

審査の結果の要旨

氏名 綾部 (赤平) 理紗

本研究は、中枢性 T 細胞トレランスにおける二つの機序、すなわち clonal deletion と Treg 細胞への分化以外の新規経路の有無を確認し、その機構を明らかにするため、全ての CD4⁺T 細胞が OVA すなわち全身性核内自己抗原に反応し機能的 Foxp3 を欠く RDBLSf マウスを作製し、このマウスに出現する T 細胞の挙動の解析を実際に試みたものであり、下記に結果を得ている。

1. RDBLSf マウスは皮膚以外に臓器障害を来すことなく長期間生存可能であった。RDBLSf マウスでは皮膚以外はトレランスが保たれているにもかかわらず、胸腺・末梢に CD4 single positive T 細胞が分化してきており、自己抗原反応性 T 細胞が 90% 以上を占めることが確認された。このことから、中枢性 T 細胞トレランスにおける新規経路の存在が示された。
2. マイクロアレイの結果、IL-21、Helios、PD-1、CD200、ICOS が RDBLSf マウスの脾臓の T 細胞で非常に強く発現しており RDBLSf マウスの特徴的発現遺伝子と考えられた。Flow cytometry でも RDBLSf マウスの脾臓において PD-1⁺CD200⁺ Helios⁺CD4⁺T 細胞が多く認められた。
3. 特徴的表面分子や IL-21 が主要産生サイトカインである点などが従来の follicular helper T 細胞 (Tfh 細胞) と類似しているため、従来の Tfh 細胞の代表的表面分子の発現を RDBLSf マウスの末梢の T 細胞において flow cytometry にて検討した結果、CXCR5⁻ICOS⁺CXCR4⁺GL7⁺CD4⁺ T 細胞であることが判明した。また、従来の Tfh 細胞の転写因子である Bcl-6 が高発現し、そして RDBLSf マウスの胸腺においても IL-21 産生 PD1⁺CD200⁺CD4 single positive T 細胞が存在していた。
4. RDBLSf マウスは皮膚以外はトレランスが保たれていることから RDBLSf マウスの T 細胞は低増殖能であると仮説を立て in vivo で増殖能の検討を行ったところ、in vivo で RDBLSf マウス由来の T 細胞は split anergy であることが明らかになった。また、この anergy は抗 PD-1 抗体を生体内に投与し PD-1・PD-1-Ligands 反応を阻害することにより解除された。
5. RDBLSf マウスの T 細胞が IL-21 を産生し一部の表面分子や転写因子が従来の Tfh 細胞と共通していたため、RDBLSf マウスの T 細胞を WT マウスの B 細胞と共培養して抗体産生誘導能を検討した。RDBLSf マウスの CD4⁺T 細胞はクラススイッチ後の IgG、IgA の抗体産生誘導能が高かった。以上よりこの新規の T 細胞サブセットが IL-21 産生性で抗体産生誘導能を有し、表面マーカーの多くと転写因子が従来の Tfh 細胞と

共通し、胸腺由来であることから、natural Tfh 細胞と名付けた。

6. Natural Tfh 細胞が Rag2 と機能的 Foxp3 を欠く特殊な条件下のみで生じるのか検討する為、核内自己抗原反応性 T 細胞を有するが Rag2 が存在し TCR 改変も生じ Treg 細胞も存在する DBL マウスで評価したところ、PD-1⁺Helios⁺Foxp3⁻CD4⁺T 細胞が Treg 細胞と比較してより自己反応性の強い population から出現し IL-21 を産生していることが判明した。さらに、DBL マウスの胸腺で CD4 single positive T 細胞に IL-21 産生細胞が存在し、また胸腺を欠く n/nDBL マウスの末梢には natural Tfh 細胞が出現しなかったことから、胸腺由来であることが判明した。また、特殊な遺伝子改変マウスだけでなく WT マウスの末梢においても natural Tfh 細胞と同等の表面マーカーを有する細胞 (natural Tfh-like 細胞) が分化し、RT-PCR 法により WT マウスの脾臓、胸腺において natural Tfh-like 細胞で IL-21、Helios、Bcl-6 の発現を強く認めた。

7. Natural Tfh 細胞の生体内での germinal center 形成や抗体産生の評価を行うため、B 細胞が存在しつつ natural Tfh 細胞の多い TCR α 欠損 DBL マウスで解析した。Flow cytometry や免疫蛍光法による検討から、TCR α 欠損 DBL マウスで germinal center 形成が著明に認められ、また ELISA で測定した total IgG 及び OVA 特異的 IgG 産生、抗核抗体の力価に関しても、TCR α 欠損 DBL マウスにおいて最も亢進していた。

8. natural Tfh 細胞は Bcl-6WT マウスで認めるが、Bcl-6 欠損マウスではほとんど認められなかった。なお、Bcl-6 欠損マウスで消失し Bcl-6WT マウスで出現する CD200⁺PD-1⁺ Foxp3⁻CD4⁺T 細胞において CXCR5 の発現が認められなかった。以上より Bcl-6 が従来の Tfh 細胞と同様に natural Tfh 細胞においても重要な遺伝子と考えられた。

以上、本論文は、既知の自己反応性 T 細胞の制御機構である clonal deletion、Treg 細胞への分化経路とは異なる新たな経路を解明した。この T 細胞サブセットは、従来の Tfh 細胞と比較して、一部表面分子と転写因子の発現、IL-21 産生や B 細胞の抗体産生誘導能などの機能面では共通点を有しているが、自己抗原認識、従来の Tfh 細胞マーカーである CXCR5 が陰性、胸腺分化の点が異なり、新規 T 細胞サブセットといえる。また、natural Tfh 細胞は anergic な T 細胞であり自己免疫制御における重要性が示唆されること、natural Tfh 細胞の正常個体での生理的意義として自然抗体の形成への関与、自己免疫疾患においては自己抗体産生への関与が示唆されることより、本研究で新規に解明された natural Tfh 細胞への分化経路は、今後、全身性自己免疫疾患との関わりや新たな治療を検討していく上で重要であることから、本研究は学位の授与に値するものと考えられる。