

論文内容の要旨

論文題目

T 細胞抗原受容体シグナルの TRAF6 依存的な調節による 制御性 T 細胞の胸腺内分化決定

氏名 下茂 佑輔

<研究の背景>

免疫系による自己と非自己の識別は個体の恒常性維持に必須である。この識別機構の破綻は自己組織に対する免疫応答を惹起し、それが持続すると自己免疫疾患を発症する。制御性 T 細胞は自己組織などへの免疫応答を抑制する T 細胞のサブセットである。制御性 T 細胞の機能や分化は転写因子 Foxp3 により制御される。実際、Foxp3 の発現あるいは機能異常は、制御性 T 細胞の減少や免疫抑制機能の低下を引き起こし、自己免疫疾患を発症させる。制御性 T 細胞は内在性と誘導性に分類される。内在性制御性 T 細胞は胸腺内で分化し、自己寛容など「生得性」免疫寛容の獲得・維持を担う。誘導性制御性 T 細胞は抗原刺激と TGFβ の刺激により末梢のナイーブ T 細胞から誘導され、抗原特異的な「獲得性」免疫寛容に関与する。内在性制御性 T は通常の T 細胞と同様に胸腺で分化する。しかし、胸腺内で制御性 T 細胞への分化がどのようなシグナル伝達機構で決定されるのかは不明である。制御性 T 細胞は自己免疫疾患への関与だけでなく、移植免疫や腫瘍免疫への応用も期待されており、その分化決定機構は解明すべき重要な課題となっている。

制御性 T 細胞の分化メカニズムを調べるには、制御性 T 細胞分化に異常が見られるマウスを用いてその原因を解明することが極めて有効である。TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) は、TNF receptor super family や Toll /IL-1 receptor family からのシグナルを伝達し、転写因子 NF-κB や AP-1 の活性化を誘導する分子である(図 1)。TRAF6

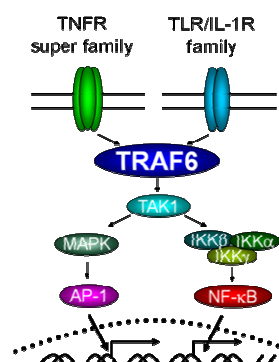


図1 TRAF6によるNF-κB、AP-1活性化の分子機構

欠損マウスは激しい自己免疫疾患様の病態を示す。さらに TRAF6 欠損マウスの胸腺では、通常の T 細胞は減少しないにもかかわらず、Foxp3 陽性の制御性 T 細胞が野生型の約 1/10 に減少する(図 2A)。一方で、末梢のナイーブ T 細胞を用いた TGFβによる誘導性制御性 T 細胞の分化は TRAF6 欠損により障害されない(図 2B)。これらの結果から、TRAF6 が関与するシグナルが制御性 T 細胞の胸腺内分化を決定することが示唆される。

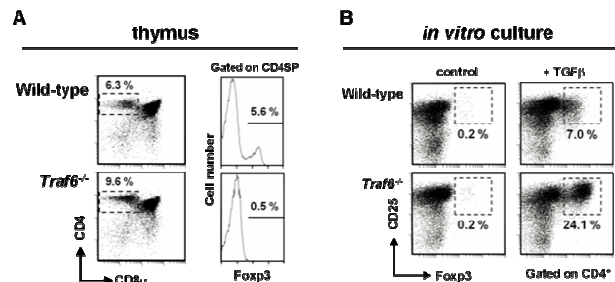


図2 TRAF6は制御性T細胞の胸腺内分化に必要である

A. 生後14日齢の野生型とTRAF6欠損マウスの胸腺内の細胞を抗CD4、CD8、Foxp3抗体で染色し、フローサイトメトリーにより解析した。
B. 野生型とTRAF6欠損マウスの脾臓からCD4⁺CD25⁺T細胞を分離した。抗CD3、CD28抗体、IL-2、TGFβ存在下で3日間培養後、抗CD4、CD25、Foxp3抗体で染色し、フローサイトメトリーにより解析した。

<研究目的と方法>

本研究は、TRAF6 欠損マウスの解析を糸口として制御性 T 細胞分化の分子機構を解明し、免疫疾患治療に有益な情報基盤を得ることを最終目的とした。具体的に以下の方法で研究を進めている。

- 1) TRAF6 が機能して制御性 T 細胞の胸腺内分化を誘導する細胞の同定
- 2) 同定した細胞で制御性 T 細胞への分化を誘導する TRAF6 シグナルの上流の受容体と細胞内シグナル伝達機構の解明

<結果と考察>

1) TRAF6 が機能して制御性 T 細胞の胸腺内分化を誘導する細胞の同定

制御性 T 細胞は胸腺内で抗原提示細胞と相互作用しながら、未成熟な T 細胞(胸腺細胞)から分化する。また胸腺には抗原提示細胞として胸腺上皮細胞と樹状細胞が存在する。胸腺上皮細胞は胸腺ストローマを形成する細胞であり、胸腺細胞と樹状細胞は造血幹細胞由来の細胞である。そこで、胸腺ストローマ移植と造血幹細胞を含む胎仔肝臓細胞の移植実験を行い、どの細胞における TRAF6 欠損が制御性 T 細胞分化異常の原因となっているかを調べた。

1) - 1 胸腺ストローマにおける TRAF6 は制御性 T 細胞分化に必須ではない

野生型および TRAF6 欠損胎仔胸腺から、胸腺細胞、樹状細胞など造血幹細胞由来の細胞を除去して胸腺ストローマとし、胸腺を持たないヌードマウスに移植した。8 週間後に移植した胸腺内の制御性 T 細胞の存在比および分布を解析した。その結果、TRAF6 欠損胸腺ストローマを移植しても、Foxp3 陽性の制御性 T 細胞の比率は野生型の胸腺ストローマを移植した際の約 2/3 にしか低下せず、胸腺内の制御性 T 細胞の局在にも異常はなかった。

1) - 2 胸腺細胞内の TRAF6 が制御性 T 細胞への分化を誘導する

野生型および TRAF6 欠損胎仔肝臓細胞(CD45.2)を、それぞれ congenic な野生型の胎仔肝臓細胞(CD45.1)と混合し、X 線照射した RAG2 欠損マウスに移植した。4~6 週間後に胸腺内の野生型由来および TRAF6 欠損胎仔肝臓細胞由来の制御性 T 細胞分化を解析した。その結果、CD45.1⁺の congenic な野生型の制御性 T 細胞が正常に分化できる胸腺環境でも、CD45.2⁺の TRAF6 を欠損す

る制御性 T 細胞の分化は著しく損なわれた(図 3)。

以上の結果から、胸腺ストローマにおける TRAF6 は制御性 T 細胞分化に関与するが必須とは言えず、胸腺細胞内で TRAF6 が機能して制御性 T 細胞への分化を誘導することが判明した。

2) 胸腺細胞内で制御性 T 細胞への分化を誘導する TRAF6 シグナルの上流の受容体と細胞内シグナル伝達機構の解明

制御性 T 細胞の胸腺内分化には T 細胞抗原受容体(TCR)と主要組織適合抗原複合体(MHC)の相互作用が必須である。また、これまでに末梢の T 細胞を用いた解析により、T 細胞内の TRAF6 が TCR の下流で働くことが報告されている。これらの事実から、TRAF6 が胸腺細胞上に発現する TCR の下流でシグナルを制御することで、制御性 T 細胞分化を誘導することが示唆される。

2) - 1 TRAF6 による TCR シグナルの制御

胸腺細胞の TCR 下流で TRAF6 が機能するかを調べるため、*in vitro* の刺激実験を行った。野生型および TRAF6 欠損胸腺細胞を抗 CD3、抗 CD28 抗体で刺激し、ウェスタンブロッティングにより解析した。TCR を 15 分まで刺激した際には、TRAF6 欠損胸腺細胞では I κ B α のリン酸化が検出されなかった(図 4A)。

一方、TNF α で刺激した際には、TRAF6 欠損胸腺細胞でも野生型と同程度の NF- κ B の活性化が起きた(図 4C)。これらの結果から、TRAF6 は TCR の下流で NF- κ B の活性化を制御することが判明した。また、TCR 刺激による Akt と ERK のリン酸化は、TRAF6 欠損胸腺細胞でやや亢進していた(図 4B)。これまでに NF- κ B の活性化と Akt の抑制は、胸腺内の制御性 T 細胞分化を誘導することが報告されている。したがって、これらの TCR シグナルの TRAF6 依存的な調節により、制御性 T 細胞の胸腺内分化が決定されることが示唆された。

2) - 2 TCR の下流で活性化する NF- κ B の TRAF6 による時間的制御

TCR 刺激による増殖には NF- κ B の活性化が必要である。実際、TCR 下流の NF- κ B の活性化に必要な CARMA1 や BCL10 を欠損する T 細胞は、TCR を刺激しても増殖しない。さらに、これらの分子の欠損マウスは、TRAF6 欠損マウスと同様に胸腺内の制御性 T 細胞がほぼ消失する。したがって、TCR-NF- κ B 経路は増殖と制御性 T 細胞分化を誘導すると考えられる。しかし、TRAF6 欠損胸腺細胞では TCR を短時間刺激した際に NF- κ B 活性化の異常が見られるにも関わらず、TCR

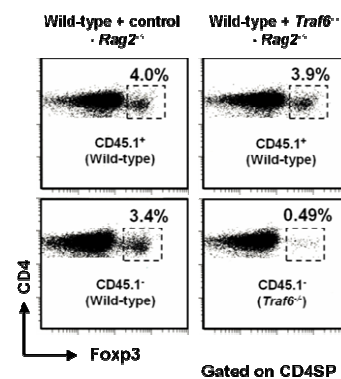


図3 TRAF6は胸腺細胞内で機能して制御性T細胞への分化を誘導する

野生型とTRAF6欠損胎仔肝臓細胞(CD45.2⁺)をcongenicな野生型の胎仔肝臓細胞(CD45.1⁺)と混合し、X線照射したRAG2欠損マウスに移植した。4~6週間後、胸腺内の細胞を抗CD45.1、CD4、CD8、Foxp3抗体で染色し、フローサイトメトリーにより解析した。

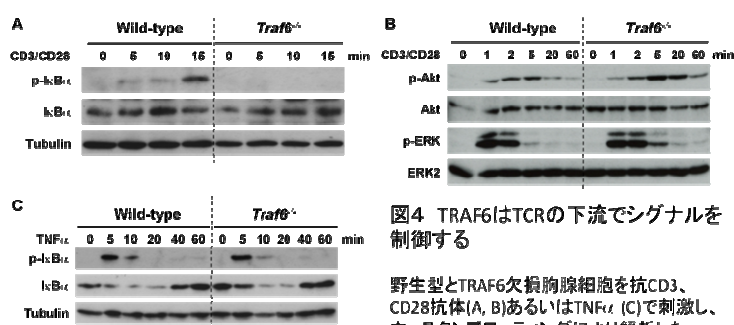


図4 TRAF6はTCRの下流でシグナルを制御する

野生型とTRAF6欠損胸腺細胞を抗CD3、CD28抗体(A, B)あるいはTNF α (C)で刺激し、ウェスタンブロッティングにより解析した。

刺激による TRAF6 欠損 CD4SP 胸腺細胞の増殖は野生型よりむしろ亢進する。また、TRAF6 欠損 CD4SP 胸腺細胞の TCR を 24 時間刺激すると、野生型と同程度の NF- κ B の核移行が検出される。これらの結果から、TCR 刺激による NF- κ B の活性化は、TRAF6 依存的な早い経路と非依存的な遅い経路に分かれるという仮説を立て、I κ B α のリン酸化を詳細に解析した。その結果、TRAF6 欠損胸腺細胞では TCR 刺激後 15 分まではリン酸化が検出されないにもかかわらず、30 分以降では野生型と似た kinetics でリン酸化が検出された(図 5)。この結果から、TCR 下流の NF- κ B 活性化は TRAF6 依存性により 2 つの経路に分かれることが判明した。したがって、TRAF6 は TCR 刺激による NF- κ B 活性化に必須ではないが、NF- κ B の迅速な活性化を誘導して制御性 T 細胞への分化を決定することが示唆された。また、T 細胞の増殖は、TRAF6 依存性の低い後期の持続的な NF- κ B 活性化で十分であることが示唆された。

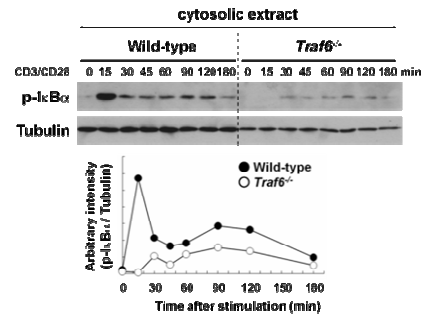


図5 TCR下流のNF- κ B活性化はTRAF6依存性により2つの経路に分かれる

野生型とTRAF6欠損胸腺細胞を抗CD3、CD28抗体で刺激し、I κ B α のリン酸化とTubulinの発現をウェスタンブロッティングにより解析した。バンドの強度を測定し、Tubulinに対するリン酸化I κ B α の強度を定量化した。

2) - 3 TRAF6による RelA と c-Rel の活性化制御

最近 NF- κ B family の RelA と c-Rel が制御性 T 細胞分化を誘導することが報告された。そこで胸腺細胞内の RelA と c-Rel の活性化における TRAF6 の関与を調べた。抗 CD3、抗 CD28 抗体あるいは PMA/ionomycin で刺激後に核抽出液を回収し、RelA と c-Rel の核移行を解析した。その結果、どちらの刺激の場合にも、TRAF6 欠損胸腺細胞で RelA と c-Rel の核移行が損なわれた。また、刺激の後期段階では TRAF6 欠損胸腺細胞でも RelA と c-Rel の核移行が検出され、TRAF6 依存性の低い NF- κ B の活性化が確認された(図 6A, B)。

<総括>

本研究で得られた結果から、制御性 T 細胞の胸腺内分化を決定する以下のモデルを構築した。TRAF6 は胸腺細胞上に発現する TCR の下流で NF- κ B の迅速な活性化を誘導するとともに、Akt の活性化を抑制する。TRAF6 依存的なこれらの TCR シグナルの調節により、制御性 T 細胞の胸腺内分化が決定されることが示唆された(図 6C)。

また、TCR 下流の NF- κ B 活性化に必須な CARMA1 や BCL10 とは異なり、TRAF6 の機能は制御性 T 細胞の胸腺内分化と初期の NF- κ B 活性化に特化していることを本研究で明らかにした。今後この TRAF6 依存的な初期の NF- κ B 標的遺伝子を同定することにより、本研究が制御性 T 細胞分化機構の解明に貢献することが期待される。

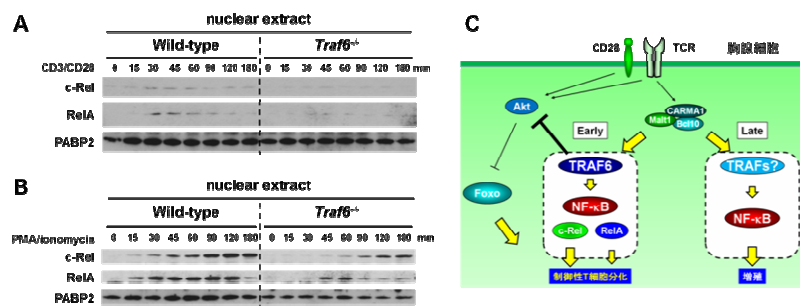


図6 TRAF6はTCR刺激によるRelAとc-Relの活性化を制御する

A, B. 野生型とTRAF6欠損胸腺細胞を抗CD3、CD28抗体(A)あるいはPMA + ionomycin (B)で刺激後、核抽出液を回収してウェスタンブロッティングにより解析した。
C. TRAF6によるTCRシグナルの調節と制御性T細胞分化のモデル