

論文の内容の要旨

論文題目 タクロリムスによる制御性 T 細胞の分裂に対する影響

指導教員 山本 一彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

古木名 和枝

タクロリムス (FK506) は、1984 年茨城県つくば市の土壌から分離された放線菌 *Streptomyces tsukubaensis* の代謝産物から精製された免疫抑制剤である。当初リンパ球混合培養反応抑制物質として発見されたが、後に IL-2 産生抑制など T 細胞が関与する免疫反応を広く抑制することが分かり、シクロスポリンと同様の T 細胞をターゲットとしたカルシニューリン阻害薬として、現在では、臓器移植患者のみならず関節リウマチ患者を含む多くの自己免疫疾患患者に使用されるようになってきている。

タクロリムスは T 細胞の活性を抑制することで、その免疫抑制効果を発揮する。T 細胞では T 細胞レセプター (TCR) からの活性化シグナルにより、細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇し、カルシニューリンと呼ばれる脱リン酸化酵素が活性化される。そして活性化されたカルシニューリンにより細胞質内の NFAT が脱リン酸化され活性型となることで、核内への移行が可能となり、MAPK 経路により誘導された AP-1 と会合し IL-2 など種々のサイトカインの転写因子として働き、T 細胞の活性化を促す。タクロリムスはそのイムノフィリンとして知られている FKBP と複合体を形成することでカルシニューリンに結合し、カルシニューリンの活性化を阻害する。これにより NFAT の脱リン酸化が妨げられ、NFAT の細胞内移行や、それに引き続いて起こる様々な遺伝子の転写が抑制される。その結果、タクロリムスは T 細胞の重要な成長因子である IL-2 を含む様々なサイトカイン遺伝子の発現を低下させ、T 細胞活性を阻害する。最近の研究では、タクロリムスが *in vitro* で T 細胞のアナジーを誘導するという報告もあるが、タクロリムスによる免疫抑制機能の重要なメカニズムは未だ明らかになっていない。

関節リウマチは、多発関節炎を主徴とした全身性の炎症性疾患であり、病因の一つとして T 細胞の異常が言われている。炎症性 T 細胞として重要視されている Th17 細胞が関節炎局所に集積、マクロファージ・線維芽細胞からの炎症性サイトカインの誘導や破骨細胞を誘導し、骨破壊を促す。これと対極にあり、エフェクター T 細胞の抑制作用を持つのが制御性 T 細胞であり、この細胞も炎症局所に存在し、炎症を沈静化する方向に働くといわれている。近年、この制御性 T 細胞が、免疫機構の制御や抑制に重要な役割を担う T 細胞サブセットとして注目されてきた。この制御性 T 細胞に特異性の高いマーカーとして、転写因子である Foxp3 が同定され、この遺伝子が制御性 T 細胞の分化や維持に重要であること

が分かってきた。タクロリムスの制御性 T 細胞に対する影響は未だ明らかになっていないが、我々はタクロリムスがエフェクター T 細胞の活性を低下させるだけでなく、制御性 T 細胞の増殖能を促進することにより、免疫抑制効果を発揮する可能性を考えた。

今回我々は、タクロリムスが CD4 陽性 T 細胞のうち特に制御性 T 細胞に対しどのような影響を及ぼすのか検討し、タクロリムスによる免疫抑制のメカニズムについて考察した。

まず、*in vitro* でタクロリムスを経口投与時の至適血中濃度と同濃度でマウス CD4 陽性細胞に添加し細胞培養を行った。タクロリムス存在下で、エフェクター T 細胞の増殖は著しく抑制されるのに対し、制御性 T 細胞の増殖は抑えられるもののエフェクター T 細胞と比較し抑制の程度は弱く、その増殖能はタクロリムス存在下でも保たれていることが分かった。つまり、*in vitro* において、マウス制御性 T 細胞はタクロリムスによる分裂抑制を受けにくいと考えられた。

また、最近の研究で、末梢組織中あるいは *in vitro* 培養下で、CD4⁺Foxp3⁺細胞の CD4⁺Foxp3⁺細胞への cell conversion が観察されることが報告されていることから、タクロリムス存在下で分裂した Foxp3⁺細胞の一部に、Foxp3⁻細胞から cell conversion した Foxp3⁺細胞が含まれている可能性についても検討したが、タクロリムスによるエフェクター T 細胞から制御性 T 細胞への cell conversion は殆ど見られなかった。このことから、Foxp3⁺細胞と Foxp3⁻細胞それぞれの細胞群でのタクロリムス添加による分裂細胞の割合の変化の違いは、制御性 T 細胞への cell conversion に起因するものではないと考えられた。

次に、*in vitro* におけるヒト末梢血中の CD4 陽性 T 細胞の分裂に対するタクロリムスの影響についても検討した。タクロリムス存在下で、CD4⁺Foxp3⁻細胞中の分裂細胞の割合は明らかに減少傾向を示したが、CD4⁺Foxp3⁺細胞中の分裂細胞の割合はタクロリムス存在下でも保たれ、さらに増強する傾向もみられた。このように、タクロリムスの細胞分裂に対する影響は、マウス、ヒト両者とも、制御性 T 細胞とエフェクター T 細胞で異なっており、この 2 つの CD4 陽性 T 細胞サブセットに対するタクロリムスの作用の違いが、炎症局所での制御性 T 細胞とエフェクター T 細胞のバランスを変化させる可能性や、さらにタクロリムスの免疫抑制効果の重要なメカニズムの説明の一つとなる可能性も示唆された。

ここで、タクロリムスがどのようなメカニズムで細胞増殖を制御しているのかを調べるため、タクロリムスによって誘導されるヒト制御性 T 細胞における遺伝子発現の変化を検討した。我々は、TCR シグナル関連遺伝子に注目し、特に Foxp3 がプロモーター領域につくことで発現を直接コントロールしていることが報告されている遺伝子について解析した。この内の一つである Protein tyrosine phosphatase N22 (PTPN22) は、T 細胞内において、Csk と会合し、TCR シグナルを伝達するカスケードの上流分子である ZAP70 や Lck を脱リン酸化することで、T 細胞内の活性化シグナルを抑制的に制御している。PTPN22 (C1858T) SNP は関節リウマチや全身性エリテマトーデス、1 型糖尿病、Graves 病の発症と関係しており、PTPN22 遺伝子は複数の自己免疫疾患に関連した原因遺伝子であるこ

とが知られている。また、IL-2 inducible T cell kinase (Itk) は、TCR の刺激に応答し、PLC- γ 1 のリン酸化を介して細胞内への Ca イオン導入を促し、T 細胞活性化に関わる転写因子の活性化をもたらす。これら 2 つの TCR シグナル関連遺伝子は、Foxp3 がプロモーター領域につくことで発現がコントロールされることが知られている。タクロリムス存在下で培養した制御性 T 細胞の PTPN22、Itk の発現を m-RNA レベルでそれぞれ調べたところ、タクロリムス存在下では、制御性 T 細胞における PTPN22 の発現は減少し、Itk の発現は上昇することが分かった。すなわち、タクロリムスの免疫抑制効果は、制御性 T 細胞における PTPN22 発現を抑制し、Itk 発現を亢進することに起因し、これらの遺伝子プロファイルの変化は、エフェクター T 細胞と比較し制御性 T 細胞の増殖阻害が減弱することに繋がっていると考えられた。最近の研究で、関節リウマチなどの自己免疫疾患の発症に関係する PTPN22 遺伝子の変異は T 細胞内で PTPN22 のフォスファターゼ活性を上昇させ、機能を亢進させる変異であることが明らかになっているが、タクロリムスによる PTPN22 発現の抑制が、この遺伝子変異による PTPN22 の機能亢進を正常な方向に修正する働きを担っている可能性も示唆された。

さらに、*in vivo* でも制御性 T 細胞の実数に対してタクロリムスが影響するのかどうか調べるため、マウスにタクロリムスを内服させ、異なる臓器中の CD4 陽性 T 細胞数の変化を分析した。タクロリムスを 7 日間内服させたマウスの末梢リンパ臓器中の CD4⁺CD25⁺CD45RB^{int}エフェクター T 細胞、CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞の数は、いずれも著明に減少していた。この結果は、移植患者に対するカルシニューリン阻害薬の投与が CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺制御性 T 細胞の割合を減少させたという過去の報告と一致した結果であった。この *in vivo* における制御性 T 細胞数の減少は、タクロリムスによるエフェクター T 細胞からの IL-2 産生の低下に関係しているのかもしれない。タクロリムスが生体内の制御性 T 細胞数の維持に関連しないということは、炎症局所における制御性 T 細胞の抗原特異的な増殖を促進する効果がタクロリムスの作用機序として重要であるということも推測された。さらに、コラーゲン誘導性関節炎 (CIA) マウス生体内における CD4 陽性 T 細胞の分布に、タクロリムスが影響するかどうか調べた。これにより、タクロリムスに曝露された CD4 陽性 T 細胞の分布は、CIA マウス中で末梢臓器から脾臓へシフトすることが分かった。従って、*in vivo* において、タクロリムスはエフェクター T 細胞、制御性 T 細胞とも、末梢プールへの分布を減少させることが示唆された。

以上の検討より、タクロリムスは、制御性 T 細胞とエフェクター T 細胞の 2 つの CD4 陽性 T 細胞サブセットに対して、*in vitro* での TCR シグナル誘導性の細胞分裂に異なる作用を示すと考えられた。特に、ヒト CD4 陽性 T 細胞においては、タクロリムスにより制御性 T 細胞の分裂は促進される傾向さえ見られた。制御性 T 細胞では TCR 関連遺伝子である PTPN22 と Itk の発現がタクロリムスによって修飾され、このことがタクロリムス存在下での制御性 T 細胞の分裂促進に繋がると考えられた。これらの結果から、炎症局所における免疫制御にタクロリムスが重要な役割を果たすことが示された。