

[ 別紙 1 ]

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

獣 医 学 専 攻

平成9年度博士課程 入学

氏 名 日柳章彦

指導教官名 林 良博

論文題目 経口トレランスにおける免疫担当細胞での  
TGF- $\beta$ スーパーファミリーの発現

TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ )は、生体内では、主に増殖抑制作用を示し、発生・分化・免疫系などにおいて多彩な生理作用を有することが明らかとなっている。TGF- $\beta$ 1ノックアウトマウスは、出生後2-3週間以内に、免疫調節異常を呈し、激しい炎症反応による多臓器不全で死亡することが報告されており、TGF- $\beta$ 1は炎症抑制に本質的な役割を担っていることが判明している。また、経口投与された抗原特異的な免疫抑制状態を引き起こす「経口トレランス」においても、TGF- $\beta$ 1の関与が示唆されており、抗原を経口投与することにより、TGF- $\beta$ 1産生性のT細胞を誘導し、抗原特異的免疫抑制が誘導されることが考えられている。また、TGF- $\beta$ の属するTGF- $\beta$ スーパーファミリーには、Activin, BMP(bone morphogenetic protein)2-4-7, nodal, leftyなど、個体発生に関与する様々な重要因子が含まれており、これらの因子は、一部TGF- $\beta$ とレセプターを共有し、レセプターから核までのシグナル伝達因子であるSmad2,3/4を共有していることが知られている。そのため、Activin

や BMP においても TGF- $\beta$  と類似した細胞機能、その後の細胞応答が想定される。現在まで、*in vivo* で免疫担当細胞における TGF- $\beta$  を中心とする TGF- $\beta$  スーパーファミリーの働きを検討した研究は皆無に等しく、免疫系における TGF- $\beta$  スーパーファミリーの機能は明らかとなっていない。そこで、本研究は、免疫系における TGF- $\beta$  スーパーファミリーの役割を明確にすることを目的とし、まず、第 1 章において、TGF- $\beta$ 1-2-3、BMP-2-4-7、それぞれに対応するレセプターとしては T $\beta$ R-I (ALK5) と T $\beta$ R-II、BMPR-IA (ALK3), BMPR-IA(ALK-6), ActR-IA(ALK2) と ActR-II, ActR-IIB、そして結合タンパクとしては、follistatin、Noggin、Chordin など、現在明らかとなっている主要な TGF- $\beta$  関連遺伝子について、免疫担当細胞での mRNA 発現を RT-PCR 法により確認した。その結果、マウス脾臓由来の B 細胞、T 細胞において BMP-2/-7、レセプターの BMPR-IA (ALK3), ActR-IA (ALK2) と ActR-II, ActR-IIB、そして結合タンパクとしては、follistatin、Noggin、Chordin の発現が確認された。現在までに、BMP の免疫担当細胞における機能は知られておらず、骨形成や腹側中胚葉誘導、神経管の負の制御、アポトーシスなどの多彩な機能をもつ BMP の新たな機能の存在が示唆された。

現在まで、*in vivo* におけるリンパ球の TGF- $\beta$  やレセプターの定量実験は皆無に等しく、また、多種類の遺伝子の発現量を定量的に解析することは困難であり、免疫系細胞において、本研究のような関連遺伝子のカタログ化は、大変な労力が必要だと考えられている。しかし、定量的 RT-PCR 法を用いることにより、同一サンプルにおいて大量の mRNA 定量解析が可能と考えられたことから、第 2 章、第 3 章で同手法を試みた。

第 2 章では、免疫系が活性化を受けた状態、つまり卵白由来のタンパクであるオボアルブミン (OVA) による抗原刺激を受けた状態で、各リンパ球サブセットに発現する TGF- $\beta$ 1 および BMP-2/-7、そのレセプターおよび結合タンパクの mRNA 量の変化を、定量的 RT-PCR 法を用いて、定量解析を行った。

リガンドである TGF- $\beta$ 1 には OVA 免疫による変化は認められなかったが、TGF- $\beta$  receptor (I 型および II 型ともに) の mRNA レベルの減少が確認された。TGF- $\beta$ 1 のリンパ球における主な機能は、炎症性 T 細胞 (Th1) の抑制である。この結果が何を意味するか、非常に興味深い。また、BMP の結果では、主に CD4<sup>+</sup>T 細胞に BMPs、BMP レセプターおよび BMP 結合タンパクの強い発現が確認され、B 細胞では微弱な発現であり、CD8<sup>+</sup>T 細胞においては、検出限界以下であった。さて注目すべき事に、OVA 免疫により明らかに BMP-2/-7 mRNA の発現量が増加しており、特に BMP-2 の増加は著しいものであった。そして BMP レセプターである ALK-2 と ActR-IIb も OVA 免疫により、著しい mRNA 発現量の増加が認められた。また BMP の結合タンパクである follistatin と Chordin の mRNA 発現は OVA 免疫によりわずかな減少傾向が確認された。このことから、BMP-2/-7、特に BMP-2 がリンパ球の免疫応答時の CD4<sup>+</sup>T 細胞活性化に関与している可能性が示唆された。

第 3 章では、主に TGF- $\beta$ 1 の抗原特異的免疫抑制機能に着目し、アレルギーや自己免疫疾患の画期的治療法として、日米で臨床応用され注目を集めている経口トレランスの実験系を用い、TGF- $\beta$ 1 の免疫抑制機能を、リガンド、レセプターの mRNA レベルを定量的 RT-PCR 法を用いることにより解析した。in vitro の実験系では、経口トレランス誘導時には、TGF- $\beta$ 1 量が増加するとの報告があるが、in vivo での実験では、そのような結果は今まで報告されていない。今回、我々の結果では、従来の結果同様リガンドである TGF- $\beta$ 1 の mRNA 発現量に変化は確認されなかったが、特に CD4<sup>+</sup>T 細胞において TGF- $\beta$  の I 型および II 型レセプターの発現に増加傾向が見られた。これは、TGF- $\beta$ 1 の免疫抑制機能のコントロールを、レセプターが調節している可能性が考えられる非常に興味深い結果であり、経口トレランス誘導の主体が CD4<sup>+</sup>T 細胞であるとの報告に一致している。続いて、この経口トレランスの系で本当に TGF- $\beta$ 1 が免疫抑制に働いているかを調べるために、経口トレランス群から得

られたCD4<sup>+</sup>T細胞をTGF-β1の存在/非存在下で培養し、BrdU-ELISAにより、CD4<sup>+</sup>T細胞の増殖を検討した。その結果、明らかに経口トレランスの系で、TGF-β1の増殖抑制が証明された。

以上のように、本研究は、カタログ化により、TGF-βスーパーファミリーの免疫機能を明確にただけではなく、「経口トレランス」を利用した抗原特異的免疫抑制の応用に重要な基礎的知見を与えた。今後、さらにTGF-βやBMPのシグナル伝達の研究を進め、BMPの免疫系に対する機能解析や、TGF-βレセプターの免疫機能調節の明らかな証拠を提供できればと考えている。