

論文の内容の要旨

論文題目 反復刺激による CD4 陽性 T 細胞低反応性の解析
～末梢性 T 細胞免疫寛容の一機構として～

指導教官 山本 一彦 教授

東京大学医学系研究科

平成12年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 島田浩太

自己反応性 T 細胞は健常個体の末梢血中においても検出されるが、自己免疫寛容の破綻によると考えられている自己免疫疾患の発症頻度ははるかに低いものであり、生体には末梢性免疫寛容の誘導・維持機構が存在する必要がある。また、自己反応性ナイーブ T 細胞は、交叉反応性外来抗原や隔絶自己抗原への曝露といった機構によりプライミングされ、エフェクター／メモリー T 細胞に分化しうると考えられる。一方、持続した発現は自己抗原の特徴のひとつであり、このために自己反応性を有する CD4 陽性 T 細胞は末梢において対応自己抗原に反復して曝露されていると考えられる。また、末梢性免疫寛容の維持に当該自己抗原が持続して存在することが必要とする報告がこれまでになされている。

T 細胞低反応性誘導機構としては、「古典的アナジー」、すなわち、共刺激を欠く条

件で T 細胞受容体を刺激された際に観察される低反応性が広く知られている。しかし、CD4 陽性 T 細胞については、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) class II 分子と対応抗原との複合体を認識するその性質と、MHC classII の発現は professional APC に特徴的であることを考え合わせると、共刺激の量の多少はあっても、共刺激を欠く古典的アナジー機序による免疫寛容の誘導が、生体内での末梢性免疫寛容の主たる機構であるとは考えにくい。

以上を踏まえ、本研究では、持続的に発現する自己抗原により Antigen-experienced CD4⁺ T cells (抗原曝露歴のある CD4 陽性 T 細胞) に対してもたらされる末梢性免疫寛容の *in vitro* モデルとして、共刺激を伴う前刺激ののちに連続して再刺激を加える連続刺激法を用いた。具体的には、まず、ニワトリ卵白アルブミンペプチド (アミノ酸 323 ~339: OVA₃₂₃₋₃₃₉) 特異的 T 細胞受容体を発現したトランスジェニックマウス DO 11.10 の脾臓より得られた CD4 陽性 T 細胞を *in vitro* にてプライミングし、antigen-experienced cells とした。これらを、照射同系脾臓細胞および OVA₃₂₃₋₃₃₉ にて 48 時間刺激培養 (前刺激) したのち、さらに再刺激を加えた。

再刺激においては、³H-チミジン取り込み実験における CD4 陽性 T 細胞の増殖反応は低下し、この低下は IL-2 の添加では回復しなかった。アポトーシスおよび細胞死について、Annexin V および propidium iodide を用いてフローサイトメトリーにより解析したが、再刺激群における ³H-チミジン取り込み低下は細胞死の増加では説明されなか

った。T 細胞受容体からのシグナル伝達についてウエスタンブロットを用いて解析を行ったところ、T 細胞受容体近傍の Lck、ZAP-70、LAT については、前刺激の有無による再刺激時の差は明らかでなかったが、Ras および ERK の活性化は再刺激群で遮断されていた。一方、BrdU ELISA 法による細胞周期解析では、再刺激群において S 期のある細胞群が減少しており、ウエスタンブロットを用いたサイクリン発現パターンの解析では再刺激群における G1 期→S 期への移行の障害をともなう細胞周期進行遅延が示唆された。この細胞周期進行遅延には、サイクリン依存性キナーゼインヒビターである p27^{kip1} の蓄積がウエスタンブロットにおいて観察されたが、p27^{kip1} mRNA の転写を阻害する Akt の活性化は前刺激の有無によらずに認められたため、p27^{kip1} の蓄積には、その翻訳と分解のレベルに再刺激が修飾を与えることが示唆された。

S 期にある細胞の減少および p27^{kip1} の蓄積は、前刺激を加えた群に対して再刺激を加えることで観察されていた。T 細胞受容体近傍や Akt にいたるシグナル伝達がなされていることを考え合わせると、連続刺激法で観察された T 細胞低反応性の機構としては、T 細胞受容体複合体自体の脱感作よりもむしろ、再刺激によりもたらされる negative な制御機構の活性化により積極的に低反応が導かれていると想定された。

さらに、移入モデルを用いてこの低反応性を実際に生体内において検討した。プライミング後、*in vitro* で前刺激された DO 11.10 CD4 陽性 T 細胞を、5- (and 6-)carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)により標識したのち、全身性

に OVA を発現するトランスジェニックマウス (Ld-nOVA) に移入し、レシピエントの脾臓から回収した T 細胞のうち DO 11.10 クロノタイプ陽性細胞について CFSE の希釈をフローサイトメトリーにより解析したところ、その *in vivo* での細胞分裂は、非トランスジェニック同腹マウスに移入された群に比べて遅延していた。また、同様にして回収されたクロノタイプ陽性 T 細胞についてのフローサイトメトリー解析では、p27^{kip1} の蓄積と、*in vitro* での刺激に対する ERK 活性化の遮断とが認められた。

本研究では、共刺激の存在下で刺激された antigen-experienced CD4⁺ T cells を、T 細胞受容体を通じて再刺激することによりその低反応性を *in vitro* にて誘導した。この低反応性 CD4 陽性 T 細胞においては、Lck、ZAP-70 といった T 細胞受容体近傍のシグナル分子の活性化に変化が見られないことから、これまで指摘されてきた古典的アナジーとは異なる機構の存在と、再刺激時に積極的に低反応性を誘導するシグナル伝達機構の存在が示唆された。さらに自己抗原発現マウスへの抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞の移入実験においても、レシピエントから回収された細胞の細胞増殖進行遅延、および、*in vitro* にて観察された知見を支持する細胞内イベントが観察された。以上から、末梢自己反応性 CD4 陽性 T 細胞が、生体内で持続して発現している自己抗原に反復して曝露され刺激を受け得ることを考えると、この低反応性が持続発現自己抗原に対する免疫寛容の成立に関与していることが示唆された。