

「免疫難病・感染症等の先進医療技術」

平成15年度採択研究代表者

坂口 志文

(京都大学再生医科学研究所 教授)

「制御性T細胞による新しい免疫制御法の開発」

1. 研究実施の概要

CD25⁺CD4⁺制御性T細胞は、正常個体の末梢に生理的に存在する特異なT細胞集団であり、免疫応答を抑制的に制御する。この細胞集団の機能的異常は、ヒトの自己免疫疾患、アレルギーなどの直接原因となりうる。従って、この制御性T細胞群の機能を明らかにすれば、ヒト自己免疫病の新しい治療法につながる。また、制御性T細胞の機能を人為的に弱めて免疫応答を増強すれば、難治感染症や悪性腫瘍に対する免疫応答の増強による免疫療法の開発が可能となる。一方、制御性T細胞を抗原特異的に増強できれば、移植片に対して特異的免疫寛容状態を誘導できよう。そのため、本研究では、CD25⁺CD4⁺制御性T細胞の産生機構、抑制機能を、分子レベル、細胞レベル、個体レベルで解明する。即ち、制御性T細胞上に発現する抑制機能分子、増殖・活性化に関与する分子を同定し、抑制機構、増殖・活性化機構を解明する。また、それらの胸腺内、末梢での発生・分化機構を解明する。その展開として、制御性T細胞による自己免疫病治療法の開発、制御性T細胞機能の強化による移植免疫寛容導入法、あるいは減弱による腫瘍免疫誘導法、さらに制御性T細胞機能の操作による感染症・アレルギー治療法を開発する。さらに、これらの方法を用いて前臨床的研究につなげる。

2. 研究実施内容

本プロジェクトでの最近の成果は、制御性T細胞の発生、分化に重要ないくつかの分子を同定、解析したことである。FOXP3は、ヒトの遺伝性疾患IPEX (Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome)の原因遺伝子である。本疾患が、制御性T細胞の除去による自己免疫疾患と酷似していることから、Foxp3が制御性T細胞の発生、機能に果たす役割を解析した。その結果、Foxp3が、マウスの胸腺、末梢CD25⁺CD4⁺T細胞に特異的に発現しているとの結果を得た。レトロウイルスベクターにFoxp3遺伝子を組み込み、正常マウスのナイーブT細胞を制御性T細胞に転換できることを示した。ヒト末梢T細胞におけるFOXP3遺伝子の発現を検索したところ、FOXP3は、末梢血CD25⁺CD4⁺T細胞に特異的に発現していた。また、ナイーブT細胞を様々な方法で活性化してもFOXP3の発現を誘導できなかった。マウスと同じく、レトロウイルスベクターにFOXP3遺伝

子を組み込み、末梢血ナイーブT細胞を制御性T細胞に転換できた。

制御性T細胞はCD25, 即ちInterleukin-2 receptor (IL-2 R)を構成的に発現する。IL-2 およびIL-2Rの制御性T細胞における役割を検討するため、IL-2中和抗体投与が、CD25+CD4+制御性T細胞の動態におよぼす影響を解析した。正常マウスにIL-2中和抗体を投与すると、CD25+CD4+ T細胞は選択的に減少し、自己免疫病が発症することを見出した。さらにI型糖尿病を自然発症するNODマウスに抗IL-2抗体を投与すると糖尿病の発症は促進され、他臓器にも自己免疫病が高頻度で発症した。

以上に述べたように、FOXP3遺伝子は、マウス、ヒトCD25+CD4+T細胞に特異的に発現しており、制御性T細胞の特異的分子マーカーである。また、FOXP3遺伝子を導入により、マウスT細胞、ヒト末梢血ナイーブT細胞を制御性T細胞に転換できる。これを用いた自己免疫病の細胞療法が可能である。IL-2は、制御性T細胞の胸腺での産生、末梢での生存・増殖に必須のサイトカインである。そのレセプターであるCD25は、制御性T細胞にとって機能的に必須の分子である。IL-2の量的、質的異常は自己免疫病の原因となる。また、IL-2の量的操作により制御性T細胞の操作が可能であり、免疫疾患の治療に有用である。また、CD25は制御性T細胞の単なるマーカーでなく、その機能に必須の分子である。

3. 研究実施体制

本研究はすべて、坂口志文グループで行う。

①研究分担グループ長：坂口 志文（京都大学 再生医科学研究所 生体機能調節学分野、教授）

②研究実施項目：

- (1) 制御性T細胞上に発現する抑制機能分子の同定。
- (2) 制御性T細胞の増殖・活性化に関する分子の同定と増殖・活性化機構の解明。
- (3) 制御性T細胞の胸腺内発生・分化機構の解明。
- (4) 制御性T細胞による自己免疫病治療法の開発。
- (5) 制御性T細胞機能の強化による移植免疫寛容導入法の開発。
- (6) 制御性T細胞機能の減弱による腫瘍免疫誘導法の開発。
- (7) 制御性T細胞機能の操作による感染症・アレルギー治療法の開発。

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- Sakaguchi, S.: Naturally arising *Foxp3*-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature Immunol.* 6: 345-352, 2005.
- Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., and Sakaguchi, S.: A crucial role of IL-2 in the homeostatic maintenance of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells: induction of autoimmune disease by neutralization of IL-2. *J. Exp. Med.*

- 201:723-735, 2005.
- Yoshitomi, H., Sakaguchi, N., Brown, G., Tagami, T., Sakihama, T., Nomura, T., Akira, S., Gordon, S., Nakamura, T., and Sakaguchi, S.: Environmental stimulation of innate immunity triggers chronic arthritis in mice genetically prone to produce arthritogenic autoimmune T cells: a key role of fungal β -glucans and their receptor Dectin-1. *J. Exp. Med.* 201: 949-960, 2005.
 - Nishikawa H, Kato T, Tawara I, Saito K, Ikeda H, Kuribayashi K, Allen PM, Schreiber RD, Sakaguchi S, Old LJ, Shiku H. Definition of target antigens for naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 201: 681-686, 2005.
 - Sakaguchi, S., and Sakaguchi, N.: History of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *In* Regulatory T cells in inflammation, *Progress in Inflammation Research*. Eds. L. S. Taams, A. N. Akbar, and M. H. M. Wauben, Birkhaeuser Verlag, Basel, p3-17, 2005.
 - Kuroda N, Mitani T, Takeda N, Ishimaru N, Arakaki R, Hayashi Y, Bando Y, Izumi K, Takahashi T, Nomura T, Sakaguchi S, Ueno T, Takahama Y, Uchida D, Sun S, Kajiura F, Mouri Y, Han H, Matsushima A, Yamada G, Matsumoto M. Development of Autoimmunity against Transcriptionally Unrepressed Target Antigen in the Thymus of Aire-Deficient Mice. *J. Immunol.* 174:1862-1870, 2005.
 - Matsubara, Y., Hori, T., Morita, R., Sakaguchi, S., and Uchiyama, T.: Phenotypic and functional relationship between adult T cell leukemia and regulatory T cells. *Leukemia* 19:482-483, 2005.
 - Fehervari, Z., and Sakaguchi, S.: Regulatory T cells. In "Measuring Immunity" eds. M. T. Lotze and A. W. Thompson, Elsevier. p322-335, 2005.
 - Gondek, D. C., Lu, L-F., Quezada, S. A., Sakaguchi, S., and Noelle, R. J. Cutting Edge: Contact-mediated suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J. Immunol.* 174: 1783-1786, 2005.
 - Turk MJ, Guevara-Patino JA, Rizzuto GA, Engelhorn ME, Sakaguchi, S., and Houghton AN.: Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 200:771-82, 2004.
 - Sakaguchi, N., Takahashi, T., Hata, H., Nomura, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Sakihama, T., Negishi, I., Nakatsuru, S., and Sakaguchi, S.: Altered thymic T-cell selection due to a spontaneous mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis. *Immunology 2004*. Medimond S.r.l., Bologna,

Italy. p239-242, 2004.

- Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., and Sakaguchi, S.: A crucial role of IL-2 in the homeostatic maintenance of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Immunology 2004*. Medimond S.r.l., Bologna, Italy. p341-344, 2004.
- Ono, M., Shimizu, J., Miyachi, Y., and Sakaguchi, S.: Induction of fatal autoimmune myocarditis and other autoimmune diseases in mice by depleting Foxp3-expressing T cells. *Immunology 2004*. Medimond S.r.l., Bologna, Italy. p193-195, 2004.
- Muriglan, S. J., Ramirez-Montagut, T., Alpdogan, O., Van Huystee, T. W., Eng, J. M., Hubbard, V. M., Kochman, A. A., Tjoe, K. H., Riccardi, C., Pandolfi, P. P., Sakaguchi, S., Houghton, A. N., and Van Den Brink, M. R.: GITR Activation induces an opposite effect on alloreactive CD4⁺ and CD8⁺ T cells in graft-versus-host disease. *J. Exp. Med.* 200:149-157, 2004.
- Ying Li, Y., Koshiba, T., Yoshizawa, A., Yonekawa, Y., Ito, A., Mori, T., Kawamoto, H., Tanaka, Y., Sakaguchi, S., Minato, N., Wood, K. J., and Tanaka, K: Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation. *American J. Transplantation.* 4:2118-2125, 2004.
- Fehervari, Z., and Sakaguchi, S.: CD4⁺ regulatory T cells and immune control. *J. Clin. Invest.* 114:1209-117, 2004.
- He, H., Messer, R.J., Sakaguchi, S., Yang, G., Robertson, S. J., and Hasenkrug, K. J. Reduction of retrovirus-induced immunosuppression by *in vivo* modulation of T cells during acute infection. *J. Virology.* 78:11641-7, 2004.
- Takahata, Y., Nomura, A., Takada, H., Ohga, S., Furuno, K., Hikino, S., Nakayama, H., Sakaguchi, S., Hara, T.: CD25⁺CD4⁺ T cells in human cord blood: an immunoregulatory subset with naive phenotype and specific expression of forkhead box p3 (Foxp3) gene. *Exp Hematol.* 32:622-629, 2004.
- Yagi, H., Nomura, T., Nakamura, K., Kitawaki, T., Hori, S., Maeda, M., Onodera, M., Uchiyama, T., Fujii, S., and Sakaguchi, S.: Crucial role of *FOXP3* in the development and function of human CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Int. Immunol.* 16: 1643-1656, 2004.
- Sakaguchi, S., Ko, K., Yamazaki, S., Nakamura, K., Hirota, K., and Nomura, T.: Regulatory T cells in tumor immunity. In *Cancer Immunotherapy*, edit. K. Toyoshima, J. C. Barrett, E. Klein, Y. Hashimoto, and H. Wakasugi. Princess Takamatsu Cancer Research Fund, Tokyo, P47-51, 2004.
- Kanamaru, F., Youngnak, P., Hashiguchi, M., Nishioka, T., Takahashi, T.,

- Sakaguchi, S., Ishikawa, I., and Azuma, M.: Costimulation via glucocorticoid-induced TNF receptor in both conventional and CD25⁺ regulatory CD4⁺ T cells. *J. Immunol.* 172: 7306-7314, 2004.
- Fehervari, Z., and Sakaguchi, S.: Control of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cell activation and function by dendritic cells. *Int. Immunol.* 16:1769-1780, 2004.
 - Hata, H., Sakaguchi, N., Yoshitomi, H., Iwakura, Y., Sekikawa, K., Rennick, D., Azuma, Y., Kanai, C., Moriizumi, E., Nakamura, T., and Sakaguchi, S.: Distinct contribution of IL-6, TNF- α , IL-1, and IL-10 to T cell-mediated spontaneous autoimmune arthritis in mice. *J. Clin. Invest.* 114: 582-588, 2004.
 - Nishimura, E., Sakihama, T., Setoguchi, R., Tanaka, K., and Sakaguchi, S.: Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Int. Immunol.* 16: 1189-1201, 2004.
 - Dittmer, U., He, H., Messer, R. J., Schimmer, S., Olbrich, A. R., Ohlen, C., Greenberg, P. D., Stromnes, I. M., Iwashiro, M., Sakaguchi, S., Evans, L. H., Peterson, K. E., Yang, G., Hasenkrug, K. J.: Functional impairment of CD8⁺ T cells by regulatory T cells during persistent retroviral infection. *Immunity.* 20: 1-20, 2004.
 - Suri, A., Shimizu, J., Katz, J. D., Sakaguchi, S., Unanue, E. R., and Kanagawa, O.: Regulation of autoimmune diabetes by non-islet-specific T cells - a role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Eur. J. Immunol.* 34: 447-454, 2004.
 - Kajiura, F., Sun, S., Nomura, T., Izumi, K., Ueno, T., Bando, Y., Kuroda, N., Han, H., Li, Y., Matsushima, A., Takahama, Y., Sakaguchi, S., Mitani, T., and Matsumoto, M.: NF- κ B-inducing kinase establishes self-tolerance in a thymic-stroma dependent manner. *J. Immunol.* 172: 2067-2075, 2004.
 - Hori, S., and Sakaguchi, S.: Foxp3, a critical regulator of regulatory T cell development and function. *Microbes and Infection.* 6: 745-51, 2004.
 - Choi, B. K., Bae, J. S., Choi, E. M., Kang, W. J., Sakaguchi, S., Vinay, D. S., and Kwon, B.: S. 4-1BB-dependent inhibition of immunosuppression by activated CD4⁺CD25⁺ T cells. *J. Leukoc. Biol.* 75: 785-791, 2004.
 - Sakaguchi, S.: Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Ann. Rev. Immunol.* 22:531-562, 2004.
 - Zhang, X., Koldzix, D.J., Izikson, L., Reddy, J., Nazareno, R. F.,

Sakaguchi, S., Kuchroo, V. K., and Weiner, H. L. IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Int. Immunology*. 16: 1-8, 2004.

- Fehervari, Z., and Sakaguchi, S.: Development and function of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Curr. Opinion in Immunol.* 16:203-208, 2004.
- Fehervari, Z. and Sakaguchi, S.: A paragon of self-tolerance:Regulatory T cells and the control of immune responses. *Arthritis Res. Ther.* 6: 19-25, 2004.

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：1件 (CREST研究期間累計件数：1件)