

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業 ユニットタイプ
「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」研究開発領域
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation
(AMED-CREST) “Creation of Basic Medical Technologies to Clarify and
Control the Mechanisms Underlying Chronic Inflammation” research area
- 研究開発課題名： (日本語) 制御性 T 細胞による慢性炎症制御技術の開発
(英語) Control of chronic inflammation by regulatory T cells
- 研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人大阪大学免疫学フロンティア研究センター
特任教授 坂口志文
- 所属 役職 氏名： (英語) Immunology Frontier Research Center, Osaka University,
Specially Appointed Professor, Shimon Sakaguchi
- 実施期間： 平成 28年 4月 1日 ～ 平成 29年 3月 31日

II. 成果の概要（総括研究報告）

- ・ 研究開発代表者による報告の場合
- ・ 研究開発分担者による報告の場合

制御性T細胞（Regulatory T cell、以下 Treg と略）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。本研究では、Treg 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している。特に、自己免疫病、臓器移植、アレルギー等における 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、アレルギーの抑制を目的とした。

Treg 分化誘導には転写因子 Foxp3 のみでなく Treg 特異的エピゲノムの成立が必要であることを明らかにしてきた。本年度は、Treg 発生・分化の鍵となる Treg 特異的エピゲノムの成立を発生分化の時系列に基づいて詳細に解析し、Treg 分化に必須のエピゲノム変化を特定し、本過程成立に必要な因子としてゲノムオーガナイザー Satb1 を同定した。Satb1 遺伝子を CD4⁺ T 細胞特異的に欠損したマウスの全ゲノム DNA メチル化パターン解析、RNA 発現解析、各種ヒストン修飾パターン解析、オープンクロマチン解析等をおこない、Satb1 に依存したエピゲノム変化を特定した。これらの結果から、Satb1 欠損は Treg 特異的なヒストン修飾パターンの低下、オープンクロマチン状態の減少、スーパーエンハンサーの不完全な成立およびスーパーエンハンサーの支配下にある遺伝子群の発現低下、さらには前駆細胞段階での Treg 分化誘導の停止を引き起こし、結果として胸腺由来 Treg 細胞の欠損による重篤な自己免疫疾患が発症することを明らかにした。この結果は、Treg 分化誘導には転写因子 Foxp3 の誘導のみならず、Treg 特異的エピゲノムの成立が必須であり、本過程の障害、機能喪失はヒトにおいても自己免疫疾患の発症原因となる可能性を示す。さらに、この結果は、Treg 分化・機能維持および炎症病態制御の理解を進め、Treg 機能の維持、人工的 Treg 誘導、抗原特異的 Treg 細胞の誘導による新たな炎症性疾患治療法の開発に寄与すると考える。

Regulatory T (Treg) cells are specialized for suppressing excessive or aberrant immune responses and they are indispensable for the maintenance of immunological self-tolerance and homeostasis. Treg cells express a specific transcription factor Foxp3 and its mutation, as seen in human IPEX syndrome, elicits severe autoimmune diseases, colitis and allergy. The aim of the intended research is to elucidate the molecular and cellular basis of Treg-mediated suppression on chronic inflammation, and to extend the knowledge for establishing methods and strategies to regulate chronic inflammatory diseases by controlling Treg cells. For this aim, we have been focusing our efforts to understand the role of Treg cells in autoimmune diseases, organ transplantation, and allergy to apply the findings to augment Treg suppressive functions to control pathological immune responses.

Foxp3 has been assumed to be a Treg lineage specification factor. However, we have recently shown that the development of Tregs and the maintenance of their functional stability not only require the expression of Foxp3 but also the establishment of Treg-type DNA hypomethylation pattern in Treg function-associated genes, such as Foxp3, CTLA-4, GITR, and Eos. Furthermore, the installation of the Treg-specific epigenetic pattern is independent of Foxp3 expression. Based on these findings, we have extensively analyzed the kinetics of establishing Treg-specific epigenetic pattern from their early to late stages of Treg cell lineage specification to determine essential epigenetic changes and molecules required for this process. From these analyses, we found that Treg cells possess specific super-enhancers associated with Treg signature genes, which are gradually established and activated in early stages of thymic Treg cell development. Furthermore, we identified Satb1, a genome organizer, is required for the establishment of Treg-specific super enhancers and Treg lineage specification. Our whole-genome study on CD4-Cre Satb1 conditional knock out mice by DNA-methylation analysis, various histone-modification analyses, open-chromatin analysis, and RNA-seq analysis have revealed Satb1-dependent epigenetic changes during Treg cell development. From these results, the deficiency in Satb1 reduces Treg-specific epigenetic changes including histone modifications, open-chromatin state, establishments of super enhancers as well as expression levels of genes controlled by these super enhancers. These reductions in Satb1 conditional knock out mice resulted in a terminated development of Treg cells at the precursor stage and induced severe autoimmune diseases due to a lack of thymus derived Treg cells. Our findings demonstrate that Treg cell lineage specification and development require the establishment of Treg-specific epigenetic pattern in addition to the induction of Foxp3. These findings have important implications for innovative strategies using Treg cells to treat and prevent chronic inflammation associated with immunological diseases, for example, by installing Treg-specific epigenome, together with Foxp3 expression, to antigen-specific T conventional cells for the induction of functional and stable Treg cells.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 5 件）

1. Kitagawa Y, Ohkura N, Kidani Y, Vandebon A, Hirota K, Kawakami R, Yasuda K, Motooka D, Nakamura S, Kondo M, Taniuchi I, Kohwi-Shigematsu T, Sakaguchi S. Guidance of regulatory T cell development by Satb1-dependent super-enhancer establishment. *Nat. Immunol.* 18:173-183, 2017.
2. Saito T, Nishikawa H, Wada H, Nagano Y, Sugiyama D, Atarashi K, Maeda Y, Hamaguchi M, Ohkura N, Sato E, Nagase H, Nishimura J, Yamamoto H, Takiguchi S, Tanoue T, Suda W, Morita H, Hattori M, Honda K, Mori M, Doki Y, Sakaguchi S. Two FOXP3⁺CD4⁺ T-cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. *Nature Med.* 22: 679-684, 2016.
3. Okubo K, Wada H, Tanaka A, Eguchi H, Hamaguchi M, Tomokuni A, Tomimaru Y, Asaoka T, Hama N, Kawamoto K, Kobayashi S, Marubashi S, Nagano H, Sakaguchi N, Nishikawa H, Doki Y, Mori M, Sakaguchi S. Identification of Novel and Noninvasive Biomarkers of Acute Cellular Rejection After Liver Transplantation by Protein Microarray. *Transplant Direct.* 2016 Nov 18;2(12):e118.
4. Vandebon A, Dinh VH, Mikami N, Kitagawa Y, Teraguchi S, Ohkura N, Sakaguchi S. Immuno-Navigator: a co-expression database for cell type-specific network inference in the immune system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 113(17):E2393-402, 2016.
5. Klocke K, Sakaguchi S, Holmdahl R, Wing K. Induction of autoimmune disease by deletion of CTLA-4 in mice in adulthood. *Proc Natl Acad Sci USA.* 113(17):E2383-92, 2016.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 廣田圭司、伊藤能永、近藤玄、田中淳、坂口教子、坂口志文 : SKG マウスの関節炎に関わる ILCs サブセット Kyoto T Cell Conference (2016.5.20-21.京都), 口頭
2. 田中淳、西川博嘉、野口晋佐、高橋直人、坂口教子、坂口志文 : Selective control of regulatory T cells through TCR signaling molecule. Kyoto T Cell Conference (2016.5.20-21.京都), 口頭
3. Atsushi Tanaka, Shimon Sakaguchi Selective control of regulatory T cells through TCR signaling molecule. 16th International Congress of Immunology (2016. 8. 21-26. Melbourne, Australia), 口頭
4. Keiji Hirota, Shimon Sakaguchi : Inflammatory circuit of Th17 cells, fibroblast-like synoviocytes, and ILCs in the development of autoimmune arthritis. 16th International Congress of Immunology (2016. 8. 21-26. Melbourne, Australia), 口頭
5. Yohko Kitagawa, Naganari Ohkura, Yujiro Kidani, Shimon Sakaguchi : Epigenetic control of regulatory T cell identity and its assortment with autoimmune diseases in human. 第45回日本免疫学会総会・学術集会 (2016. 12. 5-7. 沖縄), 口頭
6. James Badger Wing, Hannah Hume, Michela Locci, Yohko Kitagawa, Christopher Tay, Kyoko Matsuda, Takeshi Inoue, Tomohiro Kurosaki, Shane Crotty, Cevayir Coban, Naganari Ohkura, Shimon Sakaguchi : A distinct subset of CD25 negative T-follicular regulatory cells localizes in the germinal centers 第45回日本免疫学会総会・学術集会 (2016. 12. 5-7. 沖縄), 口頭

7. Motonao Osaki, Shimon Sakaguchi Soluble form of CTLA-4 produced by regulatory T cells facilitates M2 macrophage differentiation in auto-inflammatory condition. 第45回日本免疫学会総会・学術集会 (2016. 12. 5-7. 沖縄), 口頭
8. Yujiro Kidani, Yohko Kitagawa, Naganari Ohkura, Shimon Sakaguchi Specific transcriptional regulation of tumor infiltrating regulatory T cells. 第45回日本免疫学会総会・学術集会 (2016. 12. 5-7. 沖縄), 口頭
9. Murat Tekguc, James Badger Wing, Motonao Osaki, Shimon Sakaguchi : Role of CTLA-4 in controlling expression of costimulatory molecules by antigen-presenting cells. 第45回日本免疫学会総会・学術集会 (2016. 12. 5-7. 沖縄), ポスター
10. Daniel Y. Hu, Stephen R. Daley, Christopher C. Goodnow, Naganari Ohkura, Shimon Sakaguchi : Regulatory T cell precursors develop from negative selected CCR7⁺ Helios⁺ medullary thymocytes. 第45回日本免疫学会総会・学術集会 (2016. 12. 5-7. 沖縄), 口頭

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. Shimon Sakaguchi: Targeting Regulatory T Cells for Controlling Immune Responses. Transplantation Science Symposium(TSS) Asian Regional Meeting : Keynote Lecture (2016. 4. 8-9. Tokyo), 口頭
2. 坂口志文: 免疫制御とがん治療 第116回日本外科学会定期学術集会 (2016.4.14-16. 大阪), 口頭
3. Shimon Sakaguchi: Targeting Regulatory T Cells for Controlling Immune Responses. II Seville Molecular Medicine Workshop: Cell Therapy, Molecular Mechanisms and Clinical Translation (2016. 5. 9-10. Seville Spain), 口頭
4. Shimon Sakaguchi: Targeting Regulatory T Cells for Cancer Immunotherapy. The Distinguished Ludwig Lecturer Series in Cancer Research (2016. 5. 12. Lausanne, Switzerland), 口頭
5. 坂口志文: 制御性 T 細胞による免疫応答制御 第37回日本炎症・再生医学会 (2016.6.16-17. 京都), 口頭
6. 坂口志文: 制御性 T 細胞と癌免疫 第10回横断的腫瘍フォーラム (2016.6.28. 大阪), 口頭
7. 坂口志文: 免疫制御とがん治療 第4回がんと代謝研究会 (2016.7.7-8. 鹿児島), 口頭
8. 坂口志文: 制御性 T 細胞の発生と機能 第18回免疫サマースクール 2016 (2016. 7. 11-7.14 北海道), 口頭
9. 坂口志文: Control of Immune Responses by Regulatory T cells. Bone Biology Forum (2016.8.19-20. 幕張), 口頭
10. Shimon Sakaguchi : Transcriptional and epigenetic basis of Treg cell development and function. 16th International Congress of Immunology (2016. 8. 21-26. Melbourne, Australia), 口頭
11. Shimon Sakaguchi : Targeting regulatory T cells for controlling immune responses. 16th International Congress of Immunology (2016. 8. 21-26. Melbourne, Australia), 口頭

12. 坂口志文: 制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 31 回日本乾癬学会 (2016.9.2-3. 宇都宮), 口頭
13. Shimon Sakaguchi: Targeting Regulatory T Cells for Cancer Immunotherapy. From the Laboratory to the Clinic: Getting closer to a Cure? (2016. 9. 7-9. Oxford, England), 口頭
14. Shimon Sakaguchi: Targeting regulatory T cells for cancer immunotherapy. The 2016 International Cancer Immunotherapy Conference: Translating Science into Survival (2016. 9. 25-28. New York, U.S.A.), 口頭
15. Shimon Sakaguchi : Transcriptional and epigenetic basis of Treg cell development. 46th Annual Meeting of the German Society for Immunology (2016. 9. 27-30. Hamburg, Germany), 口頭
16. Shimon Sakaguchi : Control of immune responses by regulatory T cells. Cold Spring Harbor Asia (2016. 10. 3-6. 淡路島), 口頭
17. 坂口志文: 制御性 T 細胞を標的とした癌免疫療法 第 75 回日本癌学会学術総会 (2016.10.6-8. 横浜), 口頭
18. 坂口志文: 制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 53 回日本小児アレルギー学会 (2016.10.8-9. 前橋), 口頭
19. Shimon Sakaguchi : Control of immune responses by regulatory T cells. The 13th International Workshop on Autoantibodies and Autoimmunity (2016. 10. 11-13. 京都), 口頭
20. Shimon Sakaguchi : Control of immune responses by regulatory T cells. The 23th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (2016. 10. 11-15. 京都), 口頭
21. 坂口志文 : 制御性 T 細胞による免疫応答制御 日本リウマチ学会第 3 回ベーシックリサーチカンファレンス (2016.10.14-15. 東京), 口頭
22. 坂口志文 : 制御性 T 細胞を標的とした癌免疫療法の可能性 第 16 回別府癌治療懇話会 (2016.10.17. 別府), 口頭
23. 坂口志文: 制御性 T 細胞とがん免疫療法 レギュラトリーサイエンス エキスパート研修会 がん治療の新たな選択肢 (2016.10.18. 東京), 口頭
24. Shimon Sakaguchi : Control of immune responses by regulatory T cells. International Symposium on Advanced Immunology (2016. 11. 1-2. 大阪), 口頭
25. 坂口志文 : 制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 46 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会 (2016.11.5-6. 東京), 口頭
26. Shimon Sakaguchi: Targeting Regulatory T Cells for Cancer Immunotherapy. Frontiers in Cancer Science 2016 (2016. 11. 7-9. Singapore), 口頭
27. 坂口志文: 制御性 T 細胞による免疫疾患の制御に向けて 富山大学医学部創立 40 周年記念講演会 (2016.11.25. 富山), 口頭
28. 坂口志文 : 制御性 T 細胞による免疫応答制御 大阪大学産婦人科学講座セミナー(2016.11.28. 大阪), 口頭
29. 坂口志文 : Transcriptional and epigenetic basis of regulatory T cell development. 第 39 回日本分子生物学会年会 (2016. 11. 30-12.2. 横浜), 口頭

30. 坂口志文: Tolerance and Immune Regulation. 第45回日本免疫学会総会・学術集会(2016. 12. 5-7. 沖縄), 口頭
31. 坂口志文: 免疫を制御する細胞とは? - 自己と非自己の免疫学 WPI 10周年記念講演会 (2016.12.17. 東京), 口頭

(4) 特許出願
該当なし