

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 制御性T細胞による新しい免疫制御法の開発

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名

研究代表者： 坂口 志文（京都大学再生医科学研究所 教授）

3. 研究内容及び成果：

<研究の背景>

制御性 T 細胞 (Regulatory T cells, 以下 Treg と略) は、ヒトを含め哺乳動物の正常個体中に存在し、免疫応答に対する“負”の制御を司る。その異常は、正常自己組織に対する異常免疫応答としての自己免疫病 (例えば I 型糖尿病、甲状腺炎)、過剰免疫反応としてのアレルギー、炎症性腸疾患など様々な免疫病の原因となる。一方、Treg の操作により、このような免疫病の治療・予防が可能である。さらに、Treg 数の減少、機能減弱化を図れば、癌細胞に対する免疫応答を惹起、強化でき、逆に、Treg 数の増加、機能強化により、移植臓器に対する拒絶反応を抑制すれば、安定な移植免疫寛容を導入できる。即ち、免疫系に生理的に備わった免疫制御機構である Treg を標的として、病的および生理的な免疫応答制御が可能である。本研究の狙いは、Treg による免疫システム制御という新たな概念に基づき、アレルギー・自己免疫疾患、難治感染症、悪性腫瘍の治療と予防、また移植免疫寛容の誘導など、新たな免疫治療法の基礎を確立しようとするところにある。

<研究成果>

1) Treg の発生・機能における Foxp3 の役割

CD25+CD4+Treg の発生・分化に Foxp3 遺伝子が必須であることを見出した。Foxp3 遺伝子は転写因子をコードしており、ヒトの遺伝性免疫疾患 IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome) の原因遺伝子である。Foxp3 は、胸腺、末梢の CD25+CD4+Treg に特異的に発現しているだけでなく、通常 T 細胞に Foxp3 を強制発現させると、機能的にも表現型でも Treg 様に転換でき、そのようにして作製した Treg は生体内で自己免疫性炎症を抑制できた (Hori et al., *Science*, 2003)。即ち、Foxp3 は、Treg の発生・機能のマスター制御遺伝子である。ヒト FOXP3 遺伝子は、ヒト Treg にも特異的に発現しており、ヒト T 細胞に FOXP3 遺伝子を強制発現させ機能的に Treg 様に転換できる (Yagi et al., *Int. Immunol.*, 2004)。この結果は、Foxp3 遺伝子操作によるヒト自己免疫病、炎症性疾患の治療が可能であることを意味する。

Treg の発生、機能を解明すべく、Foxp3 が制御する遺伝子群をマイクロアレイ法により網羅的に探索したところ、Gpr83、Helios など、制御性 T 細胞に特異的に発現しかつ創薬の標的となりうる興味深い分子を同定し、そのような分子に対する単クローン抗体の作製を試みている (Sugimoto et al., *Int. Immunol.*, 2006)。さらに、Yeast-two-hybrid 法を用いて、Foxp3 に結合する分子を探索し、転写因子 AML1/Runx1 が Foxp3 に特異的に会合することを見出した (Ono et al., *Nature*, 2007)。AML1/Runx1 は、通常の T 細胞では IL-2、IFN- γ などのサイトカイン遺伝子の発現を亢進させるが、Treg では Foxp3 と結合することによってサイトカイン産生を抑制するのみならず抑制能の発現に働く。さらにこの分子会合に介入し、Treg 機能を制御できる可能性を示した。

Foxp3 が直接に結合する遺伝子群は 100-200 個と考えられるが、その中で Treg 機能に重要な分子として IL-2 と CTLA-4 (下記) の解析を進めた。即ち、正常マウスで、抗 IL-2 抗体の投与により、IL-2 を一定期間中

和すれば、Treg が減少し、Treg 除去によって誘導されるのと同様の自己免疫病を誘導できた (Setoguchi et al., *J. Exp. Med.*, 2005)。この結果は、CD25 (IL-2R α 鎖)分子は、Treg の単なる分子マーカーではなく、Treg 機能に不可欠であり、IL-2 は末梢での Treg の生存に必須のサイトカインであることを意味する。

2) Treg 機能の分子機構

Foxp3 の発現によって正常T細胞を Treg 機能を有するT細胞に転換できる。Foxp3 がどのような遺伝子の発現を制御し抑制活性を発揮するかについて解析を進めた。Foxp3 promoter 制御下に Cre 蛋白を発現させるノックインマウス、CTLA-4 遺伝子に loxP 部位を挿入したノックインマウスを作製し、これらのマウスを掛け合わせ、Treg 特異的に CTLA-4 を欠損させた条件的ノックアウトマウスを作製したところ、マウスは致死的自己免疫病、アレルギーを発症した (Wing et al., *Science*, 2008)。その Treg 抑制活性も大幅に失われていた。このようなマウスでは腫瘍免疫も亢進しており、大部分のマウスは自家腫瘍を拒絶した。制御性T細胞における CTLA-4 の役割を解析し、その重要な機能として、CTLA-4 と抗原提示細胞上の CD80/CD86 分子との相互作用の結果、CD80/CD86 分子の発現が抑制され、その結果、他のT細胞の活性化が阻害されるとの結果を得た。(Fehervari et al., *Int. Immunol.* 2004, Onishi et al., *PNAS* 2008)。

3) Treg の分子操作による免疫応答制御

CTLA-4 分子を含めて、Treg に発現する分子の操作により免疫応答の抑制あるいは亢進が可能である。例えば、Treg 特異的に発現する分子群に対する単クローン抗体を作製したところ、そのひとつは、4型葉酸受容体 (FR4) を認識していた。さらに、FR4 と葉酸の結合を阻害する単クローン抗体をマウスに投与したところ、活性化 Treg を減少させ、その結果、強力な腫瘍免疫を惹起できた (Yamaguchi et al., *Immunity*, 2007)。また、FR4 を強発現するT細胞を調整し、増やすことで移植臓器に対する免疫寛容を誘導できた。即ち、FR4 は、Treg の特異的マーカーとなるだけでなく、Treg を標的とした創薬につながると期待できる。Treg は GITR (glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene/protein) を高発現する (Ono et al., *J. Immunol.*, 2006)。抗 FR4 抗体と同じく、抗 GITR あるいは抗 GITR および抗 CTLA-4 抗体の全身的制御、腫瘍内への局所投与で Treg による抑制を解除し、強い腫瘍免疫を惹起できることを示した (Ko et al., *J. Exp. Med.* 2006, 他)。さらに、臓器移植についても、Treg を試験管内アロ抗原特異的増殖により増殖させ宿主に戻すことにより移植免疫寛容を誘導できた (Nishimura et al., *Int. Immunol.* 2004, 他)。

<今後の展望>

Foxp3⁺Treg はあらゆる免疫応答の“負”の制御に関与している。今後、その発生・機能の分子、細胞レベルの研究をさらに進め、ヒトの病的、生理的免疫応答制御への応用を図りたい。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

制御性T細胞の発見とそれに続く機能の分子機構の解明に関する研究は、最近の10年間の免疫研究の中で、最も注目された重要な研究であり、世界をリードしており、優れた成果を出し続けており、高く評価できる。制御性T細胞で特異的に発現する転写因子 Foxp3 は、Runx1/AML1 と結合し、他の遺伝子の発現を制御していることを示した。また、CTLA-4 分子は制御性T細胞機能に必須の分子であり、これを標的として自己免疫疾患、アレルギー、癌の免疫療法が可能であることを示した。

これらの研究成果は、論文(国際誌100編)、口頭発表(国内135回、国際会議80回)、特許(国内4件、海外1件)として発表している。Nature、Science、Cell、Nature Immunologyなどの学術誌に発表され、国際的に高い評価を得ている。

下記はその中の特筆すべきものである。

- (1) 制御性T細胞に特異的に発現する転写因子Foxp3は、別の転写因子Runx1/AML1と結合し、他の遺伝子の発現を制御していることを示した。Foxp3分子と他の分子との相互作用を標的とした免疫応答抑制が可能であることを示した。
- (2) 制御性T細胞は、抗原存在下、樹状細胞上に凝集し、他のT細胞の活性化を物理的に阻害する。この反応はLFA-1依存的である。さらに、制御性T細胞は、樹状細胞上の副刺激分子CD80、CD86の選択的発現阻止、また発現しているCD80、CD86分子の選択的発現低下を誘導する。この反応はCTLA-4依存性である。分子レベル、細胞レベルで操作し免疫応答の抑制的制御が可能であることを示した。
- (3) 制御性T細胞特異的にCTLA-4を欠損するマウスを作製し、この欠損マウスは、致死的自己免疫/炎症性疾患を自然発症し、癌細胞に対して強い免疫応答を示した。CTLA-4は、制御性T細胞機能に必須の分子であり、これを標的として、自己免疫疾患、アレルギー、癌の免疫療法が可能であることを示した。

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

免疫システムの新しい機能の解明で、臨床応用への道を拓くという点で大きな成果をあげた。今後制御性T細胞の機能分子を標的とした治療法の開発を期待したい。

Foxp3⁺Treg の量的、質的異常は、様々な自己免疫病、アレルギー、炎症性腸疾患など様々な免疫疾患の原因となる。その量的、質的評価は、免疫疾患の発症機構の理解、疾患の診断・治療に重要であり、そのための技術開発が重要である。

Foxp3⁺Treg は、あらゆる免疫応答の“負”の制御に関与している。従って、これを標的として、生理的、病的免疫応答の制御が可能である。Foxp3⁺Treg の数的減少、抑制能弱化による腫瘍免疫応答の惹起、逆に、抗原特異的 Foxp3⁺Treg の増殖、抑制能強化による移植免疫寛容の誘導は、今後臨床応用として重要である。

Foxp3, IL-2/CD25, CTLA-4 は、制御性T細胞に発現する機能分子として重要であり、その操作によって制御性T細胞の抑制機能、増殖、生存を制御できる。これらの分子、また、制御性T細胞に発現する他の分子を標的として、新しい免疫制御薬剤(小分子あるいは単クローン抗体など)の開発が期待される。

4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

本研究の成果に対し、研究代表者は、2003年11月に持田記念学術賞、2004年6月にCancer Research Institute's 2004 William B. Coley Award、2005年11月に武田医学賞、2005年11月に高峰記念三共賞、2007年4月に文部科学大臣表彰科学技術賞、2008年3月に上原賞、2008年11月に慶応医学賞を受賞した。

以上