

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007 -2008

課題番号：19790682

研究課題名(和文) T細胞アナジー誘導遺伝子に関連した新規抑制性T細胞サブセットの解明

研究課題名(英文) Analysis of a novel regulatory T cell subset associated with a T cell anergy inducing gene

研究代表者

藤尾 圭志 (FUJIO KEISHI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 70401114

## 研究成果の概要：

これまで自己免疫応答を抑制する制御性T細胞として、CD4陽性CD25陽性Foxp3陽性T細胞以外の制御性T細胞の存在が推測されてきた。分担研究者らはIL-10を高産生するCD4陽性CD25陰性LAG3陽性T細胞を同定し、この細胞集団がマウスの腸炎をIL-10依存性に抑制する活性を持つ、新たな制御性T細胞集団であることを発見した。CD4陽性CD25陰性LAG3陽性T細胞の分化は機能的Foxp3欠損マウスにおいても認められ、Foxp3に依存しないと考えられた。CD4陽性CD25陰性LAG3陽性T細胞は、IL-10・LAG-3遺伝子と共にアナジーに関連する転写因子Egr2を高発現しており、Egr2はCD4陽性T細胞にLAG3発現とIL-10産生の形質を付与することが明らかとなった。そしてEgr-2を遺伝子導入したCD4陽性T細胞の生体への移入により、抗原特異的免疫応答に抑制能を付与できることが分かった。B細胞欠損マウスおよび無菌 Germ free マウスの解析によりCD4陽性CD25陰性LAG3陽性T細胞の分化がB細胞及び腸内細菌叢に依存していることを示唆する結果が得られた。今後CD4陽性CD25陰性LAG3陽性T細胞の分化機構およびCD4陽性T細胞でのEgr2の発現機構を解明することで、新たな自己免疫疾患治療法の開発につながる可能性があると考えられる。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：膠原病・アレルギー・感染症内科学

キーワード：免疫寛容、リンパ球、サイトカイン、獲得免疫、免疫制御

## 1. 研究開始当初の背景

生体は自己と外来物を精密に区別して対応することにより維持されており、このメカニズムを免疫系という。免疫系は本来自己の構

成タンパクに対しては寛容状態となっているが、何らかの条件により自己タンパクに対する免疫応答を生ずることがあり、これを自己免疫応答という。自己免疫が深く関与してい

る疾患としては膠原病・関節リウマチが知られているが、動脈硬化・癌・神経変性疾患にも自己免疫が関与していることが分かってきており、自己免疫応答・寛容の解明は広範な疾患の病態解明に非常に重要である。自己免疫応答・寛容のメカニズムについては急速に解明が進んできているが、特に自己免疫寛容の維持に重要と考えられているのが制御性 (regulatory) T細胞である。制御性T細胞はCD4陽性CD25陽性細胞の表現型をもち、糖尿病・腸炎・多発性硬化症・関節炎・移植など多くのマウス疾患モデルにおいて治療効果を示し、多様な自己抗原の自己免疫寛容に関与すると考えられている。近年CD4陽性CD25陽性制御性T細胞を規定する重要な転写因子としてFoxp3が報告された。Foxp3を欠損したヒトやマウスはリンパ球の臓器浸潤を伴うリンパ増殖性の自己免疫疾患を発症する。制御性T細胞に関してはFoxp3の機能解析を中心として、世界中で精力的な解析が進められている。しかしFoxp3により規定されるCD4陽性CD25陽性制御性T細胞以外にも、生体内で自己免疫寛容を担っている未知の制御性T細胞が存在する可能性がある。ハーヴァード大学のDiane MathisらはFoxp3に加え胸腺での中枢性免疫寛容を担うAire遺伝子を欠損したマウスでも、中枢神経・関節・小腸・内分泌腺が保たれることから、Foxp3に依存しない末梢免疫寛容のメカニズムを想定している (Proc Natl Acad Sci USA. 2005, 41: 14735 -14740)。

自己免疫応答を抑制する制御性T細胞としてCD4陽性CD25陽性Foxp3陽性制御性T細胞が知られている。しかし機能的Foxp3欠損マウスで炎症を生じない臓器も複数みられ、CD4陽性CD25陽性Foxp3陽性制御性T細胞以外の免疫寛容メカニズムの存在が推測されている。従来IL-10を産生する制御性T細胞として試験管内で誘導されるTr1が報告されているが、マーカーなど生物学的特性が明らかでないことから、生体内で恒常的に存在するかどうかは分かっていなかった。多発性硬化症患者ではCD4陽性CD25陽性Foxp3陽性制御性T細胞機能の低下と共にTr1の誘導が低下しているとの報告もあり (J Clin Invest. 2006, 116: 3252-7.) Tr1様のIL-10産生細胞の同定・解析は非常に重要性が高いと考えられた。

## 2. 研究の目的

研究代表者らは生体内で恒常的に存在し、CD4陽性CD25陽性Foxp3陽性制御性T細胞とは異なる制御性T細胞サブセットの同定・機能解析を試みた。同定したCD4陽性CD25

陰性LAG3陽性制御性T細胞の分化様式をCD4陽性CD25陽性Foxp3陽性制御性T細胞と比較し、CD4陽性CD25陰性LAG3陽性制御性T細胞の分化にFoxp3が必要かどうか検討した。さらにこの制御性T細胞の表現型を規定する転写因子をマイクロアレイ解析で検討した。本研究ではこれらの解析によりCD4陽性CD25陰性LAG3陽性制御性T細胞の分化様式・機能メカニズムを検討し、免疫寛容系におけるCD4陽性CD25陰性LAG3陽性制御性T細胞の位置づけを明らかにすることを試みた。

## 3. 研究の方法

抑制性分子LAG-3に着目しC57BL/6マウス脾臓・パイエル板においてFACS解析を行った。LAG-3をマーカーとしてマウス脾臓よりソーティングにより細胞集団を分取した。さらにナイーブT細胞との培養実験で抑制能を検討した。またCD4陽性CD25陰性LAG3陽性制御性T細胞の生体への移入実験を行った。移入したモデルはRAG1ノックアウトマウスにCD4陽性CD45RB陽性ナイーブT細胞を移入することによる腸炎モデル、及び機能的Foxp3欠損Scurfyマウスである。腸炎モデルではIL-10ノックアウトマウス由来のCD4陽性CD25陰性LAG3陽性制御性T細胞の移入も行った。マイクロアレイ解析ではAffymetrix gene chipを用い、CD4陽性CD25陰性LAG3陽性制御性T細胞、CD4陽性CD25陽性制御性T細胞、CD4陽性CD25陰性LAG3陰性T細胞及び、CD4陽性CD45RB陽性ナイーブT細胞の4集団の発現遺伝子をクラスター解析により比較した。CD4陽性CD25陰性LAG3陽性制御性T細胞で発現が亢進していたアナジール関連遺伝子Egr2に着目し、レトロウイルスベクターpMIG及び高効率パッケージング細胞PLAT-EによりマウスCD4陽性T細胞にEgr2遺伝子を導入した。導入細胞よりcDNAを合成し、誘導された遺伝子を定量PCRにより検討した。さらにEgr2遺伝子導入細胞をOVA免疫後の細胞に移入し、OVAに対する遅延型過敏反応の抑制実験を行った。またB細胞を欠損する $\mu$ MTノックアウトマウス、無菌状態のGerm freeマウスにおいても解析を行った。

## 4. 研究成果

LAG-3をマーカーとして発現する細胞集団を、マウス脾臓のFACS解析で検討したところ、CD4陽性CD25陰性CD45RB陰性LAG3陽性T細胞(以下CD4陽性CD25陰性LAG3陽性T細胞と記載)を同定した。CD4陽性

CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞は IL-10 を高産生し、RAG1 ノックアウトマウスへの CD45RB 高発現 CD4 陽性 T 細胞の移入による腸炎の発症を IL-10 依存的に抑制した。機能的 Foxp3 遺伝子欠損 Scurfy マウスにおいては、試験管内での抑制活性のある CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞が増加していた。CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞の分化機構を解明するために様々なマウスにおける CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞を検討した。まず B 細胞を欠損する  $\mu$ MT ノックアウトマウスを解析したところ、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞は脾臓においてもパイエル板においても著明に減少していた。また GermfreeC57BL6 マウスにおいても SPFC57BL6 マウスと比較して CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞が脾臓においてもパイエル板においても著明に減少していた。

マイクロアレイ解析においても、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞は Egr2, IL-10, LAG3, Blimp-1 を高発現し、CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞とは明らかに異なる遺伝子発現プロファイルであった。転写因子 Egr-2 は神経系で発現し、菱脳の形成や髄鞘形成に重要とされ、近年 T 細胞のアナジーに関連することが報告されたが (Safford et al., *Nat Immunol* 6:472,2005) 直接抑制能と関連があるとは考えられていなかった。CD4 陽性 T 細胞に Egr-2 遺伝子を導入した細胞の抑制能を検討してみると、Foxp3 遺伝子導入細胞と同等の抗原特異的遅延型過敏反応抑制能を示すことが分かった。そこで Egr-2 導入 CD4 陽性 T 細胞の各種抑制性遺伝子発現を検討したところ、抑制性サイトカイン IL-10 と抑制機能のある膜表面分子 LAG-3 の mRNA およびタンパク発現が著明に増加しが発現しており、Egr-2 導入細胞の抑制能に関連していると考えられた。

以上の結果から IL-10 を高産生する Egr2 発現 CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞は、Tr1 類似の新規制御性 T 細胞サブセットと考えられた。CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞は機能的 Foxp3 欠損マウスでも分化が認められ、その分化メカニズムは CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞とは異なると考えられた。そして CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞の分化には B 細胞及び腸内細菌叢が重要と考えられた。最近 Egr2 遺伝子近傍に回腸型クローン病の感受性 SNP が存在することが報告されており (Nature Genetics 39: 596, 2007) 腸管免疫における CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞の機能と炎症性腸疾患発症が関連している可能性

が推測される。

臨床的に感染症が自己免疫疾患の発症や増悪に関連する可能性が指摘されている。本研究はそのような臨床的視点から提起された問題点に関して、基礎的に研究を進めている点の特徴である。この CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞の解析は分子の機能解析に止まらず、外来抗原および自己抗原に対する免疫寛容という免疫系の中でも重要な領域の解明に寄与すると考えられ、臨床的な重要性も高く独創的であるといえる。今後 CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞の解析を進めることにより外来抗原に対する抗原特異的免疫制御法の開発に新しい方向性が開けると考えられる。さらにこの新規制御性 T 細胞の分化機構および CD4 陽性 T 細胞での Egr2 の発現機構を解明することで、新たな自己免疫疾患治療法の開発につながる可能性があると考えられた。

## 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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

- (1) Yamamoto Kazuhiko, Okamura Tomohisa, Shibuya Mihoko, Sumitomo Shuji, Shoda Hirofumi, Sakaguchi Shimon, Fujio Keishi.  
IL-10 producing CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells naturally present in the immune system  
第 38 回日本免疫学会総会・学術総会 シンポジウム 京都 (2008.12.1)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]

なし

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

藤尾 圭志 (FUJIO KEISHI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70401114

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし