

[別紙1]

論文の内容の要旨

論文題目 制御性 T 細胞による抗原提示細胞機能抑制機構の解析

指導教官 山本 一彦教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 立石 晶子

免疫応答は、生体を侵襲しようとする様々な微生物や異物を認識し、排除することで生体内の恒常性を保つ反応である。この免疫応答が自己に対して向けられたり、過剰に応答することは、自己免疫疾患やアレルギーなどの疾患を誘発する。このような自己への攻撃のリスクを避けるために、自己に対して通常の免疫反応が起こらない免疫寛容機構が存在する。免疫寛容には、胸腺内での自己反応性未熟 T 細胞の細胞死の誘導 (clonal deletion) や、末梢での自己反応性 T 細胞の不活化といった受動的な寛容がある。最近、これに対して、能動的な寛容として CD25⁺CD4⁺ T 細胞をはじめとする制御性 T 細胞による活性化 T 細胞の抑制が注目されている。

末梢における制御性 T 細胞の存在を示す事実は、正常マウスの CD4⁺ T 細胞の亜集団を特定の細胞表面抗原 (CD5⁺, CD45RB, CD25⁺ など) の発現量により 2 群に分けた一方を一定期間除去すると様々な自己免疫疾患が自然発症するが、CD25⁺CD4⁺ T 細胞を移入すると発症しないという実験により示唆された (J Immunol 1995; 155:1151-64)。これはマウスの末梢には、自己免疫疾患を引き起こす自己反応性 T 細胞が存在すると同時に、それらを抑制的に制御する CD4⁺ T 細胞が存在することを示すものであった。その後 CD25 (interleukin-2: IL-2 受容体 α 鎖) が この細胞群の最も特異的な表面マーカーであり、齧歯類やヒトに生理的に存在することが確認された。この CD25⁺CD4⁺ T 細胞は、胸腺内

で免疫制御活性をもつ機能的に成熟した T 細胞として産生され、末梢の CD4⁺T 細胞の約 5-10%を占めることが分かった。さらにその細胞表面には、T 細胞の活性化マーカーでもある CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4)、GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor family-related gene)を恒常的に発現していると報告された。そして *in vitro* にて CD25⁺CD4⁺T 細胞は、抗原刺激に対して自己の増殖応答を示さず (アナジューな状態)、他の T 細胞と混合するとその活性化反応を強力に抑制することも明らかになった。最近、CD25⁺CD4⁺T 細胞の分化や機能に関わるマスター遺伝子として転写因子 Fox (forkhead box)ファミリーに属する蛋白質である FOXP3 (マウスでは Foxp3) が同定された (Science 2003 ; 299 : 1057-1061)。この Foxp3 遺伝子が他の T 細胞に強制発現されると、機能的な制御性 CD25⁺CD4⁺T 細胞への転換がみられる。重要なことにこの遺伝子が、多臓器に T 細胞の浸潤を認めることで知られていた Scurfy マウスと、ヒトの X 染色体劣性遺伝病で自己免疫病変や炎症性腸疾患などを起こす IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, x-linked syndrome)の共通の疾患原因遺伝子であり、いずれも CD25⁺CD4⁺T 細胞の分化経過が障害されていることがその病因であると報告された。

この CD25⁺CD4⁺T 細胞は、自己免疫疾患、炎症性腸疾患、アレルギーなどの治療に応用可能であるかもしれず、種々の疾患の治療法へとつながると考えられる。その免疫抑制機序の分子メカニズムに関しては、液性因子を介するものか、あるいは直接の細胞接触によるものとの報告がある。現在のところ、活性化された制御性 T 細胞からの培養上清添加で他の T 細胞の抑制を認めないこと、*in vitro* において IL-10 や TGF- β などの抑制性液性因子の中和抗体やノックアウトマウスを用いた実験で制御性 T 細胞の増殖抑制活性が阻害されないことなどから、それら液性因子による抑制機序は否定的である。さらにまた transwell culture を用いた実験で細胞接触がないと抑制活性が見られないことより、細胞の接触による相互作用を介する可能性が示唆されている。そしてこの細胞接触による抑制のメカニズムとして二つの可能性が考えられる。一つはアルデヒド固定あるいは放射線照射した抗原提示細胞を用いても制御性 T 細胞の抑性能が阻害されないという報告から制御性 T 細胞が直接他の T 細胞を抑制するというメカニズム (direct suppression) である。もう一つは制御性 T 細胞が抗原提示細胞の機能を抑制するとの報告からは抗原提示細胞を介して間接的に他の T 細胞を抑制するメカニズム (indirect suppression) である。近年、抗原提示細胞の存在が T 細胞活性化において必要であることや樹状細胞を始めとする抗原提示細胞が移植や自己免疫疾患において免疫寛容誘導に重要であることが知られている。そのため本研究では制御性 T 細胞の免疫抑制機序においても抗原提示細胞が重要であると考え、CD25⁺CD4⁺ 制御性 T 細胞の抑制作用が抗原提示細胞機能を抑制する可能性について検討した。

具体的な実験として抗原提示細胞と CD4⁺T 細胞の共培養系における CD25⁺CD4⁺T 細胞の効果を検討した。マウス由来の CD25⁺CD4⁺T 細胞、CD25⁻CD4⁺T 細胞および抗原提示細

胞の3種類の細胞を用い、共培養をし、細胞増殖をサイミジンアップテイクアッセイおよび CFSE (carboxy fluorescein succinimidyl ester) 染色法にて測定した。また、細胞表面分子の解析のためにフローサイトメトリーを、サイトカインの分泌、発現の解析のために ELISA と RT-PCR を用いた。

始めに CD25⁺CD4⁺ T 細胞の CD25⁻CD4⁺T 細胞に対する増殖抑制効果を抗原提示細胞との共培養系で検討した。CD25⁺CD4⁺ T 細胞の添加により細胞数依存性に CD25⁻CD4⁺T 細胞の増殖を抑制することが確認された。

抗原存在下において CD4⁺T 細胞が抗原提示細胞と反応すると T 細胞からは IL-2 が、抗原提示細胞からは IL-12 が産生されることが知られている。次に CD25⁺CD4⁺ T 細胞のこれらのサイトカインに対する影響を検討した。CD25⁺CD4⁺ T 細胞は CD25⁻CD4⁺T 細胞との共培養により、抗原提示細胞からの IL-12 産生を抑制することを明らかにした。CD25⁺CD4⁺ T 細胞による CD25⁻CD4⁺T 細胞の増殖抑制は外因性の IL-12 の添加により一部回復できたことから、CD25⁺CD4⁺ T 細胞による IL-12 産生抑制が CD25⁻CD4⁺T 細胞の増殖抑制に少なくとも一部は関与していることが示唆された。

制御性 T 細胞の抑制機序が IL-10 による抗原提示細胞からの IL-12 産生抑制であり、Th1 反応が抑制される事が原因であるという報告がある。このため、制御性 T 細胞の抑制機序における IL-10 の関与について検討したが、本実験条件においてはその抑制機序に IL-10 の増加が関与していないことが分かった。

一方、IL-12 は活性化 T 細胞上の CD40L (CD154) によって抗原提示細胞上の CD40 が刺激され、抗原提示細胞から産生されることが知られている。そこで活性化 T 細胞上で CD40L の発現を解析したところ、CD25⁻CD4⁺T 細胞では抗原提示細胞と共培養系において抗 CD3 抗体刺激 8 時間後、CD40L の一過性の発現を認めた。一方、CD25⁺CD4⁺T 細胞では抗 CD3 抗体刺激にても CD40L の発現がほとんど誘導されなかった。つまり制御性 T 細胞は CD40L をほとんど発現しないため、抗原提示細胞上の CD40 を介する IL-12 の産生を抑制する可能性が示唆された。

制御性 T 細胞の抗原提示細胞抑制機序として、抗原提示細胞上の CD80 および CD86 に対する作用を検討した。CD80 および CD86 の発現は制御性 T 細胞により抑制されていた。このことから制御性 T 細胞が抗原提示細胞の活性を抑制する機序の一部と考えられた。

CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞は末梢血中で少数の存在であり、かつアナジーな状態であることを特徴とする制御性 T 細胞が、膨大な CD25⁻CD4⁺T 細胞群を相手に免疫反応を効率良く抑制しているメカニズムはまだ明らかになっていない。制御性 T 細胞は、抗原刺激されても IL-2 遺伝子の発現を認めず、増殖しない。ただこのアナジーな制御性 T 細胞は高濃度の IL-2 や抗 CD28 抗体の存在下では TCR 刺激時において増殖しうることが知られている。今回の実験において、CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞が、CD25⁻CD4⁺T 細胞との共培養によっても増殖可能であることが明らかになった。そして、抗 IL-2 抗体の添加により増殖が阻害されたことから、CD25⁻CD4⁺T 細胞から産生された IL-2 が CD25⁺CD4⁺ T 細胞の増殖

因子の一つであることが示唆された。

本研究では制御性 T 細胞による抗原提示細胞を介した免疫応答の間接的抑制機序として、抗原提示細胞の活性化を抑制するのみならず、その IL-12 の産生をも抑制することを示した。また、本来はアナジーをその特徴とする制御性 T 細胞の増殖機構についても CD25⁻CD4⁺T 細胞から分泌される IL-2 によって制御性 T 細胞が増殖しうることを明らかにし、炎症の際に活性化される CD4⁺T 細胞が同時に制御性 T 細胞の増殖を助けることにより免疫応答を終結させるというネガティブフィードバックのメカニズムの存在を推察することができた。