

「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

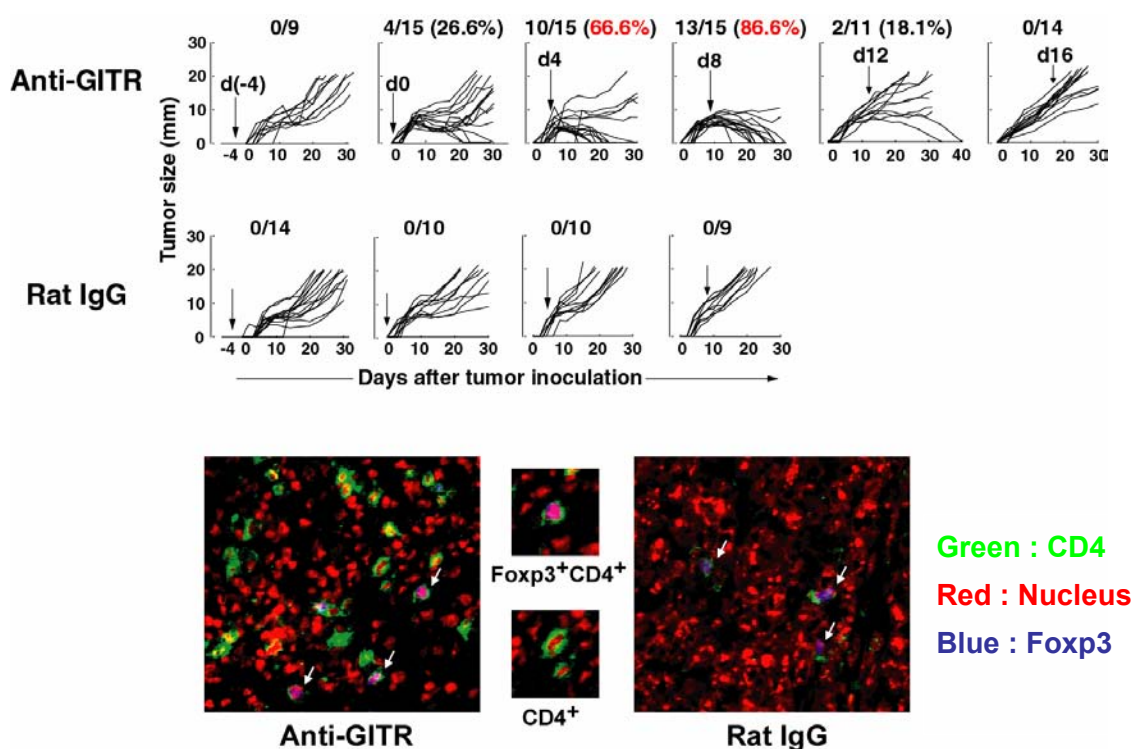
CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞は、正常個体の末梢に生理的に存在する特異な T 細胞集団であり、免疫応答を抑制的に制御する。この細胞集団の機能的異常は、ヒトの自己免疫疾患、アレルギーなどの直接原因となりうる。従って、この制御性 T 細胞群の機能を明らかにすれば、ヒト自己免疫病の新しい治療法につながる。また、制御性 T 細胞の機能を人為的に弱めて免疫応答を増強すれば、難治感染症や悪性腫瘍に対する免疫応答の増強による免疫療法の開発が可能となる。一方、制御性 T 細胞を抗原特異的に増強できれば、移植片に対して特異的免疫寛容状態を誘導できよう。そのため、本研究では、CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞の産生機構、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（「制御性 T 細胞による新しい免疫制御法の開発」）の最近の成果のひとつは、活性化制御性 T 細胞と、他の活性化 T 細胞を区別する分子の一つを同定したことである。活性化した CD25⁺CD4⁺T 細胞をラットに免疫し、活性化制御性 T 細胞と特異的に反応する単クローン抗体 TH6 を得た。この抗体の認識する分子をプロテオミクス技術を用いて解析したところ 4 型葉酸受容体 [Folate receptor 4, FR4] であった。試験管内で T 細胞をアロ抗原で刺激した場合、アロ抗原特異的制御性 T 細胞を、FR4 を高発現する T 細胞群として分離できた。分離した T 細胞群を用いて皮膚移植片の生着を促進できた。また、腫瘍を接種の後 TH6 抗体を投与すれば、制御性 T 細胞を特異的に除去できるため、腫瘍免疫を亢進できた。さらに、TH6 の Fab フラグメントを投与すれば制御性 T 細胞を減少させるこ

とを見いだした。即ち、FR4 をブロックするだけで制御性 T 細胞はアポトーシスに陥る。現在、ヒトの葉酸受容体について解析を進めている。

制御性 T 細胞に高発現する機能分子である GITR [glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene] について、この分子に対する単クローン抗体である DTA-1 を用いて、腫瘍免疫誘導法を研究した。腫瘍接種後 1 週間、腫瘍が眼に見える程度に増大した時点で DTA-1 を投与すると高率に腫瘍の退縮を起こした [下図参照]。腫瘍内部の制御性 T 細胞を転写因子 Foxp3 に対する抗体で組織染色すると、DTA-1 投与群では、有意な制御性 T 細胞の減少と活性化 T 細胞の増加がみられた [下図参照]。この抗 GITR 抗体と抗 CTLA-4 抗体を同時投与すると、さらに進行した腫瘍の退縮を惹起できた。また、DTA-1 の腫瘍内投与でも腫瘍の退縮が見られた。ヒトの GITR 分子に対する単クローン抗体を現在作製中である。



以上の研究に加えて、制御性 T 細胞による抑制の分子機構を知るべく試験管内での抑制系を用いて解析を進めている。また、制御性 T 細胞の強化による自己免疫病の治療法、移植臓器に対する免疫寛容誘導法を確立すべく研究を進めている。

3. 研究実施体制

「坂口志文」グループ

- 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・活性化に関与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
 - Wing, K., Fehervari, Z., and Sakaguchi, S.: Growing Possibilities in the Development and Function of Regulatory T cells. *Int. Immunol.* In press.
 - Sugimoto, N., Oida, T., Hirota, K., Nakamura, K., Nomura, T., Uchiyama, T., and Sakaguchi, S.: Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25⁺CD4⁺ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *Int. Immunol.* In press.
 - Nishioka, T., Shimizu, J., Iida, R., Yamazaki, S., and Sakaguchi, S.: CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells and CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells in aged mice. *J. Immunol.* In press.
 - Kim, J., Choi, W. S., Kim, H. J., Suh, J-H., Sakaguchi, S., and Kwon B.: Conversion of alloantigen-specific CD8⁺ T-cell priming through in vitro ligation of glucocorticoid-induced TNF receptor. *J. Immunol.* In press.
 - Ono, M., Shimizu, J., Miyachi, Y., and Sakaguchi, S.: Induction of fatal autoimmune myocarditis and other autoimmune diseases in mice by depleting Foxp3-expressing naturally arising CD4⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.* In press.
 - Ono, M., Setoguchi, R., and Sakaguchi, S.: Regulatory T cells in autoimmunity. *Microb. Infect.* In press.
 - Fehervari, Z., Yamaguchi, T., and Sakaguchi, S.: The dichotomous roles of IL-2: tolerance versus immunity. *Trends Immunol.* 27:109-111, 2006.
 - Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Yoshitomi, H., Hata, H., Takahashi, T., and Nomura, T.: Spontaneous development of autoimmune arthritis due to genetic anomaly of T cell signal transduction. *Semin. Immunol.* In press.
 - Yamaguchi, T. and Sakaguchi, S.: Regulatory T cells in immune surveillance and treatment of cancer. *Semin. Cancer Biol.* 16:115-123, 2006.
 - Sakaguchi, S., Takahashi, T., Hata, H., Yoshitomi, H., Tanaka, S., Hirota, K., Nomura, T., and Sakaguchi, N. SKG mice, a monogenic model of autoimmune arthritis due to altered signal transduction in T cells. *Progress in Inflammation Research.* In press.
 - Nagahama, K., and Sakaguchi, S.: Preparation of regulatory T cells in vitro. In *Immunological Tolerance: Methods and Protocols*, edit. P. J. Fairchild, Humana Press, In press.
 - Sakaguchi, S., Setoguchi, R., Yagi, H., and Nomura, T.: Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in self-tolerance and autoimmune disease. *Curr Top*

- Microbiol Immunol.* 305:51-66, 2006.
- Bach, J. F., Sakaguchi, S. Autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 17: 567-569, 2005.
 - Sakaguchi, S., Sakaguchi, N.: Animal models of arthritis caused by systemic alteration of the immune system. *Curr Opin Immunol.* 17: 589-594, 2005.
 - Yoshizawa, A., Ito, A., Li, Y., Koshiba, T., Sakaguchi, S., Wood, K. J., and Tanaka, K. The roles of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in operational tolerance after living donor liver transplantation. *Transplant. Proc.* 37:37-39, 2005.
 - Ko, K., Yamazaki, S., Nakamura, K., Nishioka, T., Hirota, K., Yamaguchi, T., Shimizu, J., Nomura, T., Chiba, T., and Sakaguchi, S. Treatment of advanced tumors with agonistic anti-GITR mAb and its effects on tumor-infiltrating Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 202: 885-891, 2005.
 - Nishikawa, H., Kato, T., Tawara, I., Saito, K., Ikeda, H., Kuribayashi, K., Allen, P. M., Schreiber, R. D., Sakaguchi, S., Old, L. J., Shiku, H. Definition of target antigens for naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 201: 681-686, 2005.
 - Chai, J-G, Xue, S., Coe, D., Addey, C., Bartok, I., Scott, D., Simpson, E., Stauss, H. J., Hori, S., Sakaguchi, S., and Dyson, J. P. Regulatory T cells, derived from naive CD4⁺CD25⁻ T cells by in vitro Foxp3 gene transfer, can induce transplantation tolerance. *Transplantation.* 79:1310-1316, 2005.
 - Quezada SA, Bennett K, Blazar BR, Rudensky AY, Sakaguchi S, Noelle RJ: Analysis of the underlying cellular mechanisms of anti-CD154-induced graft tolerance: the interplay of clonal anergy and immune regulation. *J. Immunol.* 175:771-779, 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, 3-17, 2005.
 - Nomura, T., and Sakaguchi, S.: Regulatory T cells in tumor immunity. *Curr Top Microbiol Immunol.* 293:287-302, 2005.
 - Sakaguchi, S.: Preface: Regulatory T cells in autoimmune diseases. *Int. Rev. Immunol.* 24: 157-158, 2005.
 - Sakaguchi, S. and Sakaguchi, N.: Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune diseases. *Int. Rev. Immunol.* 24:211-226, 2005.
 - Fehervari Z, Sakaguchi S.: CD4⁺ regulatory cells as a potential immunotherapy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 360:1647-1661, 2005.
 - Sakaguchi, S.: Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* 6: 345-352, 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, Kajjura 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.
- Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., and Sakaguchi, S.: Homeostatic maintenance of natural Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization *J. Exp. Med.* 201:723-735, 2005.
- Yoshitomi, H., Sakaguchi, N., Kobayashi, K., Brown, G., Tagami, T., Sakihama, T., Hirota, K., Tanaka, S., Nomura, T., Miki, I., Gordon, S., Akira, S., Nakamura, T., and Sakaguchi, S. A role for fungal β -glucans and their receptor Dectin-1 in the induction of autoimmune arthritis in genetically susceptible mice. *J. Exp. Med.* 201: 949-960, 2005.
- Fehervari, Z., and Sakaguchi, S.: Regulatory T cells. In *Measuring Immunity*, eds. M. T. Lotze and A. W. Thompson, Elsevier. 322-335, 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.

(2) 特許出願

H17 年度出願件数 : 4 件 (CREST 研究期間累積件数 : 5 件)