

「炎症の慢性化機構の解明と制御に向けた基盤技術の創出」
平成24年度採択研究代表者

H24 年度 実績報告

坂口 志文

大阪大学 WPI 免疫学フロンティア研究センター教授

制御性T細胞による慢性炎症制御技術の開発

§1. 研究実施体制

(1)「坂口」グループ

① 研究代表者:坂口 志文 (大阪大学免疫学フロンティア研究センター、教授)

② 研究項目

- ・制御性 T 細胞による慢性炎症制御技術の開発

§2. 研究実施内容

本研究では、制御性T細胞（Regulatory T cell、以下 Treg と略）による慢性炎症の抑制的制御機構の解明と、それを標的とした免疫応答の制御技術の開発をめざす。特に、自己免疫病、臓器移植、癌における Treg の役割の解明と、Treg の増殖また抑制機構の強化による自己免疫、移植臓器拒絶の抑制、逆に、Treg の減少、抑制の減弱による癌免疫の予防的、治療的強化をめざす。

（1）機能的な Treg の分化誘導による免疫疾患治療法の確立

本年度は、Treg の機能、および細胞系譜の安定性維持におけるエピジェネティック機構について解析を進めた。現在、Foxp3+T細胞を Treg として定義する考え方が一般的であるが、厳密には、Foxp3 発現細胞と Treg は同義ではない。細胞系譜を決定する要素として、転写因子を含むタンパク質発現の有無に加えて、遺伝形質としての非ゲノム情報、すなわちエピゲノムの再構成が重要である。機能的に安定な Treg の誘導、作製には、Foxp3 発現誘導と Treg 型エピゲノム誘導が共に必要と考えられる。本年度、まず、全ゲノムにわたる Treg の DNA メチル化パターンを MeDIP (methylated DNA immunoprecipitation) シーケンス法で網羅的に解析し、それによって得られた non-Treg 特異的メチル化部位（即ち Treg 特異的脱メチル化部位）を Bisulfite シーケンス法によって確認した。その結果、以下の知見を得た。（1）Treg には、いくつかの Treg 特異的脱メチル化部位が存在し、これらの部位のメチレーション状態を調べることで、Treg 特異的エピジェネチックス状態を判定できる。（2）Treg 特異的エピジェネチックスは、内在性 Treg で導入されるが、単なる T 細胞活性化、Th1, Th1, Th17 などその他の T 細胞サブセット、また試験管内で誘導された Foxp3+Treg では導入されない。（3）実際この方法で、胸腺で産生される Treg はの形成は、Foxp3 の発現誘導とは独立の事象として成立する。（4）Treg 特異的エピジェネチックスの誘導も Foxp3 の発現も共に T 細胞抗原レセプター（TCR）を介するシグナルによる。

今後、様々なヒストン修飾に対するクロマチン免疫沈降シーケンシング、RNA シーケンシングによる noncoding RNA を含めた全 RNA 分子の解析、CAGE テクノロジーによる転写開始点の解析等をゲノムワイドに行い、バイオインフォマティクスを用いた解析により、Treg 分化を規定するエピゲノムの解明を目指す。

（2）Treg による免疫抑制機構と自己反応性 TCR レパトア獲得機構の解析

CTLA-4 は Treg に構成的に高発現し、その抑制機能に重要である。Treg 特異的 CTLA-4 欠損マウスを抑制機能が障害される。また、Treg は、その特徴として IL-2 を産生しないが、高親和性 IL-2 レセプターを構成的に高発現することで周囲から IL-2 を吸収し、他の T 細胞の活性化を妨げると考えられる。しかしながら、その他にも複数の抑制機構が報告されており、CTLA-4 あるいは IL-2/CD25 依存的抑制機構がどの程度に Treg による免疫抑制に重要かについては議論がある。今年度、この問題を解決するため、正常 T 細胞が IL-2 を産生せず、CTLA-4、CD25 を高発現した場合、そのような T 細胞は抑制活性をもつか検討した。その結果、CTLA-4 をトランスジーンとして発現

する IL-2 遺伝子欠損マウスは、抗原刺激を受けた場合、CD25 を高発現し、試験管内、生体内で抑制活性を獲得することを示した。さらに、胸腺での Treg の発生時、Treg の TCR レパトアが如何にして自己抗原認識に偏移するかに関して、CTLA-4 が Treg 前段階の T 細胞に発現すると、CD28 シグナルが阻害され TCR シグナルが弱められ、その結果、T 細胞選択に関わる自己抗原ライガンドに高親和性、即ち、正常なら負の選択を受ける自己反応性 T 細胞は、負の選択を免れ、正の選択を受ける。以上の結果として、Treg の TCR レパトアは自己反応性の高い方向に偏移すると考えられた(山口ら、論文投稿中)。

(3) Foxp3 結合因子の解析による Treg 機能の解明とそれを標的とした免疫応答制御法の開発

Treg 細胞系譜を決定づける要素が Treg 型エピゲノムの成立であるのに対し、Treg 機能の中核を担う分子は転写因子 Foxp3 である。Foxp3 結合因子の解析から、Treg 機能の分子基盤解明をめざした。Foxp3 転写コンプレックスの精製および質量分析による網羅的解析により、Foxp3 転写コンプレックスの全体像はほぼ明らかした。これらの転写コンプレックス構成要素から、Treg 機能発現、分化誘導に関わると考えられる遺伝子として Bcl11b に注目し、その Treg 特異的遺伝子欠損マウスを作製して解析を進めている(濱口ら、論文投稿中)。

(4) ヒト制御性 T 細胞の解析

ヒトの FoxP3+ T 細胞は、CD45RA と FoxP3 の発現程度によって 3 サブセットに分けることができる。それぞれの発生経路、機能的安定性について、マウス Treg の解析を基に、Treg 特異的 DNA 脱メチル化部位を同定した。これを Treg エピジェネチクス マーカーとして用い、現在、様々な免疫疾患、また免疫応答(例えば癌免疫応答)における Treg の機能解析に展開している。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA, Campbell DJ, Ghosh S, Hori S, Jiang S, Kuchroo VK, Mathis D, Roncarolo MG, Rudensky A, Sakaguchi S, Shevach EM, Vignali DA, Ziegler SF. Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nat Immunol.* 14:307-308, 2013.
2. Hirayama M, Nishikawa H, Nagata Y, Tsuji T, Kato T, Kageyama S, Ueda S, Sugiyama D, Hori S, Sakaguchi S, Ritter G, Old LJ, Gnjatich S, Shiku H. Overcoming regulatory T-cell suppression by a lyophilized preparation of *Streptococcus pyogenes*. *Eur J Immunol.* 2013.(DOI: 10.1002)
3. Ohkura N, Hamaguchi M, Morikawa H, Sugimura K, Tanaka A, Ito Y, Osaki M, Tanaka Y, Yamashita R, Nakano N, Huehn J, Fehling HJ, Sparwasser T, Nakai K, Sakaguchi S. T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and *foxp3* expression are independent and complementary events required for Treg cell development. *Immunity.* 37:785-99, 2012.(DOI: 10.1016)
4. Hansen W, Hutzler M, Abel S, Alter C, Stockmann C, Kliche S, Albert J, Sparwasser T, Sakaguchi S, Westendorf AM, Schadendorf D, Buer J, Helfrich I. Neuropilin 1 deficiency on CD4+Foxp3+ regulatory T cells impairs mouse melanoma growth. *J Exp Med.* 209:2001-16, 2012.(DOI: 10.1084)
5. Noguchi, T., Kato, T., Wang, L., Maeda, Y., Ikeda, H., Sato, E., Knuth, A., Gnjatich, S., Ritter, G., Sakaguchi, S., Old, L. J., Shiku, H., and Nishikawa, H. Intracellular tumor-associated antigens represent effective targets for passive immunotherapy. *Cancer Res.* 72:1672-1682, 2012.(DOI: 10.1158)
6. Kinoshita M, Kayama H, Kusu T, Yamaguchi T, Kunisawa J, Kiyono H, Sakaguchi S, Takeda K. Dietary folic acid promotes survival of Foxp3+ regulatory T cells in the colon. *J Immunol.* 189:2869-78, 2012.(DOI: 10.4049)
7. Wing JB, Sakaguchi S. Multiple treg suppressive modules and their adaptability. *Front Immunol.* 3:178. Epub 2012.(DOI: 10.3389)
8. Shaw LA, Stefanski AL, Peterson LK, Rumer KK, Vondracek A, Phang TL, Sakaguchi S, Winn VD, Dragone LL. Pregnancy amelioration of arthritis in SKG mice corresponds with alterations in serum amyloid A3 levels. *Am J Clin Exp Immunol.* 1:12-19, 2012.
9. Keller KK, Lindgaard LM, Wogensen L, Dagnæs-Hansen F, Thomsen JS, Sakaguchi S, Stengaard-Pedersen K, Hauge EM. SKG arthritis as a model for evaluating therapies in

- rheumatoid arthritis with special focus on bone changes. *Rheumatol Int.* 2012 Sep 5. [Epub ahead of print]
10. Nishikawa, H., Maeda, Y., Ishida, T., Gnjatic, S., Sato, E., Mori, F., Sugiyama, D., Ito, A., Fukumori, Y., Utsunomiya, A., Inagaki, H., Old, L. J., Ueda, R., and Sakaguchi, S. Cancer/testis antigens are novel targets of immunotherapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood.* 119:3097-3104, 2012.(DOI: 10.1182)
 11. Meziani R, Yamada R, Takahashi M, Ohigashi K, Morinobu A, Terao C, Hiratani H, Ohmura K, Yamaguchi M, Nomura T, Vasilescu A, Kokubo M, Renault V, Hirose K, Ratanajaraya C, Heath S, Mimori T, Sakaguchi, S., Lathrop M, Melchers I, Kumagai S, Matsuda F. A trans-ethnic genetic study of rheumatoid arthritis identified FCGR2A as a candidate common risk factor in Japanese and European populations. *Mod Rheumatol.* 22:52-8, 2012. (DOI: 10.1007)
 12. Keith, R. C., Powers, J. L., Redente, E. F., Sergew, A., Martin, R. J., Gizinski, A., Holers, V. M., Sakaguchi, S., Riches, D. W. A Novel Model of Rheumatoid Arthritis-Associated Interstitial Lung Disease in SKG Mice. *Exp Lung Res.* 38:55-66, 2012. (DOI: 10.3109)
 13. Ohe, H., Waki, K., Yoshitomi, M., Morimoto, T., Nafady-Hego, H., Satoda, N., Li, Y., Zhao, X., Sakaguchi, S., Uemoto, S., Bishop, G. A., Koshiba, T. Factors affecting operational tolerance after pediatric living-donor liver transplantation: impact of early post-transplant events and HLA match. *Transpl Int.* 25:97-106, 2012.(DOI: 10.1111)
 14. Yoshioka, Y., Ono, M., Osaki, M., Konishi, I., Sakaguchi, S. Differential effects of inhibition of bone morphogenic protein (BMP) signalling on T-cell activation and differentiation. *Eur J Immunol.* 42:749-759, 2012.(DOI: 10.1002)
 15. Keith RC, Sokolove J, Edelman BL, Lahey L, Redente EF, Holers VM, Sakaguchi S. Robinson WH, Riches DW. Testosterone is protective in the sexually dimorphic development of arthritis and lung disease in SKG mice. *Arthritis Rheum.* 2013. (DOI: 10.1002). In press.

(3-2) 知財出願

- ① 平成 24 年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 0 件)