

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890057

研究課題名（和文） アレルギー性気道炎症における内在性及び肺局所誘導性制御性 T 細胞の挙動と役割の解析

研究課題名（英文） the behavior and role of naturally occurring and induced regulatory T cells in allergic airway inflammation

研究代表者

今村 充 (Imamura Mitsuru)

東京大学・保健・健康推進本部・助教

研究者番号：80529157

研究成果の概要（和文）：アレルギー性気道炎症における内在性及び肺局所誘導性の制御性 T 細胞の効果を、遺伝子改変マウスを用いて解析した。気道炎症を惹起した際に、肺局所における抗原特異的な誘導性制御性 T 細胞の出現が確認できたが、一方、今回の検討では、誘導性制御性 T 細胞による気道炎症に対する明らかな効果は認められなかった。また、抗原特異的な内在性制御性 T 細胞の移入による気道炎症の抑制効果は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the effect of naturally occurring regulatory T cells (nTregs) and induced regulatory T cells (iTregs) in allergic airway inflammation using gene-modified mice. Antigen specific iTregs were induced by airway inflammation, whereas airway inflammation was not changed by iTregs. On the other hand, the transfer of antigen-specific nTregs did not affect airway inflammation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010 年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：制御性 T 細胞、気道炎症

## 1. 研究開始当初の背景

一般に CD4<sup>+</sup>T 細胞のサブセットは、CD25<sup>+</sup>で、effector T 細胞になりうる conventional T cell (Tc)と、制御性 T 細胞(Treg)に大きく分けられる。更に Treg は、胸腺で発生し、自然な状態で末梢にも存在する内在性制御性 T 細胞(naturally occurring regulatory T cell:nTreg)と、末梢で誘導される誘導性制御性 T 細胞(induced regulatory T cell:iTreg)に分類される。Foxp3 を欠損している Scurfy(sf) マウスでは、制御性 T 細胞

が分化できず、多臓器にリンパ球浸潤をみとめ、自己免疫疾患や重症のアレルギーを生じる。マウスのアレルギー性気道炎症モデルでは、Treg の移入による気道炎症の抑制効果が複数報告されている。このように制御性 T 細胞とアレルギー疾患には密接な関係があると考えられている。一方、これまでの制御性 T 細胞研究には、以下のような問題点がある。

① CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を制御性 T 細胞とする問題：Foxp3 は細胞内蛋白のため、Foxp3 を抗

体で細胞内染色すると染色過程で細胞が死に、Foxp3 陽性細胞を生きたまま取り出しその後の解析に用いることが出来ない。そこで CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を nTreg とみなして扱う報告がこれまで多かった。Naïve な状態では、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞は Foxp3 陽性の細胞が多い。だが、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞も活性化すると CD25 を発現するため、疾患モデルのように T 細胞が活性化している状況では CD25<sup>+</sup>T 細胞を制御性 T 細胞とするのは適切でない。また CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の一部は、少数だが Foxp3 陽性細胞が存在し、Foxp3 陽性細胞全体からみれば CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞中の制御性 T 細胞は無視できない。

② nTreg と iTreg の区別: nTreg と iTreg はそれぞれ異なる役割を果たしている可能性があるが、両者を厳密に区別することが困難なため、両者の差異の十分な解析は不能であった。例えば抗 CD25 抗体を用いて CD4<sup>+</sup>T 細胞から CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を除去し、残存 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞から Treg を誘導し iTreg と呼ぶ系もあるが、以下の理由でこれは正確ではない。それは CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞中にも Foxp3 陽性細胞は存在する上、除去が不完全であれば残存 nTreg がその後増殖する可能性がある。従って、従来の研究では、正確に nTreg と iTreg の区別ができていない。

③ T 細胞受容体(TCR)の抗原特異性:例えば野生型マウスから取り出した CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を nTreg として移入する場合には、その TCR は多様であり、抗原特異的な抑制能について解析している訳ではない。Treg が活性化した後は、抗原非特異的な抑制能が生じるが、活性化の段階では、TCR 刺激が必要であることが、in vitro の報告で示されている。抗原特異的な Treg の役割については、まだ不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

従来の報告では区別することが困難であった Tc, nTreg, iTreg それぞれ単独の作用と、相互の switching/conversion を含めた作用を、申請者らが樹立したマウスモデルを用いて解析する。

## 3. 研究の方法

(1) マウスの準備: Recombination-activating gene2 (Rag2)を欠損したマウスでは、T細胞および B 細胞を欠損している。また Rag2 欠損マウスに Ovalbumin (OVA)に特異的な T 細胞受容体の transgenic マウス(DO11.10)を交配した

Rag2<sup>-/-</sup> DO11.10 マウスでは、T 細胞は全て OVA 特異的であり、胸腺で自然に分化する nTreg を欠損しているが、iTreg は保たれている。また、全身の核内に OVA を発現する Ld-nOVA マウスを Rag2<sup>-/-</sup>DO11.10 マウスと交配すると (Rag2<sup>-/-</sup> DO11.10x Ld-nOVA:以下 RagDBL と呼ぶ)、胸腺、末梢リンパ組織での T 細胞の多くは CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>の nTreg に分化しており、その機能は抑制的である。即ち、RagDBL マウスでは、抗原特異的な nTreg が胸腺で多く誘導されている。これらの遺伝子改変マウスを用いて、nTreg と iTreg を区別した研究が可能である。

(2)気道炎症の作成と解析:Recipient マウスに、各種のマウス由来の CD4<sup>+</sup>T 細胞を移入後、OVA/Alumを腹腔内投与して感作し、OVAを吸入して気道炎症を惹起する実験系を用いて解析を行った。

Recipientとしては、Rag2 欠損マウスまたは野生型マウスなどを用いた。Donorとしては、RagDO11.10、または RagDO11.10sfまたは RagDBL マウス由来の CD4<sup>+</sup>T 細胞を移入した。DO11.10、RagDO11.10、または RagDO11.10sf または RagDBL の T 細胞は OVA 抗原に対して特異的な T 細胞受容体(KJ1-26)を持ち、抗 KJ1-26 抗体で確認できる。また通常 BALB/c 系統マウス由来の T 細胞は CD90.2(Th1.2)陽性だが、一部の Donor として使用予定の T 細胞を、CD90.1(Thy1.1)標識に置換することにより、2 種類の Donor 由来の T 細胞を同時に移入した際、相互の Donor 細胞がどのような変化したか、後の FACS で解析できる。

## 4. 研究成果

(1)実験過程で、移入先に用いた T 細胞欠損マウス(Rag2<sup>-/-</sup>マウス及び TCR $\alpha$ <sup>-/-</sup>マウス)では、加齢に伴い好中球性の気道炎症に引き続き肺の線維化が自然に生じることが判明した(図 1)。非常に興味深い結果と考えられるが、本申請研究の趣旨から外れるため、炎症・線維化の自然発症機序について、今回は詳細な検討は行わなかった。この背景肺に生じる炎症・線維性変化により、nTreg 及び iTreg によるアレルギー性気道炎症に対する影響が不明瞭になると考えられたため、以後の実験は移入先を野生型マウスとした。

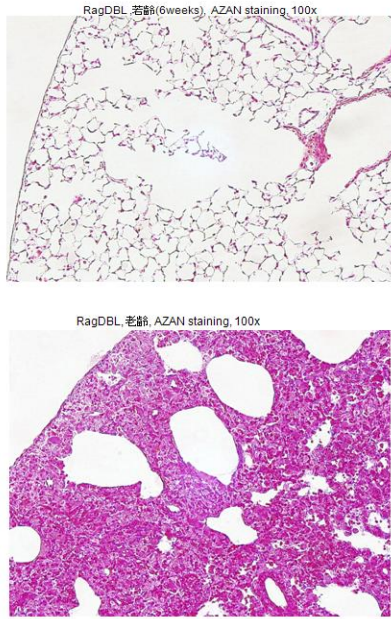


図1: T細胞欠損マウスでは、加齢に伴い気道炎症に引き続き肺の線維化が生じる

(2)野生型マウスに、Thy1.1 で標識して移入した Rag2<sup>-/-</sup>DO11.10 由来の T 細胞が Foxp3 を発現し、確かに生体内で iTreg が誘導されていることを確認した(図 2)。一方、Rag2<sup>-/-</sup>DO11.10 由来 T 細胞の移入群と、Rag2<sup>-/-</sup>DO11.10sf 由来 T 細胞の移入群では、気道炎症(BALF の好酸球数、肺組織)や BALF のサイトカイン産生、細胞内サイトカインの程度に明らかな差は認められなかった。すなわち、抗原特異的な iTreg が誘導されたものの、iTreg 誘導に伴う気道炎症に対する変化を認めなかった。

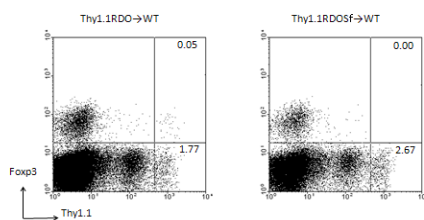


図2: Thy1.1<sup>+</sup> Rag2<sup>-/-</sup>DO11.10 由来の CD4<sup>+</sup>T 細胞移入群の肺門部リンパ節(左図)では、Thy1.1<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞、即ち iTreg の誘導が確認された。一方、Thy1.1<sup>+</sup> Rag2<sup>-/-</sup>DO11.10sf 由来の T 細胞を移入しても、iTreg は誘導されない(右図)。

(3)RagDBL マウス由来の CD4<sup>+</sup>T 細胞移入(2x10<sup>6</sup> cells/匹)群では、T 細胞を移入していない対照

群と比べて、気道炎症の程度に有意な差を認めなかった。すなわち、抗原特異的な nTreg の移入により、抗原特異的な気道炎症に明らかな変化を認めなかった。

(4)RagDO マウス由来及び RagDOSf マウス由来の CD4 陽性 T 細胞を、それぞれ in vitro で抗原提示細胞、OVA 抗原および IL-4、抗 IFN $\gamma$  抗体、抗 IL-12 抗体存在下で Th2 へ分化させたところ、IL-4 産生の Th2 型細胞の割合は2群間で差が認められなかった。すなわち、内因性の Foxp3 の存在の有無は、Th2 分化に明らかな影響を与えなかった。

Treg の移入により気道炎症を抑制した報告はこれまで複数あるが、今回の我々の実験系では、nTreg や iTreg による抑制効果は認められなかった。従来報告では、抗原非特異的な nTreg を大量に移入したり、in vitro で誘導した iTreg を大量に移入することで炎症の抑制効果を得ている。一方、今回の我々の実験系では、移入先を野生型マウスにして気道炎症を誘導したため、donor 由来の T 細胞が相対的に不足しており、その効果が検出できなかった可能性がある。しかし、生体内で自然に存在する抗原特異的な nTreg や iTreg の数は、T 細胞全体に対して比較的少数と考えられる。従って、抗原特異的な気道炎症において、実際の生体内では、抗原特異的な nTreg および iTreg による抑制効果は乏しいのかもしれない。

今後、引き続き実験系を工夫して解析を続けたい。

## 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0件)

[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]

ホームページ等:特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

今村 充(IMAMURA MITSURU)  
東京大学・保健・健康推進本部・助教  
研究者番号:80529157

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号: