

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24390073

研究課題名(和文) 新規誘導型制御性CD8T細胞の免疫反応・免疫寛容制御機構の解析

研究課題名(英文) Functional analysis of newly identified inducible regulatory T cells in immunological reaction and tolerance

研究代表者

菅井 学 (Sugai, Manabu)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：90303891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：CD4T細胞(ヘルパーT細胞)とCD8T細胞(細胞障害性T細胞)への運命決定は、胸腺における抗原認識に依存した相互排他的な過程である。私たちはCD4T細胞が抹消組織においてCD8aaT細胞に再分化することを見出した。この時分化を誘導するシグナルは、TGF- β 1、レチノイン酸、IL-2であった。私たちはこの「CD4から分化したCD8aaT細胞」の生体内における免疫制御能を様々な自己免疫疾患モデルマウスで評価し、一定の知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Cell fate determination of CD4 T cells (helper T cells) or CD8 T cells (cytotoxic T cells) is occurred in the thymus in a mutually exclusive manner. We found that CD4 T cells differentiate into CD8aa T cells in the periphery in response to transforming growth factor- β 1(TGF- β 1), retinoic acids (RA) and Interleukin-2(IL-2). These cells were designated as CD4-derived CD8aa T cells. We further examined the immuno-regulatory role of CD4-derived CD8aaT cells in various autoimmune models.

研究分野：分子生物学

キーワード：慢性炎症 自己免疫疾患 腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

免疫システムは、様々な方法を用いて、自己を攻撃しない『自己寛容性』を確立している。最近の研究から、活性化 T 細胞特異的免疫抑制機能を持つ CD8T 細胞の存在が明らかになってきている (Kim ら Nature 2010, Kumar ら Trends in Immunol 2008)。しかし、これらの CD8 制御性 T 細胞の分化、分化に必要な因子、免疫制御機構の詳細は未だ不明である。申請者は、転写因子『Runx3』の欠損マウスにおいて、慢性的な腸炎を認め、細菌の多い環境下において、腸に腫瘍ができることを観察した (Sugai, et al., J. Immunol. 2011)。この腫瘍形成は、CD8T 細胞を移植することで抑制されることから、CD8T 細胞に何らかの炎症抑制作用のあることが想定されたが、その実態は不明であった。

2. 研究の目的

Runx3 欠損マウスで見られる自己免疫疾患発症の原因となる制御性 T 細胞としての機能を持った CD8T 細胞を同定する。さらに、この CD8T 細胞の分化過程を明らかにした上で、この細胞が関与する免疫制御反応の解明を目指す。

3. 研究の方法

Runx3 で分化障害のある CD8T 細胞を調べ、その細胞の分化してくる系譜をおおまかに明らかにする。さらに、この CD8T 細胞の分化機構の詳細を調べる。また、腸炎以外の自己免疫疾患への関わりを明らかにすることを通じて、この CD8T 細胞による、細胞機能発現の分子機構を知る足がかりを得る。さらに、その細胞における遺伝子発現等を調べる。上記の各種アッセイによって得られた情報を統合することによって、同定した CD8T 細胞の各種免疫反応への関与と、それぞれの免疫反応において機能を発揮する背景となる分子機構を明らかにすることを目指す。これらの基礎的データの収集をさらに発展させ、将来の腫瘍免疫・自己免疫疾患治療法の開発も目指す。

4. 研究成果

我々は、CD4T 細胞が末梢組織において CD8T 細胞に再分化すること

を発見した。強い抗原刺激に加え、Interleukin-2 (IL-2)、レチノイン酸、Transforming Growth Factor-1 (TGF-1) によって、CD4 T 細胞は CD8 α T 細胞に分化することを見いだし、この分化には Runx3 が必要である事もわかった。さらに、CD8⁺TCR⁺ T 細胞のなかには、活性化 T 細胞を特異的に抑制する細胞群の存在が知られていることから、CD4 由来 CD8 α T 細胞の免疫反応抑制機能を、自己免疫疾患モデルマウスを用いて評価した。その結果、CD4 T 細胞から CD8⁺ T 細胞への分化に障害を持つ Runx3^{-/-} T 細胞をもつマウスでは、実験的アレルギー性脳脊髄炎からの回復に障害があることが明らかになった。このことから、CD4 由来 CD8 α T 細胞は、ある種の免疫抑制機能を持つことが示唆された。さらに、この『CD4T 細胞から誘導された CD8T 細胞』の遺伝子発現を網羅的に解析し、他の制御性 T 細胞『iTreg 細胞 (Foxp3+CD4T 細胞)』と遺伝子発現と比較することによって、『CD4T 細胞から誘導された CD8T 細胞』分化機構に關与する可能性のある候補遺伝子群を同定した (一時スクリーニング)。しかし、免疫抑制機能に特異的に関わっていると想定できる分子を見出すことができなかったため、二次スクリーニングを行う必要がある。さらに、様々な自己免疫疾患モデルにおける『CD4T 細胞から誘導された CD8 α T 細胞』の役割を見出すことも試みたが、免疫抑制機能を持つことの確証は得られなかった。今後は、もう少し見やすい系を作ることによって『CD4T 細胞から誘導された CD8 α T 細胞』の機能を明らかにしてゆく予定である。

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 17 件)

1. Effects of Usag-1 and Bmp7 deficiencies on murine tooth morphogenesis. *BMC Dev Biol.* **13;16:14. (2016)**
Saito K., Takahashi K., Asahara M., Kiso H., Togo Y., Tsukamoto H., Huang B., Sugai M., Shimizu A., Motokawa M., Slavkin HC., Bessho K. (査読あり)

2. Antagonistic Functions of USAG-1 and RUNX2 during Tooth Development. *PLoS One.* **12**;11(8):e0161067. (2016)
Togo Y., Takahashi K., Saito K., Kiso H., Tsukamoto H., Huang B., Yanagita M., Sugai M., Harada H., Komori T., Shimizu A., MacDougall M., Bessho K. (査読あり)
3. ミトコンドリア機能と活性化 B 細胞分化 医学の歩み 253(13)1327-1328 (2016)
菅井学 (査読なし)
4. Mitochondrial function provides instructive signals for activation-induced B-cell fates. *Nature Comm.* **6**, 6750 doi. 10.1038/ncomms7750 (2015)
Jang, K.-J., Mano, H., Aoki, K., Hayashi, T., Muto, A., Nambu, Y., Takahashi, K., Itoh, K., Taketani, S., Nutt, S. L., Igarashi, K., Shimizu, A. and Sugai, M. (査読あり)
5. Id2 deletion attenuates Apc-deficient ileal tumor formation. *Biol Open.* **10**;4(8):993-1001. (2015)
Biyajima K., Kakizaki F., Shen X., Mori K., Sugai M., Taketo MM., Yokota Y. (査読あり)
6. Activation of B1a cells in peritoneal cavity by T cell-independent antigen expressed on polymeric micelle. *J. Pharm. Sci.* **104**, 1389-1847 (2015)
Kim, C.J., Hara, E., Shimizu, A., Sugai, M. and Kimura, S. (査読あり)
7. Functional Evaluation of Activation-dependent Alterations in the Sialoglycan Composition of T Cells *J. Biol. Chem.* **289**, 1564-1579 (2014)
Naito-Matsui, Y., Takada, S., Kano, Y., Iyoda, T., Sugai, M., Shimizu, A., Inaba, K., Nitschke, L., Tsubata, T., Oka, S., Kozutsumi, Y. and Takematsu, H. (査読あり)
8. Interactions between BMP-7 and USAG-1 (uterine sensitization-associated gene-1) regulate supernumerary organ formation. *PLoS ONE* **9**, e96938 (2014)
Kiso, H., Takahashi, K., Saito, K., Togo, Y., Tsukamoto, H., Huang, B., Sugai, M., Shimizu, A., Tabata, Y., Economides, A. N., Slavkin, H. C. and Bessho, K. (査読あり)
9. Prospective signs of cleidocranial dysplasia in Cebpb deficiency. *J. Biomed Sci* **21**, 44 (2014)
Huang, B., Takahashi, K., Jennings, E. A., Puntang-on, P., Kiso, H., Togo, Y., Saito, K., Sugai, M., Akira S., Shimizu, A. and Bessho, K. (査読あり)
10. Evasion from accelerated blood clearance of nanocarrier named as "Lactosome" *Biochim. Biophys. Acta* **1830** (2013)
Hara, E., Makino, A., Kurihara, K., Sugai, M., Shimizu, A., Hara, I., Ozeki, E., Kimura, S. (査読あり)
11. The metalloid arsenite induces nuclear export of Id3 possibly via binding to the N-terminal cysteine residues *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **433** (2013)
Kurooka, H., Sugai, M., Mori, K. and Yokota, Y. (査読あり)
12. Phenotypes of CCAAT/enhancer-binding protein beta deficiency: hyperdontia *Oral Diseases* **19** (2013)
Huang, B., Takahashi, K., Sakata-Goto, T., Kiso, H., Togo, Y., Saito, K., Tsukamoto, H., Sugai, M., Shimizu, A. and Bessho, K. (査読あり)
13. *In situ* differentiation of CD8 $\alpha\alpha$ T cells from CD4 T cells in peripheral lymphoid tissues *Scientific Reports* **2**, 645-623(2012)
Nambu, Y., Hayashi, T., Jang, K.J., Aoki, K., Mano, H., Nakano, K., Osato, M., Takahashi, K., Itoh, K., Teramukai, S., Komori, T., Fujita, J., Ito, Y., Shimizu, A. & Sugai, M. (査読あり)
14. Id2 controls chondrogenesis acting downstream of BMP signaling during maxillary morphogenesis *Bone* **50**, 69-78 (2012)
Sakata-Goto, T., Takahashi, K., Kiso, H., Huang, B., Tsukamoto, H., Takemoto, M., Hayashi, T., Sugai, M., Nakamura, T., Tokota, Y., Shimizu, A., Slavkin, H. and Bessho, K. (査読あり)

15. Functions of Runx in IgA class switch recombination. *J. Cellular Biochemistry* 112, 409-414 (2012)

Sugai, M., Watanabe, K., Nambu, Y., Hayashi, T. and Shimizu, A. (査読あり)

16. 制御性 T 細胞と大腸炎関連派発癌 GI Research 20 (6) 466-471 (2012)
菅井学、南部由希子、清水章 (査読なし)

17. IgA へのクラススイッチと転写因子(Runx2/3) 臨床免疫・アレルギー科 57 (5) 484-493 (2012)
菅井学、渡邊翔、南部由希子、林達成、清水章 (査読なし)

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Transcription factor Sip1 functions to prevent autoimmunity in the BCR checkpoint of immature B cell stage 第 89 回日本生化学会大会 2016 年 9 月 26 日、仙台国際センター(宮城県 仙台市) 林達成、南部由希子、眞野浩人、ジャン キョンジン、東雄二郎、クリスティン ヴァーシェーレン、ダニー ハイレポーエック、清水章、菅井学

2. Mitochondrial function provides instructive signals for activation-induced B-cell fates. 日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター(北海道 札幌) 2015 年 11 月 19 日
Jang, K J., Mano, H., Aoki, K. Hayashi, T., Muto A., Nambu, Y., Takahashi, K., Itoh, K., Taketani, S., Nutt, S.L., Igarashi, K., Shimizu, A. and Sugai, M.

3. The role of transcription factor Sip1 for the repression of Rag genes and its synergistic effect with CD19 on autoimmunity 日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター(北海道 札幌) 2015 年 11 月 19 日
Hayashi T., Nambu Y., Jang KJ., Mano H., Higashi Y., Verschueren K., Huylebroeck D., Shimizu A. and Sugai M.

4. 転写因子 Sip1 による IL-7 シグナルおよび免疫グロブリン遺伝子組換えの制御、BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会)神戸ポートアイランド 2015 年 12 月 2 日

林達成、南部由希子、眞野浩人、ジャンキョンジン、東雄二郎、クリスティンヴァーシェーレン、ダニーハイレポーエック、清水章、菅井学

5. ミトコンドリア機能による活性化 B 細胞運命決定機構 第 39 回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会、特別講演 岡山コンベンションセンター(岡山県 岡山市) 2015 年 8 月 29 日
菅井学

6. B cell-fate determination by mitochondrial ROS via inhibition of heme synthesis 第 87 回日本生化学会大会 シンポジウム、2014 年 10 月 16 日 京都国際会議場(京都府 京都市)
Sugai M. Kyoung-Jin Jang

7. ミトコンドリアによる活性化 B 細胞運命決定機構の解析-ヘム合成制御による分化決定-第 87 回日本生化学会大会 シンポジウム、2014 年 10 月 17 日 京都国際会議場(京都府 京都市)
蔣景直、眞野浩人、青木耕中、林達成、武藤哲彦、南部由希子、原恵甲、高橋克、伊藤克彦、竹谷茂、五十嵐和彦、清水章、菅井学

8. Mitochondrial function regulates heme oxygenase-1 expression through modulating ability of heme synthesis 8th International Conference on Heme Oxygenases, BioIron & Oxidative Stress, Sydney, Australia 9th Oct. 2014. (Oral presentation)
Sugai M. Kyoung-Jin Jang, Kazuhiko Igarashi and Akira Shimizu

9. Essential role of SIP1 and CD19 in B cell differentiation. 日本免疫学会学術集会、幕張メッセ(千葉県 幕張) 2013 年 12 月 11 日
Hayashi T, Nambu Y, Jang KJ, Mano H, Higashi Y, Kristin V, Danny H, Shimizu A, Sugai M.

10. In situ differentiation of CD8aa T cells from CD4 T cells in peripheral lymphoid tissues. 日本分子生物学会年会、福岡国際会議場(福岡 博多) 2012 年 12 月 13 日
Nambu Y, Hayashi T, Jang KJ, Aoki K, Mano H, Nakano K, Osato M, Takahashi K, Itoh K, Teramukai S, Komori T, Fujita J, Ito Y, Shimizu A, Sugai M.

〔図書〕(計 1 件)

Roles of the Epithelial Autophagy in the
Intestinal Mucosal Barrier
Chronic inflammation 603-616
DOI:10.1007/978-4-431-56068-5_45
(2016)
Aoki K. and Sugai M.

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

取得状況(計 2 件)

名称：
T細胞の分化誘導方法、T細胞の製造
方法、T細胞、医薬組成物、及び、ス
クリーニング方法

発明者：
菅井学、清水章、南部由希子

権利者：
京都大学

種類：特願
番号：2012-101390

出願年月日：平成24年4月26日

国内外の別：国内

名称：
T細胞の分化誘導方法、T細胞の製造
方法、T細胞、医薬組成物、及び、ス
クリーニング方法

発明者：
菅井学、清水章、南部由希子

権利者：
京都大学

種類：PTC
番号：PTC/JP2013/056758

出願年月日：平成25年3月12日

国内外の別：国外

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者 菅井 学
(Manabu Sugai)
福井大学・学術研究院医学系部門・
教授
研究者番号：90303891

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：