

「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

H25 年度 実績報告

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

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. 研究実施の概要

Treg は、異常・過剰な免疫反応の抑制機能に特化したT細胞群であり、免疫自己寛容、免疫恒常性の維持に不可欠である。Treg は転写因子 Foxp3 を特異的に発現し、Foxp3 の遺伝子変異は、ヒトの IPEX 症候群に見られるように、重篤な自己免疫疾患、炎症性腸炎、アレルギーを惹起する。また Foxp3 遺伝子を通常 T 細胞(Tconv)に強制発現させると抑制活性を誘導できる。これら知見に基づき、Foxp3 は Treg の発生・機能を司るマスター遺伝子とされてきた。しかし、我々の最近の研究により、Treg 分化には Foxp3 発現以外に、Treg 特有のエピゲノムの成立が必要であることが明らかになりつつある。本年度、Treg における詳細な遺伝子発現解析、Foxp3 等の転写因子の結合部位、およびエピゲノムデータを用い、Treg における Foxp3 依存的、非依存的遺伝子発現制御について検討した。

Treg および Tconv のT細胞抗原レセプター (TCR) 刺激前後の RNA 発現データを、Cap analysis of gene expression (CAGE)法により取得した。Treg では 48,374 個、Tconv では 45,705 個の転写開始点 (TSS) を検出し、そのうち約半数は未知の TSS であった。Tconv に比して Treg で有意に発現レベルが高い遺伝子群では、Treg 機能発現を司る Il2ra, Ctla4, Tnfrsf18 や Folr4 等が上位を占めた。興味深いことに、TCR 刺激に対する反応は Treg と Tconv で大きく異なり、Treg では TCR 刺激後の発現抑制が多く、多くの遺伝子で認められた。

次にゲノム全体における Treg と Tconv の DNA メチル化状態をメチル化 DNA 免疫沈降法により解析した。Treg で特異的に脱メチル化している領域 (TSDR)はわずか 301 カ所で、半数以上は遺伝子内部に集中して認められた。TSDR と遺伝子発現との関係を解析すると、TSDR の上流にある TSS は Tconv に比し Treg で有意に発現が高く、Treg 特異的発現を示す遺伝子群が含まれていた。この結果は、TSDR がこれらの遺伝子の enhancer として働いている可能性を示唆する。さらに、TSDR をもつ遺伝子群は、Foxp3-null Treg (Foxp3 を発現しない Treg 様細胞)でも Treg 同様に発現が亢進していた。即ち、TSDR を持つ遺伝子群の発現上昇は、Foxp3 非依存的であると考えられた。

次に Foxp3 の結合領域 (Foxp3 BS)について検討したところ、Foxp3 BS は、Treg、Tconv に共通に発現する遺伝子の遺伝子内部およびプロモーター領域に認められた。興味深いことに、Foxp3 BS は Treg-Tconv 間でクロマチン状態に差の認められない領域に集中しており、TSDR との共通領域は 1 カ所のみであった。この結果は、Foxp3 依存的転写調節が、TSDR とは独立した機能を持つ可能性を意味する。また Foxp3 BS に関連した遺伝子は、TCR 刺激後に転写が抑制される傾向がみられた。即ち、Treg 特異的な DNA 脱メチル化領域は、TCR 刺激に関係なく Treg で優位に発現している遺伝子群と相関が見られる一方、Foxp3 BS は、刺激依存性に Treg で抑制されている遺伝子と相関が見られ、両者にはほとんど重複が認められなかった。

以上の結果により、Treg の遺伝子発現は Foxp3 依存的な転写制御と、エピゲノムに関連した Foxp3 非依存的な制御で構成されることが明らかとなった。この結果は、機能的に安定な Treg を作製し、慢性炎症の新しい制御法を開発する上で重要である。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

論文詳細情報 (国際)

1. Morikawa H, Ohkura N, Vandenbon A, Itoh M, Nago-Sato S, Kawaji H, Lassmann T, Carninci P, Hayashizaki Y, Forrest A, Standley D, Date D, Sakaguchi S, and the FANTOM consortium Differential roles of epigenetic changes and Foxp3 expression in regulatory T cell-specific transcriptional regulation. PNAS. 2014 Apr 8;111(14):5289-94.(DOI: 10.1073)
2. Sugiyama D, Nishikawa H, Maeda Y, Nishioka M, Tanemura A, Katayama I, Ezoe S, Kanakura Y, Sato E, Fukumori Y, Karbach J, Jäger E, and Sakaguchi S. Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3+CD4+ regulatory T cells, evoking anti-tumor immune responses in humans. PNAS. 2013 Oct 29;110(44):17945-50. (DOI:10.1073)
3. Iyer SS, Latner DR, Zilliox MJ, McCausland M, Akondy RS, Macmaster-Penalzoza P, Hale JS, Ye L, Mohammed AU, Yamaguchi T, Sakaguchi S, Amara RR, Ahmed R. Identification of novel markers for mouse CD4+ T follicular helper cells. Eur J Immunol. 2013 Dec;43(12):3219-32. (DOI: 10.1002)
4. Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, Fukuda S, Saito T, Narushima S, Hase K, Kim S, Fritz JV, Wilmes P, Ueha S, Matsushima K, Ohno H, Olle B, Sakaguchi S, Taniguchi T, Morita H, Hattori M, Honda K. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. Nature. 2013 Aug 8;500(7461):232-6. (DOI: 10.1038/nature12331.)
5. Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S. Development and Maintenance of Regulatory T cells. Immunity. 38:414-423, 2013.(DOI:10.1016)
6. Htun Oo Y, and Sakaguchi S. Regulatory T cell directed therapy in liver diseases. J. Hepatol. J Hepatol. 2013 Nov;59(5):1127-34. (DOI: 10.1016)
7. Yamaguchi T, Kishi A, Osaki M, Morikawa H, Prieto-Martin P, Wing K, Saito T, and Sakaguchi S. Construction of self-recognizing regulatory T cells from conventional T cells by controlling CTLA-4 and IL-2 expression. PNAS, 110(23):E2116-2125, 2013. (DOI:10.1073)

8. Kitagawa Y, Ohkura N, Sakaguchi S. Molecular determinants of regulatory T cell development: the essential roles of epigenetic changes. *Front Immunol.* 2013 May 10;4:106. (DOI: 10.3389/fimmu.2013.00106.)

9. 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. (DOI:10.1038)

10. 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.* 65(6):1487-1493, 2013. (DOI: 10.1002)

11. 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.* 43:989-1000, 2013. (DOI: 10.1002)