

機関番号：13201

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390294

研究課題名 (和文) 成長に伴う制御性 T 細胞の機能発達とその異常に関する研究

研究課題名 (英文) Functional maturation of regulatory T cells during child growth and their disorders

研究代表者

宮脇 利男 (MIYAWAKI TOSHIO)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・教授

研究者番号：10143885

研究成果の概要 (和文)：本研究では、ヒトの制御性 T 細胞の先天性欠損症 (IPEX) の病態解明を通じてその機能発達を明らかにすることを目的とした。フローサイトメトリーを用いた簡易診断法を開発し、我国における IPEX の発掘に努め、新たな症例を同定した。IPEX 患者、骨移植例、保因者、新生児、健康成人を対象とした検討から、IPEX の責任遺伝子産物 FOXP3 がヒトの制御性 T 細胞の発達・分化に果たす役割の一端を明らかにできた。

研究成果の概要 (英文)：This study was intended to elucidate the functional maturation process of human regulatory T (Treg) cells through the pathogenic examination of congenital deficiency of Treg cells (IPEX). We developed the simple and easy method by flow cytometry for detection of IPEX patients, resulting in identification of some new IPEX cases in Japan. Based on the analyses of IPEX patients, the IPEX case undergoing bone marrow transplantation, carriers, newborns and healthy adults, it could partially be clarified that FOXP3, the product of the gene responsible for IPEX, plays a crucial role in development and differentiation of Treg cells in humans.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：小児科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：制御性 T 細胞、FOXP3 遺伝子、IPEX、フローサイトメトリー、遺伝子解析、IL-7 受容体

1. 研究開始当初の背景

免疫系は、生体にとり有害な細菌やウイルスなどの外来抗原を非自己として認識・応答し、排除する高次機構である。免疫応答が惹起・強化されることは生体にとって有利である一方、免疫応答の場存在する自己を免疫応答による攻撃からいかに守るかが重要で

ある。免疫系は、このような攻撃と防御の二面性を有効かつ安全に機能させるために、種々の局面において相反する機能をもってそのバランス調節を行っている。つまり、非自己を認識する機能としての「自然免疫」や「獲得免疫」に対して、自己を認識して免疫応答の対象から外す「免疫寛容」があり、ま

た「細胞性免疫」に關与する Th1 細胞と「液性免疫」に關与する Th2 細胞が相對する細胞の機能を制御している。一方、自己免疫疾患やアレルギー疾患などは、この調整機能の破綻に一部起因するものと推測されている。

近年、京大の坂口博士らによるエレガントな動物実験の知見から免疫応答に抑制的に働く CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞の存在が示され、免疫寛容における制御性 T 細胞の役割に多大な関心もたれている。最近、制御性 T 細胞の発生と分化にマスター分子として機能する FOXP3 が同定された。FOXP3 をコードする遺伝子は X 連鎖性免疫不全症マウスの scurfy マウスから同定され、ヒトでは難治性下痢や皮膚炎さらには内分泌多臓器障害を伴う致死的免疫不全症の IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome) の責任遺伝子であることが明らかとなった。このような背景から、制御性 T 細胞の機能の解明が自己免疫疾患やアレルギー疾患における新たな治療法の開発につながるものとの観点から、FOXP3 発現を指標として、実験動物のみならずヒトにおいて制御性 T 細胞に関する研究を進める気運にある。

しかし、ヒトの制御性 T 細胞の機能発達の詳細とその異常の及ぼす臨床像については不明な点が多かった。

2. 研究の目的

ヒトの制御性 T 細胞を含めた免疫応答は、生後増加する外来抗原の暴露に対応して成熟するものと考えられる。我々は、ヒト FOXP3 単クローン抗体を用いたフローサイトメトリー解析から、FOXP3 陽性制御性 T 細胞が生後間もなくより成人比率と同程度であるものの、乳幼児期では FOXP3 陽性制御性 T 細胞の大部分がナイーブ形質

(CD45RA 陽性)であるのに対して、成人ではメモリー形質 (CD45RO 陽性)のものが優位を占めることを明らかにし、両者の間になんらかの機能的違い、つまり加齢に伴う役割分担が示唆されることを報告した。また、全国で現在生存中の IPEX 症例についてフローサイトメトリー解析を行い、FOXP3 陽性制御性 T 細胞が欠損すること、FOXP3 遺伝子変異と臨床症状に相関がみられることを観察した (Fuchizawa T et al. Clin Immunol, 125, 37, 2007)。

本研究では、1) 我国における IPEX 症例の発掘を積極的に図ること、2) 小児の自己免疫疾患、アレルギー疾患及び造血幹細胞移植例における制御性 T 細胞の動態を解析すること、3) ナイーブ形質制御性 T 細胞とメモリー形質制御性 T 細胞の機能的違いにつき検討を行うこと、等を通じて、成長に伴うヒトの制御性 T 細胞の機能発達の全貌を明らかにす

ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト制御性 T 細胞のフローサイトメトリー解析
静脈血より末梢血リンパ球を分離、抗ヒト FOXP3 単クローン抗体にて細胞内 FOXP3 を染色し、他の細胞表面マーカー (CD25、CD127、CD45RA) を組み合わせることにより、制御性 T 細胞の形質の特徴や動態を解析した。対象として、IPEX 疑い例、IPEX 症例、IPEX 骨髓移植例、IPEX 保因者、新生児臍帯血、アトピー皮膚炎等のアレルギー疾患患者、健康成人対照者につき検討した。尚、IPEX 疑い例の中で、ヒト制御性 T 細胞の欠損状態若しくは FOXP3 蛋白低下を呈する例については遺伝子解析に供し、FOXP3 遺伝子変異を同定し、確定診断に寄与した。

(2) ヒト制御性 T 細胞の機能解析

末梢血リンパ球より MACS にて CD4⁺T 細胞を分離、CD25、CD127、CD45RA を細胞表面染色し、ヒト制御性 T 細胞をフローサイトメトリーにてインタクトな状態で単離し機能解析に供した。ヒト制御性 T 細胞の基本的な機能としての増殖抑制で判定した。非制御性 T 細胞を、放射線照射抗原提示細胞と共に、抗 CD3 抗体刺激培養及び混合刺激培養を行い、増殖はトリチウム・チミジンの取り込みで評価した。

4. 研究成果

(1) ヒトの制御性 T 細胞の遺伝的異常症の IPEX のスクリーニングとして 5 カラーフローサイトメトリーによる解析法を開発、FOXP3 遺伝子変異解析を併用して、我国の IPEX の発掘に努め、10 数例の疑い例から、ネフローゼ症候群を合併した典型例に加え、比較的軽症な IPEX 例を新たに診断した。フローサイトメトリー法によるスクリーニングは、IPEX の臨床的多様性を明らかにする意味で有用であることを検証した。

(2) 制御性 T 細胞は非制御性 T 細胞に比べ IL-7R (CD127) 発現が弱い。IPEX 症例を対象に、CD127 発現と FOXP3 発現との関係を検討した。IPEX では制御性 T 細胞が欠損とされるが、FOXP3 発現が欠損・微弱にも関わらず、一部の症例で CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}T 細胞が存在し、機能的に弱いながらも明らかに抑制活性を有し、制御性 T 細胞の前駆細胞である可能性を提唱した。この知見は、ヒトの制御性 T 細胞の発達・分化を理解する上で新たな方向性を提供した。

(3) 制御性 T 細胞の前駆様細胞は保因者の母親にも存在し、母親の CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}T 細胞における FOXP3 発現は X 染色体のランダムな不活化を反映して 2 峰性になる。母親をド

ナーとして骨髄移植を行った症例の生着を経時的に制御性T細胞の生着を追った。移植早期には、まずFOXP3陰性CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}T細胞が末梢血に現れ、最終的にFOXP3陽性のCD4⁺CD25⁺CD127^{dim}T細胞が出現、このようなCD4⁺CD25⁺CD127^{dim}T細胞のFOXP3発現は2峰性を呈することを確認した。

(4) 末梢血における制御性T細胞としてのFOXP3陽性CD4⁺CD25⁺T細胞は、生後に始まり成人期にかけて一定であった。代表的アレルギー疾患のアトピー性皮膚炎の末梢血中の制御性T細胞の頻度を検討したところ、制御性T細胞の比率は正常に比べ有意に高いこと、臨床的重症度と相関のあること、治療により正常化することなどから、FOXP3陽性制御性T細胞がアトピー性皮膚炎の病態に何らかの関与をしていることを明らかにした。

(4) 制御性 T 細胞にはナイーブ形質とメモリー形質の 2 種類存在する。これらをCD4⁺CD25⁺CD127^{dim}T 細胞における CD45RA 発現で分別し、FOXP3 発現と抑制活性について比較検討した。ナイーブ制御性 T 細胞はメモリー制御性 T 細胞に比べ FOXP3 発現及び抑制活性が弱いことを確認した。この事実もまた制御性 T 細胞の機能発現に FOXP3 が重要であることが支持した。

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 82 件)

- ① Nakagawa N, Imai K, Kanegane H., Miyawaki T., and Nonoyama S. et al (24 名中 23 番目). Quantification of κ -deleting recombination excision circles in Guthrie cards for the identification of early B-cell maturation defects. J Allergy Clin Immunol 査読有、印刷中.
- ② Kawakami C, Inoue A, Takitani K, Kanegane H., Miyawaki T., Tamai H. X-linked agammaglobulinemia complicated with endobronchial tuberculosis. Acta Paediatr、査読有、2011、100 巻、466-468.
- ③ Zhao M., Kanegane H., Ouchi K., Imamura T., Iatour S., and Miyawaki T.: A novel XIAP mutation in a Japanese boy with recurrent pancytopenia and splenomegaly. Haematologica、査読有、2010、95 巻、688-689.
- ④ Ito Y., Adachi Y., Itazawa T., Okabe Y., Adachi S.Y., Katsunuma T., and Miyawaki T.: Comparison of exhalation time methods (6 sec vs. 10 sec) of a hand-held exhaled nitric oxide analyzer. Pediatr Pulmonol、査読有、2010、45 巻、1005-1008.
- ⑤ Kanegane H., Nakano T., Shimono Y., Zhao M., and Miyawaki T.: *Pneumocystis jiroveci* pneumonia as an atypical presentation of X-linked agammaglobulinemia. Int J Hematol、査読有、2009、89 巻、716-717.
- ⑥ Hashimura Y, Nozu K, Kanegane H., Miyawaki T. et al. (10 名中 4 番目). Minimal change nephrotic syndrome associated with immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome. Pediatr Nephrol、査読有、2009、24 巻、1181-1186.
- ⑦ Wang Y., Kanegane H., Miyawaki T. et al (9 名中 9 番目): Mutation of the BTK Gene and clinical feature of X-linked agammaglobulinemia in Mainland China. J Clin Immunol、査読有、29 巻、2009、352-356.
- ⑧ Aghamohammadi A., Kanegane H., Miyawaki T. et al (10 名中 10 番目): Neutropenia associated with x-linked agammaglobulinemia in an Iranian referral center. Iran J Allergy Asthma Immunol、査読有、2009、8 巻、43-47.
- ⑨ Morinishi Y., Kanegane H., Miyawaki T. et al (35 名中 32 番目): Identification of severe combined immunodeficiency by T-cell receptor excision circles quantification using neonatal guthrie cards. J Pediatr、査読有、2009、155 巻、829-833.
- ⑩ Ito Y., Adachi Y., Makino T., Higashiyama

H., Fuchizawa T., Shimizu T., and Miyawaki T.: Expansion of FOXP3-positive CD4⁺CD25⁺ T cells associated with disease activity in atopic dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immun.*、査読有、2009、103 巻、160-165.

- ⑪ Otubo K., Kanegane H., Nomura K., and Miyawaki T.: Atypical lymphoproliferative disorder in a patient with X-linked thrombocytopenia. *Pediatr Blood Cancer.*、査読有、2008、51 巻、443-444.
- ⑫ Kanegane H., Adachi Y., Miyawaki T. et al (9 名中 9 番目): A *CIAS1* mutation in a Japanese girl with familial cold autoinflammatory syndrome. *Eur J Pediatr.*、査読有、2008、167 巻、245-247.
- ⑬ Taneichi H., Kanegane H., Miyawaki T. et al (10 名中 10 番目): Toll-like receptor signaling is impaired in dendritic cells from patients with X-linked agammaglobulinemia. *Clin Immunol.*、査読有、2008、126 巻、148-154.

[学会発表] (計 237 件)

- ① Kanegane H., Otsubo K., Yang X., Kamachi Y., Kobayashi I., and Miyawaki T.: Identification of FOXP3-negative regulatory T-like (CD¹²⁷^{dim} CD25⁺CD4⁺) cells in patients with IPEX. 14th Meeting of the European Society for Immunodeficiencies, 2010, 10, 6-9, Turkey.
- ② Kanegane H., Koura U., Sakaki H., Otsubo K., Nomura K., Morio T., Wada T., Yachie A., Oshima K., Ohara O., and Miyawaki T.: T-B+NK⁺ severe combined immunodeficiency caused by a common gamma chain deficiency. 2010 First American Primary Immune Deficiency National Conference, 2010, 5, 20-23,

Philadelphia, USA.

- ③ Miyawaki T.: Early recognition of primary immunodeficiency disease by flow cytometry. 13th Asian pacific congress of pediatrics, 2009. 10, 14-18, Shanghai, China.
- ④ Adachi Y., Okabe Y., Itazawa T., Adachi Y.S., Miyawaki T., Odajima H., Ohya Y., and Akazawa A.: Validity of a questionnaire for diagnosis of asthma in younger children. 65th Annual Meeting of American Academy of Allergy & Immunology, 2009, 3, 13-17, Washington DC, USA.
- ⑤ Kanegane H., Yamada M., Zhao M., Futatani T., Oh-ishi T., Sakiyama Y., Ariga T., and Miyawaki T.: A Japanese patients with X-linked agammaglobulinemia and deafness caused by contiguous X-chromosome deletion including the *BTK*, *TIMM8A*, *TAF7L*, and *DRP2* genes. The 13th meeting of the European Society for Immunodeficiencies, 2008, 10, 16-19, Netherlands.
- ⑥ Miyawaki T.: Variable EBV infection situation in children. International workshop on Pediatric immunology, 2008, 10, 21-23, Chongqing, China.

[図書] (計 12 件)

- ① 宮脇利男: 16 章. 原発性免疫不全. 「免疫学イラストレイテッド第 7 版」, 高津聖志他監訳, 南江堂, 東京, 299-310, 2009.
- ② 宮脇利男: 免疫不全. 「新臨床内科学」, 貫和敏博他編, 医学書院, 東京, 1514-1519, 2009.
- ③ 足立雄一: アレルギーの環境因子. 「免疫機構制御の理解とアレルギー発症のメカニズム」 中西憲司他編, 羊土社, 東京, 170-175, 2009.

- ④ 足立雄一, 伊藤靖典, 宮脇利男: 気管支喘息. 炎症・再生医学事典. 松島綱治他編,朝倉書店, 東京, 256-259, 2009.
- ⑤ 金兼弘和: 4章 免疫・アレルギー・膠原病. 「図解小児科」, 久保田健夫他編, 金芳堂, 京都, 95-134, 2009.
- ⑥ Aghamohammadi A., Lougaris V., Plebani A., Miyawaki T. Anne Durandy., and Hammarstrom L.: Chapter 3 Predominantly antibody deficiencies. 「Primary immunodeficiency diseases」, Rezaei N., Aghamohammadi A., Notarangelo L.D. eds., Springer, Berlin Heidelberg, 97-130, 2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮脇 利男 (MIYAWAKI TOSHIO)
富山大学・大学院医学薬学研究部・教授
研究者番号：10143885

(2) 研究分担者

金兼 弘和 (KANEGANE HIROKZU)
富山大学・大学病院・講師
研究者番号：00293324
足立 雄一 (ADACHI YUHICHI)
富山大学・大学病院・講師
研究者番号：80184191