

審査の結果の要旨

氏名 島田浩太

本研究は、持続発現自己抗原により抗原曝露歴を有する 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に連続して再刺激を加える連続刺激法を用いて検討したもので、下記の結果を得ている。

1. 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。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ところ、再刺激群における ³H-チミジン取り込み低下は細胞死では説明されなかった。

2. T 細胞受容体からのシグナル伝達をウエスタンブロットを用いて解析したところ、T 細胞受容体近傍の Lck、ZAP-70、LAT 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。

3. LAT と Ras の間での downregulation が見られたことから、RasGAP の関与を想定し、免疫沈降を施行したところ、前刺激を加えた群では RasGAP と共沈する 62-66kDa のチロシンリン酸化を受ける分子が検出された。一方で 10 サイクル以上培養した細胞株では上記の低反応性に誘導に抵抗性であり、この細胞株では RasGAP と共沈する前述の分子は明らかに減少していた。このため、この分子が上記の低反応性誘導の感受性に関与すると考えられたが、RasGAP との association が知られている既存の分子には一致せず、また、その同定にはいたらなかった。

4. BrdU ELISA 法による細胞周期解析では、再刺激群において S 期細胞が減少しており、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 期への移行の障碍をとまなう細胞周期進行遅延が示唆された。

5. 再刺激群では p27^{kip1} の蓄積がウエスタンブロットにて観察されたが、この 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、p27^{kip1} の翻訳・分解レベルでの修飾が示唆された。また、S 期細胞の減少および p27^{kip1} の蓄積の一

方でT細胞受容体近傍やAktに至るシグナル伝達が保たれていることから、上記低反応性は、T細胞受容体複合体自体の脱感作ではなく再刺激によりもたらされる抑制的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。

6. *in vivo* の検討として、プライミング後 *in vitro* で前刺激された OVA 特異的 CD4 陽性 T 細胞を CFSE 標識し、全身性に OVA を発現するトランスジェニックマウスに移入、レシピエントの脾臓から回収した T 細胞をフローサイトメリーにて解析した。移入細胞では *in vivo* での細胞分裂遅延、p27^{kip1} 蓄積、*in vitro* 刺激に対する ERK 活性化の遮断とが認められ *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、本研究では、共刺激の存在下で刺激された抗原曝露歴を有する CD4 陽性 T 細胞を、T 細胞受容体を通じて連続刺激することによりその低反応性を *in vitro* にて誘導した。この低反応性は従来用いられてきた古典的アナジーモデルに比して、より生理的な *in vitro* モデルである可能性があり、末梢性免疫寛容のより簡便な実験モデルとして期待される。また、この低反応性の感受性に、RasGAP と共沈する分子の関与が示唆された。本研究では同定にはいたらなかったものの、同分子の存在により活性化自己反応性 T 細胞に対する持続発現自己抗原への末梢性免疫寛容誘導が可能になると考えると、自己免疫疾患において破綻した自己免疫寛容を再構築し、また逆に悪性腫瘍や慢性感染症などにおいて失われた、生体防御を目的とした免疫反応を再賦活するなど、この分子を標的とした病態制御を通じてこれらの疾患の新たな治療戦略につながる可能性がある。以上の点で、本研究は臨床免疫学に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。