるいは賦活化が注目を集めている。

TregはT細胞受容体(T-cell receptor, 以下TCRと略)の刺激に対して特異的な応答を示す。他のT細胞(Tconv)は、TCR刺激により、活性化されIL-2を産生し増殖するのに対し、Tregは増殖反応を示さずIL-2を産生しない。一方、Tregは、Tconvの活性化よりも低い刺激(低抗原ペプチド濃度)で、抑制能を発揮する。さらに、TregのTCRレパトアは、T細胞に比して自己反応性が高いことが知られており、胸腺におけるTregの発生と選択には、より強いTCRシグナルが必要である。これらTregの免疫学的特徴は、Tconvと同じT細胞でありながら、TCR刺激により、Tconvの活性・増殖を抑制する、Tregの相反した機能の維持に重要であると考えられる。そこで、この免疫学的特徴の要因として、TregとTconvのTCRシグナル分子の弁別的制御に着目した。特に、TCR直下のシグナル分子であるZAP-70の発現は、Tregでは恒常的に低く、またTCR刺激後に、Tconvでは発現を亢進するのに対し、Tregはさらに減少する。さらに、Tregの特異的な転写因子であるFoxp3は、ZAP-70遺伝子のプロモーター領域に結合し、またFoxp3の強制発現はZAP-70の発現を抑制することから、TregはFoxp3によりTreg特異的にZAP-70を制御することが明らかになった。このTreg特異的抑制は、ヒトとマウスのTregに共通した特性である。さらに、ZAP-70遺伝子変異は、胸腺での自己反応性T細胞の除去が障害されると同時に、Treg産生の減少と抑制機能が減弱する。その異常は、ZAP-70変異を有するマウスにおいてT細胞依存性関節炎を惹起する要因として考えられる。また、これらの関節炎を発症するマウスに、機能的に正常なTregを移入すると、自己免疫疾患の発症を抑えることから、ZAP-70変異は相対的にTregの抑制機能を強く阻害し、免疫寛容の破綻につながると考えられる。したがって、Tregで特異的に制御されるTCRシグナル分子の異常は、Treg抑制機能の維持に重要であると考えられる。一方、その阻害はTregを選択的に減弱するとの予備的知見を得ており、新規のがん免疫療法の標的分子としても有望であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、制御性T細胞の特異的なT細胞受容体(TCR)シグナル制御とその免疫学的特性について分子基盤の解明を目的とする。特に、TCR刺激は、通常のT細胞を活性化・増殖させるのに対し、制御性T細胞は増殖せず他のT細胞の活性および増殖を抑制する免疫学的特性を有する。また、制御性T細胞は、ZAP-70等のTCRシグナル分子を、転写あるいはタンパクレベルで特異的に制御するため、通常T細胞と制御性T細胞の機能を弁別するメカニズムを明らかにする。さらに、このシグナル制御により、自己反応性の高いTCRを持つ制御性T細胞の恒常性を維持する分子的機構について解明をめざす。その理解は、免疫疾患やがん免疫において、制御性T細胞特異的TCRシグナル制御を標的とし、制御性T細胞を選択的にコントロールする新しい制御法の確立にも重要だと考えられる。

3. 研究の方法

本研究では、制御性 T 細胞の特異的シグナル制御と抑制機能を確立する原理を明らかにするために、(1) Foxp3 依存的あるいは非依存的に制御される TCR シグナル分子の制御機構の解明、(2) タンパク修飾による TCR シグナル分子制御の検証、(3) 制御性 T 細胞の維持・抑制能における Treg 特異的 TCR シグナル制御の役割、(4) Treg 特異的 TCR シグナル制御を標的とした疾患モデルでの検証を、研究の 4 本柱とした。特に、mRNA 発現などの探索的解析から得られる知見は、制御性 T 細胞の特異的シグナル制御と、その抑制機能を直結あるいは鍵となる情報が得られるため、それらを有機的に関連させ、分子的基盤の解明をめざした。

4. 研究成果

本研究では、T 細胞受容体(TCR)シグナル分子について、制御性 T 細胞(Treg)における特異的な分子制御の解明を目的とした。TCR 刺激により誘導される TCR シグナルは、通常の T 細胞を活性化し増殖させるのに対し、Treg は増殖せず前者の活性・増殖を抑制するといった免疫学的特性を示すことから、両者における TCR シグナル伝達の制御機構は異なると考えられた。また、TCR シグナル制御の違いは、両者の免疫学的機能を弁別するメカニズムとしても重要であると考えられる。本研究では、まず Treg 特異的に制御される TCR シグナル分子を探索し、解析を行った。Treg 細胞と CD4+ T 細胞、CD8+ T 細胞について、これらの細胞群から、次世代シーケンサーによる遺伝子発現の網羅的解析、および生理状態あるいは TCR 刺激後に Treg 特異的に制御される TCR シグナル分子について解析した。さらに、通常の CD4+ T 細胞、CD8+ T 細胞、Treg 細胞に発現される TCR シグナル分子について、転写発現レベルに加えタンパクレベルの発現や分子修飾の差異を解析した。Treg は通常 T 細胞に比して、一部の TCR シグナル分子のリン酸化レベルが恒常的に低く、Treg に特異的な TCR シグナル分子制御としてタンパク修飾による抑制が明らかになった。また、Treg は、自己反応性の高い TCR レパトアを有するが、自己抗原による恒常的な TCR シグナルを制御し、自身を維持する制御機構についても検証を行った。特に、Treg では、TCR 刺激後に ZAP-70 分子の発現が低下し、一方、CD4+ T 細胞では亢進を示すことから、ZAP-70 発現量を過剰発現できる Tet-on ZAP-70 マウスを用い、Treg に特異的なシグナル分子制御の役割を解析した。Tet-on ZAP-70 マウスにより、Treg における ZAP-70 発現抑制を解除すると、Treg は TCR 刺激に対して、低増殖状態を維持できず、通常の CD4+ T 細胞と同様に増殖を示した。これらの結果から、Treg は、ZAP-70 の発現抑制により、自己抗原認識等に由来する強い TCR シグナル誘導を制御し、Treg の機能およびその増殖の維持に重要であると考えられた。さらに、Treg で特異的な制御をうける TCR シグナル分子は、Treg の維持あるいはその機能を選択的にコントロールする上で重要な標的になると考えられ、低分子阻害剤による試験管内でのシグナル阻害による効果および自己免疫病や腫瘍などの疾患モデルマウスにおける効果を遺伝子改変マウスで検証した。Treg は、これらの TCR シグナル分子の操作に感受性が高く、他のナイーブ・活性化 T 細胞に比して選択的に影響されることを明らかにし、その理解は、新しい制御性 T 細胞の選択的制御法の確立に重要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 6 件)

英文

Danbee Ha, Atsushi Tanaka, Tatsuya Kibayashi, Atsushi Tanemura, Daisuke Sugiyama, James B. Wing, Ee Lyn Lim, Karen Tang, Dennis Adeegbe, Evan W. Newell, Ichiro Katayama, Hiroyoshi

Nishikawa, and Shimon Sakaguchi, Differential control of human Treg and effector T cells in tumor immunity by Fc-engineered anti-CTLA-4 antibody *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2019 116:609-618. 査読有

James B Wing, Atsushi Tanaka, Shimon Sakaguchi. Human FOXP3⁺ Regulatory T Cell Heterogeneity and Function in Autoimmunity and Cancer. *Immunity* 50: 302-316, 2019 査読有

Takahiro Kamada, Yosuke Togashi, Danbee Ha, Akinori Sasaki, Yoshiaki Nakamura, Eiichi Sato, Shota Fukuoka, Yasuko Tada, Atsushi Tanaka, Akihito Kawazoe, Takahiro Kinoshita, Kohei Shitara, Shimon Sakaguchi, Hiroyoshi Nishikawa. PD-1⁺ regulatory T cells amplified by PD-1 blockade promote hyperprogression of cancer. 2019 *Proc Natl Acad Sci U S A*. 116 (20) 9999-10008, 2019 査読有

Hirota, K., Ito, Y., Hashimoto, M., Watanabe, H., Kondoh, G., Tanaka, A., Yasuda, K., Kopf, M., Potocnik, AJ, Stockinger, B., Sakaguchi, N., Sakaguchi, S. An inflammatory cellular cascade of autoimmune Th17 cells, GM-CSF-producing ILC2 and synoviocytes in the development of autoimmune arthritis. *Immunity* 2018 48(6):1220-1232.E5. 査読有

Tanaka, A., and Sakaguchi, S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Res*. 2017 27(1):109-118. 査読有

和文

田中淳「Treg分化と機能におけるTCRシグナルの役割」『医学のあゆみ』、268(13):1086-1090, March 2019 査読無

〔学会発表〕(計3件)
海外

Atsushi Tanaka, Treg-specific control of TCR signaling molecules, Keystone Symposia: Uncovering Mechanisms of Immune-Based Therapy in Cancer and Autoimmunity (B3) February 18-22, 2019, Breckenridge, Colorado, USA.

国内

田中淳、「制御性T細胞と腫瘍免疫」、Immuno-Checkpoint Blockade Seminar in Osaka 2018, 2018年1月12日、大阪府大阪市

Atsushi Tanaka, Treg-specific control of TCR signaling molecules, 第46回日本免疫学会総会・学術集会 2017年12月12-14日、宮城県仙台市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計2件)

名称:癌治療用医薬組成物
発明者: 国立大学法人大阪大学、塩野義製薬株式会社
権利者: 同上
種類: 特許
番号: PCT/JP2018/012644
出願年: 2018.3.28
国内外の別: 国内

名称:新規抗 CCR8 抗体
発明者:国立大学法人大阪大学、塩野義製薬株式会社
権利者:同上
種類:特許
番号:特願 2018-245044
出願年:2018.12.27
国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

<http://exp.immunol.ifrec.osaka-u.ac.jp>
http://www.ifrec.osaka-u.ac.jp/jpn/laboratory/shimon_sakaguchi/

6. 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。