

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390123

研究課題名(和文) 制御性T細胞分化の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Elucidating the molecular basis of regulatory T cell differentiation

研究代表者

堀 昌平 (Hori, Shohei)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：50392113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円、(間接経費) 4,500,000円

研究成果の概要(和文)：制御性T細胞は炎症など様々な擾乱に対してもその分化状態を安定に維持して免疫寛容と免疫恒常性を保っている。制御性T細胞が外因性シグナルによりそのマスター転写因子Foxp3の発現を失いヘルパーT細胞へとリプログラミングされるという考えが提唱されたが、この概念は大きな論争の的となっている。我々は、可塑性を示すFoxp3発現T細胞の起源は、制御性T細胞ではなく、一過的かつ無差別にFoxp3を発現した活性化T細胞であることを明らかにした。一方、制御性T細胞はFoxp3発現と抑制機能を記憶しており、このFoxp3発現の記憶はFoxp3遺伝子座のDNA脱メチル化により保障されていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The emerging notion of environment-induced reprogramming of Foxp3+ regulatory T (Treg) cells into helper T (Th) cells remains controversial. By genetic fate mapping or adoptive transfers, we have identified a minor population of non-regulatory Foxp3+ T cells exhibiting promiscuous and transient Foxp3 expression, which gives rise to Foxp3- Th cells and selectively accumulates in inflammatory cytokine milieus or in lymphopenic environments including those in early ontogeny. In contrast, Treg cells do not undergo reprogramming under those conditions irrespectively of their thymic or peripheral origins. Moreover, while a few Treg cells transiently lose Foxp3 expression, such "latent" Treg cells retain memory of Foxp3 expression and suppressive function. Our study establishes that Treg cells constitute a stable cell lineage, whose committed state in a changing environment is ensured by DNA demethylation of the Foxp3 locus irrespectively of ongoing Foxp3 expression.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：細胞分化 細胞運命 分化可塑性 制御性T細胞 転写因子 自己免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

免疫系が「自己」に対する免疫寛容を獲得・維持するメカニズムを解明することは免疫学における最も本質的な課題の一つであり、またその破綻が関係する様々な疾患（自己免疫疾患、アレルギー疾患、炎症性疾患、がん、慢性感染症など）を克服するためにも重要である。免疫系には制御性 T 細胞 (regulatory T cells、以下 Treg) と呼ばれる CD4⁺ T 細胞サブセットが存在し、様々な病的免疫応答を抑制的に制御することにより自己免疫寛容と免疫恒常性の維持に必須の役割を担っている。我々は、*scurfy* マウスおよびヒト IPEX 患者に自然発症する致死的な自己免疫性、炎症性、アレルギー性疾患の原因遺伝子として同定された転写因子 Foxp3 が Treg 選択的に発現する分子マーカーであり、その発生・分化、抑制機能に必須であること、そして Treg 分化・機能異常が *scurfy* マウスに発症する免疫疾患の原因であることを世界に先駆けて明らかにしてきた。

従来、Treg とは抑制機能に不可逆的にコミットした、他の T 細胞とは別個の細胞系列 (lineage) を構成し、環境からの予測のできない様々な擾乱（例えば炎症や感染）に対しても安定にその分化状態を維持することで自己免疫寛容を頑健に保っていると考えられてきた。そして、この安定性を前提として Treg を利用した様々な免疫疾患の細胞治療が世界的に試みられている。その一方で、我々は Foxp3⁺ T 細胞における Foxp3 発現は従来考えられてきたほど安定なものではなく、lymphopenia や炎症といった環境下で少なくとも一部が Foxp3 発現を失ってヘルパー T 細胞 (Th) へ分化する可塑性を保持していることを初めて明らかにした。そして、その後他グループからも様々な炎症環境下においてこのような“exFoxp3” Th 細胞が分化することが報告される一方、それに対する反証も提出され、Treg の可塑性に対する関心と議論が世界的に高まっている。しかしながら、このような Treg の分化可塑性は機能的安定性とは一見相反する性質であり、変動する環境にあって Treg が如何に適切に機能して自己寛容と免疫恒常性を維持しているのか、という本質的な問題を提起している。特に、Treg の多くは胸腺において提示される自己抗原を強く認識した結果分化することが明らかにされており、仮に炎症などの外因性シグナルによって自己反応性 Treg が Th へ“リプログラム”されるならば、逆に自己免疫疾患の発症に直結し、自己免疫寛容の維持という観点のみならず、Treg を用いた免疫疾患の細胞治療という観点からも大きな問題となる。従って、Treg による自己免疫寛容と免疫恒常性の維持機構を解明し、有効かつ安全な Treg 細胞治療法を確立するためには、Treg の安定性と可塑性という一見矛盾した性質を首尾一貫して説明する枠組みが必要であり、両者がどのように制御されているのかを解明する必要がある。

る。

2. 研究の目的

我々は、Foxp3⁺ T 細胞における Foxp3 発現の可塑性と Treg の系列安定性という一見矛盾する現象を一貫して説明する枠組みとして、「不均一性モデル」を提唱した。すなわち、正常個体に存在する Foxp3⁺ T 細胞の中には Treg へコミットしていない少数の細胞が含まれており、Treg ではなくこれらの細胞のみが Foxp3 発現を失って Th へ分化するという考えである。このモデルに従えば、lymphopenia や炎症といった環境からのシグナルは、Treg のリプログラミングを誘導するのではなく、これら少数の“uncommitted” Foxp3⁺ T 細胞の exFoxp3 Th 細胞への分化とその選択的な増殖・生存を引き起こすと考えられる。本研究では、この“uncommitted Foxp3⁺ T 細胞”の本体を明らかにし、この可塑性の「不均一性モデル」を証明することを第一の目的とした。

さらに、胸腺において自己反応性に基づいて選択され分化する Treg から exFoxp3 Th 細胞が分化しうるのかを明らかにすることを第二の目的とした。

3. 研究の方法

Foxp3⁺ T 細胞が不可逆的に Treg へとコミットメントを受けるのか、逆に Th へと分化転換するのかを調べるためには、Foxp3⁺ T 細胞の細胞運命マッピング (cell fate mapping) を行う必要がある。このために、Foxp3^{GFP^{Cre}} ノックインマウスを作製し、これを Cre レポーターマウスである ROSA26^{RFP} マウスと交配させた。このシステムを用いることで、Foxp3 発現を消失した exFoxp3 細胞を GFP^{RFP} 細胞として同定できる。そして、正常個体において一過的に Foxp3 を発現した GFP^{RFP} exFoxp3 T 細胞が分化するのか、分化するとしたらそれらはどのような免疫学的性状を示し、どのような細胞に由来するのか検討した。

さらに、自己反応性 T 細胞が exFoxp3 細胞に分化するか否かを明らかにするために、Foxp3^{GFP^{Cre}} ROSA26^{RFP} マウスを ovalbumin (OVA) 特異的 TCR をモノクローナルに発現する OTII TCR トランスジェニック (Tg) Rag2^{-/-} マウスと交配させた。そして、その骨髓細胞を、膜結合型 OVA を自己抗原として胸腺髄質上皮細胞および脾臓 β 細胞に発現する RIP-mOVA Tg マウスに移植して骨髓キメラマウスを作製した。この骨髓キメラマウスにおいては、OVA 特異的 CD4⁺ T 細胞は胸腺髄質上皮細胞に発現する OVA を認識してクローン除去を受けるが一部は生き残り Foxp3 を発現して Treg へと分化する。骨髓ドナー由来細胞と宿主由来細胞は Ly5 コンジェニックマーカーの発現により区別し、OVA 特異的 CD4⁺ T 細胞における Foxp3⁺ (GFP⁺) 細胞と RFP⁺ 細胞における exFoxp3

(GFP⁺RFP⁺)細胞の割合を検討した。またこのとき、Ly5 コンジェニック野生型骨髓細胞と様々な割合で混合することによって OVA 特異的 CD4⁺ T 細胞のクローンサイズを変化させ、exFoxp3 T 細胞分化への影響を検討した。

4. 研究成果

1) Foxp3⁺ T 細胞の不均一性と可塑性の起源 ExFoxp3 Th 細胞は、Treg ではなく一過的かつ無差別に Foxp3 を発現する活性化 T 細胞から分化する

樹立した *Foxp3*^{GFP^{Cre}.*ROSA26*^{RFP} マウスを解析したところ、成体の CD4⁺RFP⁺ T 細胞中約 10-20%が Foxp3⁺であり、これらはエフェクター・メモリー細胞形質(CD44^{high})を示して様々な Th サイトカインを発現した。しかしながら、これら Foxp3⁺RFP⁺ エフェクター・メモリー T 細胞は個体発生過程で徐々に産生されて選択的に増殖することで蓄積することが分かった。このシステムでは、RFP の発現は個体発生過程を通して起こり、実験者によっては発現のタイミングを制御できない。従って、我々の結果は成体に存在する Foxp3⁺RFP⁺ T 細胞は個体発生過程で生じた細胞が選択的に増殖・蓄積した結果を見ていることを意味している。逆に言えば、成体に存在する Foxp3⁺ T 細胞においては exFoxp3 Th になるポテンシャルを持った細胞は少数であり、大多数は安定な Foxp3 発現を示すという知見と矛盾しない。}

この Foxp3 発現を失って Th になるポテンシャルを持った Foxp3⁺ T 細胞の本体は何であろうか？この問題の手掛かりとなったのは、ナイーブ Foxp3⁺CD4⁺ T 細胞を *in vitro* で活性化すると、TGF-β 非存在下でも約 10-20%の細胞が Foxp3 を発現するという知見である。このような活性化によって誘導される Foxp3⁺ T 細胞は、Treg とは異なって活性化 Foxp3⁺ T 細胞と同様の遺伝子発現プロファイルを示し、T 細胞の増殖反応を抑制する活性を持たず、再刺激により容易に Foxp3 発現を失うことがわかった。さらに、活性化によって誘導される一過的な Foxp3 発現は、Treg に見られる *Foxp3* 遺伝子の Treg-specific demethylation region (TSDR)と呼ばれる非翻訳領域の DNA 脱メチル化を伴わないことがわかった。ヒトのナイーブ T 細胞においてはこのような活性化による一過的で“無差別な”(Treg 分化を誘導しない) Foxp3 発現が報告されていたが、我々の結果はマウスのナイーブ T 細胞も一過的に無差別に Foxp3 を発現し得ることを示している。

そして、このような一過的な Foxp3 発現を示す非制御性 Foxp3⁺ T 細胞は正常個体にも実際に存在すること、そしてこれらが exFoxp3 Th 細胞の起源であることが分かった。*Foxp3*^{GFP^{Cre}.*ROSA26*^{RFP} マウスでは *Foxp3* 遺伝子の転写開始後、時間とともに *ROSA26* 遺伝子座の組換え、RFP 蛋白の発現・成熟・蓄積が起こるため、RFP の発現レベルによっ}

て *Foxp3* 遺伝子の転写開始後の時間経過を追うことが可能である。従って、一過的に Foxp3 を発現する細胞は RFP^{low} に多く存在し、RFP^{high} にはほとんど存在しないと考えられる。実際、炎症性サイトカイン環境下あるいは T 細胞欠損環境下において分化する Foxp3⁺RFP⁺ T 細胞は、Foxp3⁺RFP^{high} 細胞ではなく Foxp3⁺RFP^{low} 細胞に由来することがわかった。さらに Foxp3⁺RFP^{low} T 細胞の性状と機能を調べたところ、これらは CD25^{low} と CD25^{high} 細胞からなり、CD25^{low} サブセットは、Treg マーカー分子群の発現、抑制活性、Foxp3 発現の安定性、TSDR 脱メチル化という基準に照らし合わせて Treg ではなく“無差別な”Foxp3 発現を示す非制御性 T 細胞であることがわかった。一方、Foxp3⁺RFP^{low}CD25^{high} サブセットは Foxp3⁺RFP^{high} サブセットと同様、Treg としての性状と機能を既に備えていることがわかった。

以上の結果から、成体 Foxp3⁺ T 細胞においては約 2-3% を占める少数の細胞 (Foxp3⁺RFP^{low}CD25^{low}) は活性化によって無差別に Foxp3 を発現する非制御性 T 細胞であり、exFoxp3 Th 細胞は Treg ではなく、これら非制御性 T 細胞に由来すると考えられた。この結果は、成体においては大多数(95-99%)の Foxp3⁺ T 細胞は安定に Foxp3 を発現するという Rudensky らの結果ともよく一致する。

Treg における Foxp3 発現の記憶

我々はさらに、*Foxp3*^{GFP^{Cre}.*ROSA26*^{RFP} マウスを解析する過程で、Foxp3 RFP⁺CD4⁺ T 細胞もまた不均一な集団であることを見出した：これらの T 細胞は TSDR が脱メチル化された細胞を含んでおり、IL-2 存在下で TCR 刺激を加えると約 30%の細胞が Foxp3 を再発現して抑制活性を示すことを見出した。そして、この再誘導された Foxp3⁺ T 細胞においては TSDR が完全に脱メチル化されていた。この Foxp3 再誘導は頑健であり、通常ナイーブ T 細胞における Foxp3 誘導を抑制する IL-4、IL-6あるいは抗 TGF-β 中和抗体存在下においても認められた。一方、Foxp3 を再発現しなかった Foxp3⁺RFP⁺ T 細胞は抑制活性を示さず、エフェクターサイトカインを産生し、TSDR が完全にメチル化されていた。以上の結果から、少数の Treg は Foxp3 発現を一過的に失うものの、その発現を記憶していること、すなわち Treg には“潜在型”が存在すること、そして TSDR の脱メチル化はそのような潜在型 Treg をマーキングできることが明らかになった。}

この研究により、Foxp3⁺ T 細胞は不均一な集団であり Treg のほか、少数の一過的かつ“無差別”に Foxp3 を発現する非制御性 T 細胞を含むこと、そして、Th 細胞に分化するのは後者であることが明らかとなり、「不均一性モデル」を支持する証拠が得られた。一方、Foxp3 発現を失った T 細胞もまた不均一な集

団であり、無差別な Foxp3 発現を反映する Th 細胞に加え、一過的に Foxp3 発現を失った“潜在型”Treg を含んでいた。このことは、Treg は様々な環境の変化に対し分化状態を安定に維持する細胞系列であることを示すとともに、その安定性は TSDR の DNA 脱メチル化というエピジェネティックな発現制御により成り立っていることを示唆している。この研究で得られた知見は、“制御性 T 細胞の可塑性”をめぐる論争を解決する枠組みをあたえるとともに、安定な制御性 T 細胞を様々な免疫疾患の治療に用いる細胞療法にとっても励みとなるものである。今後の重要な課題は、制御性 T 細胞において記憶をともなった Foxp3 発現を誘導するシグナルと、一過的な Foxp3 発現を誘導するシグナルとでは何が異なるのか、という問題である。制御性 T 細胞への運命決定を制御する分子機構を解明してはじめて、制御性 T 細胞とは何かという問いに答えることになるだろう。

2) 制御性 T 細胞の不可逆的運命決定機構
OTII TCR Tg.Rag2^{-/-}.Foxp3^{GFP^{Cre}}.ROSA26^{RFP} 骨髄細胞を単独で RIP-mOVA Tg ホストマウスに移植した骨髄キメラマウスを解析したところ、OVA 特異的 CD4⁺ T 細胞において GFP⁺RFP⁺細胞が分化するのみならず RFP⁺細胞の約 25%が GFP⁺であることがわかった。このことは自己反応性 T 細胞の一部は exFoxp3 細胞へと分化し得ることを示している。しかしながら、生理的なクローンサイズに近づくために、野生型マウス(Ly5.1)の骨髄細胞と様々な割合で混合して移植した混合骨髄キメラマウスを解析したところ、OVA 特異的 T 細胞のクローンサイズが小さくなるにつれて RFP⁺細胞中の GFP⁺細胞の割合が減少し、特に OVA 特異的 T 細胞が CD4⁺ T 細胞の 1% 以下となるような条件では 99%以上の RFP⁺細胞が GFP⁺となることを見出した。以上の結果は、自己反応性 T 細胞が Treg へ分化するか exFoxp3 T 細胞へ分化するかの運命決定は自己反応性 TCR 固有の性質だけでは決まらず、個々の自己反応性 T 細胞のクローンサイズによって影響を受ける可能性を示唆している。すなわち、クローンサイズが大きいつきには同じ特異性を持ったクローン同士で共通の“ニッチ”を奪いあう“クローン内競争”が起こり、このために Treg への運命決定のために必要なシグナルを十分受けられずに exFoxp3 Th 細胞へ分化すると考えられた。

以上の結果により、クローン除去を逃れた自己反応性 T 細胞の一部は一過的な Foxp3 発現を経て exFoxp3 T 細胞へ分化し得ることが明らかになった。一方で exFoxp3 T 細胞の分化は自己反応性 T 細胞のクローンサイズが大きい場合に見られる現象であり、Treg の運命決定においてクローン内競争が重要な外因性の阻害因子であることが初めて明らかになった。このことは、胸腺における Treg の不可逆的コミットメントには、胸腺において自

己抗原を提示する抗原提示細胞と安定かつ持続的な相互作用が重要であることを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

1. Hori S. Lineage stability and phenotypic plasticity of Foxp3(+) regulatory T cells. *Immunol Rev* 259: 159-72, 2014 doi: 10.1111/imr.12175 (査読有)
2. Toker A, Engelbert D, Garg G, Polansky Geffers R, Giehr P, Schallenberg S, Kretschmer K, Olek S, Walter J, Weiss S, Hori S., Hamann A, Huehn J. Active demethylation of the Foxp3 locus leads to the generation of stable regulatory T cells within the thymus. *J Immunol* 190: 3180-8, 2013 doi: 10.4049/jimmunol.1203473 (査読有)
3. Miyao T, Floess S, Setoguchi R, Luche H, Fehling HJ, Waldmann H, Huehn J, Hori S. Plasticity of Foxp3(+) T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells. *Immunity* 36: 262-75, 2012, doi: 10.1016/j.immuni.2011.12.012 (査読有)
4. Hori S. Stability of regulatory T-cell lineage. *Adv Immunol* 112: 1-24, 2011, doi: 10.1016/B978-0-12-387827-4.00001-2 (査読有)
5. Hori S. Regulatory T cell plasticity: beyond the controversies. *Trends Immunol* 32: 295-300, 2011, doi: 10.1016/j.it.2011.04.004 (査読有)

〔学会発表〕(計 19 件)

1. Hori S. Genetic control of regulatory T cell fitness in tissues. The 7th International Leukocyte Signal Transduction Conference. 2013 年 9 月 10 日, Kos Island, Greece
2. Hori S. Stability and adaptability of regulatory T cells. The 7th International Symposium on Cellular Therapy 2013. 2013 年 3 月 13-14 日, Erlangen, Germany
3. Hori S. Genetic and environmental control of regulatory T cell fitness in tissues. The 41st Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. 2012 年 12 月 5-7 日, 神戸
4. Hori S. Resolving the controversy over regulatory T cell plasticity. The 3rd International Conference on Regulatory T cells and Helper T cell subsets and Clinical Application in Human Diseases. 2012 年 10 月 13-16 日, Shanghai, China
5. Hori S. Resolving the controversy over regulatory T cell plasticity. The 14th International Conference on Lymphocyte Activation and Immune Regulation: T cell Differentiation and Plasticity. 2012 年 2 月 3 日-5 日, Newport Beach, CA, USA

6. Hori S. Plasticity of Foxp3+ T cells: its implications in Treg cell lineage commitment. The 4th International Symposium on “Immunological Self”. 2012年1月27日、京都

〔その他〕

ホームページ等

http://www.riken.jp/research/labs/ims/immun_homeost/

6. 研究組織

(1)研究代表者

堀 昌平 (HORI, Shohei)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究
所・免疫恒常性研究チーム・チームリーダー

研究者番号：50392113