

## 研究課題別評価

1 研究課題名:免疫制御性T細胞の分化メカニズムの解明とその免疫疾患治療への応用

2 研究者氏名:堀 昌平

研究員:西川 毅 (研究期間 H.16.4.1~H.19.3.31)

技術員:高山 あい子 (研究期間 H.16.9.1~H.19.3.31)

3 研究のねらい:

免疫系は「自己」「非自己」を識別し、「非自己」を排除する一方で「自己」に対する寛容性を確立・維持している。近年の研究により、健常個体の免疫系には制御性T細胞(regulatory T cells,  $T_{reg}$ )と呼ばれるCD4 T細胞サブセットが存在し、自己反応性T細胞を抑制的に制御することで自己免疫寛容の確立・維持に重要な機能を担うことが明らかにされてきた。さらに、 $T_{reg}$ は自己免疫のみならず、炎症、感染免疫、アレルギー、移植免疫、腫瘍免疫などのさまざまな免疫応答を抑制的に制御し得ることが明らかにされ、免疫恒常性の維持に極めて重要であることが示唆されてきた。従って、 $T_{reg}$ の発生・分化、抑制機能の分子基盤を明らかにすることは、基礎免疫学的にも本質的な課題であるのみならず、上記のさまざまな免疫関連疾患を克服するためにも極めて重要である。

我々は、マウスおよびヒトの致死的自己免疫疾患IPEXの原因遺伝子として同定された転写因子Foxp3に着目し、これが $T_{reg}$ 特異的に発現する分子マーカーであり、その発生・分化と機能を制御するマスター遺伝子として機能することを明らかにしてきた。本研究は、① $T_{reg}$ の免疫制御系における生理的意義を確立し、②どのような分子メカニズムでFoxp3 が誘導され、③Foxp3 がどのように $T_{reg}$ の発生・分化と抑制機能を制御するのかを解明することを目的とした。

4 研究成果:

### (1) 制御性T細胞の自己免疫寛容における生理的意義(堀)

機能的Foxp3を発現できない自然変異マウスである*scurfy*マウスにおいては $T_{reg}$ が発生・分化しないことから、*scurfy*マウスは $T_{reg}$ 欠損のために致死的な自己免疫疾患を発症すると考えられている。一方、*scurfy*マウスの骨髓細胞を致死量の放射線をあてた野生型マウスに移植して免疫細胞を*scurfy*ドナー由来の細胞に置換した骨髓キメラマウスは致死的な自己免疫疾患を発症しないことから、この自己免疫疾患は $T_{reg}$ の発生・分化異常によるのではなく、むしろ非血球系細胞、特にT細胞の分化・選択を担う胸腺上皮細胞側の異常により発症するとの仮説が提唱されてきた。我々はこれらの2つの仮説を検証する目的で、まず上記骨髓キメラマウスを作製・解析し、実際にこのキメラマウスが自己免疫疾患を発症しないことを確認した。しかしながら、このキメラマウスにおいては宿主由来の放射線抵抗性Foxp3 陽性 $T_{reg}$ が選択的に残存しており、これらが自己免疫疾患の発症を抑制していることが明らかになった。一方、非血球系細胞側のFoxp3 遺伝子異常の

病態への関与を明らかにする目的で、RAG遺伝子欠損 *scurfy* マウスを作製し、これを宿主として野生型骨髓細胞を移植した骨髓キメラを作製した。その結果、これらキメラマウスは自己免疫疾患を発症せず健常であることから、*scurfy* マウスに発症する自己免疫疾患は非血球系細胞側の異常によるのではなく、 $T_{reg}$  の欠損によることが明確に示された。従って、 $Foxp3^+ T_{reg}$  は自己免疫寛容の確立・維持において極めて本質的な役割を担っていることが明らかになった (Komatsu and Hori論文投稿準備中)。

#### (2) $Foxp3^{ires-hCD2/52}$ ノックインマウスの作製 (高山、堀)

$Foxp3^+ T_{reg}$  の免疫制御における生理的意義及び様々な疾患における機能を明らかにするためには、これを特異的に除去するシステムが必要不可欠である。また、 $Foxp3$  を誘導する上流シグナルを解析する上で、 $Foxp3$  発現を単一生細胞レベルで検出、解析することが必要である。これら2つの問題に取り組む目的で、 $Foxp3$  遺伝子座にレポーター遺伝子  $Thy1.1$  あるいは  $hCD2/52$  キメラ蛋白をノックインしたマウスモデルを作製した。これら細胞表面抗原に対しては、特異的な depleting 抗体が利用可能であり、抗体投与により  $Foxp3^+ T_{reg}$  を特異的に除去できると考えられる。まず  $Thy1.1$  ノックインマウスを得たが、レポーター発現が認められなかったため、次に  $hCD2/52$  ノックインマウスを B6 ES細胞を用いて作製した。キメラマウスからターゲッティングした遺伝子座を受け継いだ F1 マウスがなかなか得られなかったが、最近ようやく1匹 F1 マウスを得て、この末梢血を解析したところレポーターの発現が認められた。今後、様々な組織、細胞種におけるレポーター発現を詳細に検討し、抗  $hCD52$  抗体投与によって  $Foxp3^+ T_{reg}$  の特異的除去が可能であるか検討する予定である。

#### (3) $Foxp3$ の構造活性相関解析 (西川)

$Foxp3$  がどのような分子メカニズムによって  $T_{reg}$  の発生・分化と機能を制御するのかを明らかにする目的で、まず  $Foxp3$  の機能発現に必要な機能ドメインの同定を行った。 $Foxp3$  は既知の機能ドメインを持たない N 末端領域、leucine-zipper、zinc finger、forkhead ドメインからなるが、これらを欠いた欠損変異体を作製し、レトロウィルスを用いてナイーブ ( $CD25^{-}45RB^{hi}$ )  $CD4^+$  T細胞に導入することで  $T_{reg}$  と同様の性質と機能を与えるか検討した。その結果、 $Foxp3$  の機能発現には forkhead ドメインを解した DNA 結合、leucine-zipper を解した homodimer 化、ND ドメインを解した他の核内因子との相互作用が必要であることが示唆された (Nishikawa, Takayama and Hori 論文投稿準備中)。

#### (4) IPEX 型 $Foxp3$ 遺伝子変異の $T_{reg}$ 発生・分化と機能に与える影響 (堀、高山、西川)

次に、ヒト IPEX 患者に発症する自己免疫疾患が  $T_{reg}$  の発生・分化、機能異常によるのかを明らかにするために、IPEX 患者で同定・報告されている  $Foxp3$  変異の  $T_{reg}$  分化と機能に与える影響を解析した。このために IPEX 患者で同定されている  $Foxp3$  変異体を7種作製し、レトロウィルスを用いてナイーブ  $CD4^+$  T細胞に導入することで  $T_{reg}$  と同様の性質と機能を与えるか検討した。その結果、変異体を導入した T細胞は *in vitro* において通常の T細胞の増殖応答を抑制する機能、及び *in vivo* において SCID マウスにナイーブ T細胞を移入することによって誘導される炎症性腸炎の発症を抑制する機能を示すことができなかった。また、ほとんどの変異体は抑制機能のみならず  $CD25$ ,

GITR, CTLA-4 など $T_{reg}$ に発現するマーカー分子群も正常に誘導できなかったことから、これら変異により $T_{reg}$ の発生・分化が障害されることが明らかになった。一方、非常に興味深いことに、これらのうち一つの変異体は $T_{reg}$ マーカー分子群を正常に誘導したことから、この変異によって $T_{reg}$ の分化ではなく機能が選択的に障害される可能性が考えられた。以上の結果は、IPEX患者においては $T_{reg}$ の発生・分化あるいは機能が障害されており、このためにIPEXが発症するという可能性を強く示唆している(Hori, Takayama and Nishikawa論文投稿準備中)。

#### (5) 免疫抑制機能に関わるFoxp3 の標的遺伝子の探索(高山、堀)

$T_{reg}$ の抑制機能に選択的に障害を与えるIPEX型変異体が存在するという上記の知見は、この変異により抑制機能に関わる抑制機能分子が選択的に誘導されなくなるために免疫抑制活性を示すことができないという可能性を示唆している。この作業仮説を検証する目的で、DNAマイクロアレイ法により野生型Foxp3 を導入したT細胞群とこの変異体を導入したT細胞群のあいだで遺伝子発現プロファイルと比較した。その結果、これら 2 種類のT細胞群は極めて類似した遺伝子発現パターンを示すこと、しかしながら、少数の遺伝子群の発現がこの変異により影響されることを見出した。発現解析により、これらのうちの一つの遺伝子(ここではFit1: Foxp3-induced transcript 1 と呼ぶ)が $T_{reg}$ の機能的活性化に伴って誘導される遺伝子であることを見出し、抑制機能に関わる重要な遺伝子であると考えられた。そして、T細胞特異的にFit1 を発現するトランスジェニックマウスを作製し、これをscurfyマウスと交配させることでscurfyマウスに見られるT細胞の異常増殖が部分的に是正されたことからFit1 はFoxp3 の機能を担う重要な標的遺伝子であることが示唆された。現在、Fit1 をT細胞特異的に欠損するノックアウトマウスを作製・解析してその $T_{reg}$ における機能を解析している。

#### (6) 今後の展望

本研究により、制御性T細胞の発生・分化あるいは機能の異常が IPEX という重篤な自己免疫疾患の発症に直結することが明らかにされ、制御性T細胞が自己免疫寛容の確立・維持に必須の役割を担っていることが明らかになった。さらに、IPEX 型 Foxp3 変異体の解析を通して、抑制機能に関わると考えられる候補遺伝子を同定することができた。本研究期間内にこれら遺伝子の制御性T細胞における機能を明らかにすることはできなかったが、今後の研究を通して制御性T細胞による免疫抑制機構の分子メカニズムが解明されることを期待している。そして、最終的には、免疫抑制機構の分子メカニズムを解明することで制御性 T 細胞の機能を人為的に制御することが可能になり、自己免疫疾患、炎症性疾患、アレルギー、慢性感染症、がんなどの様々な免疫関連疾患の新たな治療法の開発に貢献したいと考えている。

#### 5 自己評価:

本研究は当初、① $T_{reg}$ による免疫制御機構の生理的意義、②Foxp3 の誘導メカニズム、③Foxp3 の標的遺伝子の同定と転写制御機構の解明、という3つの大きな目標を掲げていた。①および②に関しては、まずFoxp3 発現細胞を単一生細胞レベルで検出・同定し、これを特異的に除去することを可能にする実験ツールとしてFoxp3<sup>hCD2/52</sup>ノックインマウスを確立することでこれらの問題にア

ブローチする戦略をとったが、ノックインマウスの作製が当初の計画通り円滑には進まず多大な時間と労力を費やした。苦勞の甲斐あって最終年次後半になってようやくマウスを得ることができたが、本研究期間内にこのマウスをツールとして当初目標としたこれら 2 つの問題に取り組むことがほとんどできなかった。しかしながら、①に関しては *scurfy* マウスを用いた骨髓キメラマウスを作製することにより、*scurfy* マウスに発症する自己免疫疾患が古くから提唱されていたような胸腺環境の異常ではなく  $T_{reg}$  の欠損によることを初めて明確に証明することができ、一定の成果を得ることができた。この結果は、 $T_{reg}$  が自己免疫寛容の確立・維持において必須の役割を担っているという概念を確立するものであり、その意味で大きな成果であると考えている。

一方、本研究では③の問題に集中して取り組み、未だ不明である  $T_{reg}$  による免疫抑制の分子メカニズムを解明する上で大きな手がかりを得ることができたと考えている。この問題にアプローチするために、まずヒト IPEX 患者に見つかっている Foxp3 遺伝子の変異の  $T_{reg}$  の発生・分化と機能に与える影響を解析することから始めたが、その研究のなかから  $T_{reg}$  の機能に選択的に障害を与える変異体を同定するというセレンディピティーに恵まれた。そして、この変異によって発現が影響を受ける遺伝子を網羅的にスクリーニングすることで、 $T_{reg}$  の抑制機能と強く相関して発現する遺伝子を絞りこむことに成功した。しかしながら、本研究期間内にこれら候補遺伝子の  $T_{reg}$  の機能における役割を明確に示すことができず、今後の課題として残っている。

本研究において私は、 $T_{reg}$  の発生・分化と機能の分子メカニズムを解明する上で Foxp3 の次のブレークスルーとなるような大きな研究を目指してきた。本研究期間内にはその目標を明確なことにすることはできなかったが、大きな手がかりを得ることができたのではないかと考えているし、また実際論文文化できるストーリーを複数作ることができた。一方で、得られた結果を論文としてまとめて具体的成果を挙げるという点がおろそかになりがちであり、この点は大きな反省点、今後の課題として残っている。

## 6 研究総括の見解：

致死的自己免疫疾患である IPEX の原因遺伝子である転写因子 Foxp3 は、制御性 T 細胞特異的に発現する分子であり、その発生・分化と機能を制御するマスター遺伝子として機能するということを明らかにした本研究者の実績を踏まえて、本研究は、制御性 T 細胞の免疫制御系における生理的意義の確立、Foxp3 が誘導される分子メカニズム、Foxp3 による制御 T 細胞の発生・分化と抑制機構の制御メカニズムの解明を目的とし、重要な成果を挙げた。特に第 3 の目的に関しては、制御性 T 細胞による免疫抑制の分子メカニズムを解明する上で大きな手がかりとなる成果を挙げ、今後の発展に大きい期待を寄せることができる。

## 7 主な論文等：

### 論文

1. Wang, Y.M., Zhang, G.Y., Wang, Y., Hu, M., Wu, H., Watson, D., Hori, S., Alexander I.E., Harris, D.C., Alexander, S.I. (2006) Foxp3-transduced polyclonal regulatory T cells protect

- against chronic renal injury from adriamycin. *Journal of American Society of Nephrology* **17**: 697-706
2. Chai, J.G., Xue, S.A., Coe, D., Addey, C., Bartok, I., Scott, D., Simpson, E., Stauss, H.J., Hori, S., Sakaguchi, S., Dyson, J. (2005) Regulatory T cells, derived from naive CD4+CD25- T cells by in vitro Foxp3 gene transfer, can induce transplantation tolerance. *Transplantation* **79**: 1310-1316
  3. Hori, S. and Sakaguchi, S. (2004) Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes and Infection* **6**: 745-751

#### 受賞

平成 18 年度科学技術分野の文部科学大臣表彰:若手科学者賞(平成 18 年 4 月)

#### 招待講演

1. Workshop “The contribution of Immunology to general concepts in biology: past and future”. November 20-23, 2006. Arrabida, Portugal
2. RCAI-JST International Symposium on Immunology 2006. June 16-18, 2006. Yokohama.
3. The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. December 1-3, 2004. Sapporo.
4. The 30th Annual Meeting of the Portuguese Society of Immunology. September 30-October 2, 2004. Oeiras, Portugal.
5. Workshop “Regulating Autoimmunity”. June 14-16, 2004. Storforsen, Sweden.