

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23790346  
 研究課題名（和文） 制御性T細胞の機能のダイナミズムを制御する分子メカニズムの解明  
 研究課題名（英文） Analysis of the molecular mechanisms which underlies the dynamic characteristics of regulatory T cell function  
 研究代表者  
 関谷 高史（SEKIYA TAKASHI）  
 慶應義塾大学・医学部・助教  
 研究者番号：80519207

研究成果の概要（和文）：胸腺における T 細胞の発生過程では、自己を攻撃しかねない細胞には細胞死が誘導されたり、免疫抑制性に機能する制御性 T 細胞への分化が誘導されます。この仕組みにより自己免疫疾患の発症が防がれていますが、それを制御する分子機構は長い間不明でした。本研究では Nr4a という分子が自己攻撃性の細胞に細胞死や制御性 T 細胞への分化を誘導する役割を担い、自己免疫疾患の発症を防いでいることを明らかにしました。

研究成果の概要（英文）： During their development in the thymus, self-reactive T cells are either eliminated by apoptosis or differentiated into regulatory T cells. This developmental system plays crucial roles in prevention of autoimmune diseases, however, the underlying molecular mechanisms have been largely unknown. In our research, we elucidated that a molecule named Nr4a play crucial roles in induction of apoptosis or differentiation of regulatory T cells in those self-reactive T cells, thus prevent development of autoimmune diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：免疫学、細胞分化

## 1. 研究開始当初の背景

免疫系の恒常性は病原体の排除を担う正の応答と、自己抗原や無害な外来抗原への過剰な応答を抑制する負の応答のバランスの維持により担われている。CD4 陽性 T 細胞は、抗原の種類に応じた適切な免疫応答を作動することにより、そのバランスの維持で中心的な役割を果たしている。CD4 陽性 T 細胞の適切な機能発現は、胸腺で正確な発生分化

過程を経ることに大きく担われる。その異常は感染症のみならず、自己免疫疾患やアレルギーを含め様々な疾患の引き金となる。まず、胸腺における CD4 陽性 T 細胞発生においては、主要組織適合性抗原クラス II (MHC class II) に提示された自己抗原に強く応答する細胞にはアポトーシスが誘導されるか（ネガティブセレクション）または免疫抑制性に機能する制御性 T 細胞 (Regulatory T cell:

Treg)への分化が誘導される。これにより自己反応性細胞が末梢で活性化することが防がれている。しかし、それら自己抗原への反応性に応じた細胞運命決定を担う分子機構は大部分が未解明であった。

## 2. 研究の目的

我々は、先に発表した研究で核内受容体 Nr4a2 が CD4 陽性 T 細胞で Treg の主要転写因子である Foxp3 の発現を強く誘導する機能を有することを見出していた。さらに、Nr4a ファミリー分子は CD4 陽性 T 細胞で抗原刺激により発現誘導されることが当研究グループらにより明らかとされている。また、Nr4a ファミリー分子はネガティブセレクション誘導で重要な役割を担っているという数々の報告があった。そこで本研究では Nr4a ファミリー核内受容体が胸腺における CD4 陽性 T 細胞運命決定において重要な役割を担っているのではないかと予測し、検討を行った。

## 3. 研究の方法

(1) Nr4a ファミリーは類似分子 Nr4a1, Nr4a2, Nr4a3 から構成される。本研究ではそれら全てを T 細胞特異的に欠損させたノックアウトマウスを作製し、解析を行った。

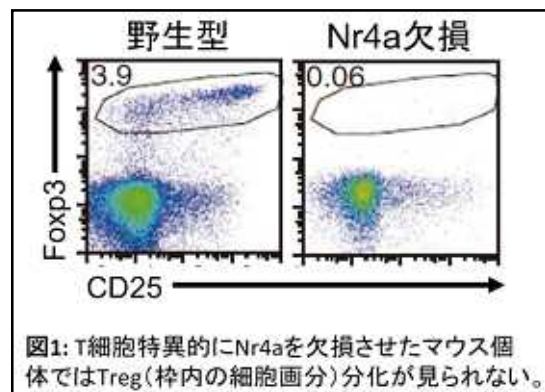
(2) 胸腺での CD4 陽性 T 細胞発生段階で Nr4a の活性を調節できるマウス個体を、レトロウイルスベクターによる遺伝子導入と骨髓移植法により作製した。そのマウス個体で Nr4a の活性を調節し、CD4 陽性 T 細胞運命決定に対する作用を解析した。

## 4. 研究成果

(1) Nr4a ファミリー分子を全て欠損させたマウスでは Treg は発生せず全身性の自己免疫疾患を発症する

我々が先に発表した研究では Nr4a2 のみを

T 細胞で欠損させたマウスを作製し解析を行ったが、そのマウスでは Treg は正常に分化し、自己免疫疾患も見られなかった。ファミリー分子である Nr4a1 と Nr4a3 による機能重複の可能性が考えられたので、本研究ではまず、Nr4a1, Nr4a2, Nr4a3 全てを T 細胞特異的に欠損させたマウス個体 (Nr4a triple knockout mouse: Nr4a-TKO マウス) を作成し解析を行った。その結果、このマウスでは胸腺・末梢共に Treg がほぼ全く存在しないことが明らかとなった(図1)。さらにこのマウスでは CD4 陽性の著明な活性化、自己抗体価の上昇がみられ、肺・肝臓で特に激しい全身性の自己免疫疾患を発症し、生後3週間以内に死亡した。このマウスでは IL-4 産生 CD4 陽性 T 細胞の割合の増加、IgE, IgG1 のような Th2 型アイソタイプの抗体価の上昇が見られ、Th2 型ヘルパー T 細胞の機能が優位な炎症反応が生じていることが明らかとなった。



(2) 各 Nr4a ファミリー因子は相補的に胸腺 Treg 発生に寄与する

以上 Nr4a ファミリー分子全ての欠損により Treg が発生しなくなり自己免疫疾患が引き起こされることが明らかとなったが、次にシングルノックアウトマウス、ダブルノックアウトマウスを解析することで各因子の関与の度合いを解析した。その結果、各因子のシ

シングルノックアウトでは顕著なフェノタイプは確認されなかった。さらに Nr4a1-Nr4a2、Nr4a2-Nr4a3 の組み合わせのダブルノックアウトでも Treg は発生し自己免疫疾患も見られなかったが、Nr4a1-Nr4a3 のダブルノックアウトでは自己免疫疾患がみられ、Treg 分化の減弱も確認された。これらの結果は Nr4a1 と Nr4a3 の寄与が大きいことが示唆している。しかし、Nr4a1-Nr4a3 ダブルノックアウトマウスでは Nr4a-TKO マウスと比較し、有意に多くの Treg が胸腺で発生し、さらに生存日数も長いことが確認され、Nr4a2 の寄与も明らかとなった。

### (3) Nr4a は CD4 陽性 T 細胞内在的に Treg 発生に機能する

Nr4a-TKO マウスでは上述の通り激しい全身性の自己免疫疾患が引き起こされる。Treg の分化異常はその2次的な影響である可能性も考えられた。そこで野生型と Nr4a-TKO の造血幹細胞が混在するマウスを骨髄移植により作成することにより、同一個体内で野生型と Nr4a-TKO 両方の T 細胞の発生を比較解析した。このマウスでは野生型細胞由来の Treg が存在するため、自己免疫疾患は生じない。解析の結果、このマウスでは野生型細胞から分化した Treg は存在する一方、Nr4a-TKO 細胞から分化した Treg は全く存在しなかった。これらの結果から、Nr4a は CD4 陽性 T 細胞内在的に Treg 発生に寄与することが確認された。

### (4) Nr4a はネガティブセレクションに機能する

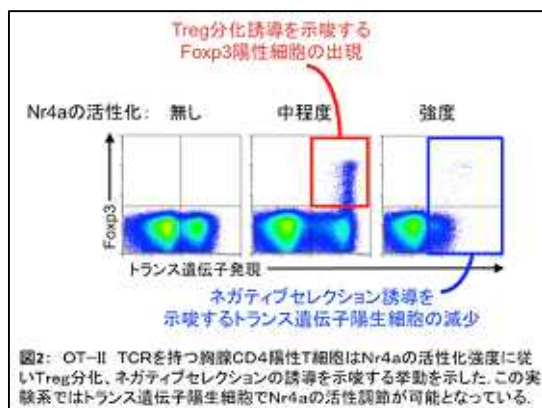
Nr4a が胸腺 T 細胞発生過程で自己反応性細胞にネガティブセレクションを誘導する機能を持つことは過去の数々の研究で示唆されてきた。本研究でもそれを裏付ける結果が

得られた。まず、Nr4a-TKO マウスは生後 3 週間以内に全て死亡するが、その生存日数は Foxp3 の失活変異により Treg のみを欠損する Scurfy マウスで報告されているものより短いものであった。このことは、自己反応性細胞がより多くできることが自己免疫疾患をより重症化に導いている可能性を間接的ながら示唆している。次に、上述した野生型と Nr4a-TKO 造血幹細胞が混在するマウスでは、胸腺 T 細胞で占める割合が、野生型と比較し Nr4a-TKO 細胞の方が多ことが明らかとなった。このことは、自己反応性 Nr4a-TKO 細胞がネガティブセレクションを逃れていることを示唆している。以上の結果から、Nr4a のネガティブセレクションにおける機能が本研究の Nr4a-TKO 細胞の解析により裏付けられた。

### (5) Nr4a は自己反応性の強度に応じた胸腺 CD4 陽性 T 細胞運命決定を担う

胸腺での CD4 陽性 T 細胞発生において自己反応性細胞にはネガティブセレクションもしくは Treg 分化が誘導される。本研究では Nr4a が、この自己抗原に対する親和性の強度に従った運命決定を担う因子であると考え検証を試みた。OT-II という TCR を持つ CD4 陽性 T 細胞は、ニワトリのオボアルブミンというタンパク質由来の抗原を認識する。オボアルブミン由来の抗原はマウス体内には存在しない、すなわちマウスにおける自己抗原では無いため、OT-II TCR を持つ CD4 陽性 T 細胞は Treg に分化できないことが明らかとなっている。一方、マウス体内でオボアルブミンを発現させる、すなわち自己抗原として存在させると、OT-II TCR を持つ CD4 陽性 T 細胞の大部分は Treg に分化するかネガティブセレクションを受ける。そこで本研究では、OT-II TCR を持つ T 細胞前駆細胞で

Nr4a の活性を調節し、その運命を追った。その結果、Nr4a の活性の無い状態では Treg は全く発生しなかったが、活性化させた状態では Treg 発生が誘導されたことを示唆する Foxp3 発現細胞の出現が確認された(図 2)。Nr4a をさらに強く活性化させると、今度は細胞数の減少が確認され、ネガティブセレクションの誘導が示唆された(図 2)。これらの結果から、自己抗原に対する親和性の強度に従った CD4 陽性 T 細胞運命決定において、Nr4a はキーファクターとして機能する可能性が強く示された。



#### (6)今後の展望

胸腺における CD4 陽性 T 細胞発生過程で、その運命は主に自己抗原に対する親和性の強度により決定され、免疫系の恒常性の維持における重要な基盤となる。しかし、それを制御する分子機構は多くが未解明であった。本研究では、Nr4a がそのキーファクターとして機能することを明らかとした。この発見により、長い間ブラックボックスとされてきた自己抗原に対する親和性と細胞運命決定を結ぶ分子メカニズムの大部分が明らかとなったと言える。今後も、Nr4a の機能に着目した研究を進めることで、胸腺における T 細胞発生を制御する分子メカニズムの詳細が明らかになると考えられ、ひいては炎症性疾患発症機序の解明や治療法の開発に結びつくと期待される。

#### 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 6 件)

(1) Takashi Sekiya, Ikkou Kashiwagi, Rei Yoshida, Tomohiro Fukaya, Rimpei Morita, Akihiro Kimura, Hiroshi Ichinose, Daniel Metzger, Pierre Chambon, Akihiko Yoshimura  
Nr4a receptors are essential for thymic regulatory T cell development and immune homeostasis.

*Nature Immunology*, 査読有、14 巻、2013、230-237

doi:10.1038/ni.2520

(2) Takashi Sekiya, Ikkou Kashiwagi, Naoko Inoue, Rimpei Morita, Shohei Hori, Herman Waldmann, Alexander Y. Rudensky, Hiroshi Ichinose, Daniel Metzger, Pierre Chambon, Akihiko Yoshimura

The nuclear orphan receptor Nr4a2 induces Foxp3 and regulates differentiation of CD4<sup>+</sup> T cells

*Nature Communications*, 査読有、2巻、2011、269

DOI: 10.1038/ncomms1272

[学会発表](計 3 件)

関谷 高史、吉村 昭彦

Regulation of CD4 T cell differentiation and inflammatory diseases by the nuclear orphan receptor Nr4a2

第 41 回日本免疫学会学術集会総会・於神戸  
平成 24 年 12 月 5 日~12 月 7 日

Takashi Sekiya and Akihiko Yoshimura  
Roles of the nuclear orphan receptor Nr4a2 in regulation of CD4<sup>+</sup> T cell differentiation and inflammatory diseases

Keystone Symposia: The Biology of Cytokines, in Colorado (USA), 平成 24 年 2 月 2 日 5~2 月 10 日

関谷 高史、吉村 昭彦

核内オーファン受容体 Nr4a2 による CD4T 細胞分化と自己免疫疾患の制御

第 40 回日本免疫学会学術集会総会・於千葉  
平成 23 年 11 月 27 日~11 月 29 日

[図書](計 1 件)

(1) 関谷 高史、吉村 昭彦

Nr4a2 による Foxp3 の誘導機構  
臨床免疫・アレルギー、科学評論社、57 巻  
2012、360-366

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

関谷 高史 (SEKIYA TAKASHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号 : 80519207