

学位論文題名

HTLV-I トランスジェニックラットにおける
免疫制御性CD4⁺CD25⁺T細胞の解析

学位論文内容の要旨

ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型(human T-cell leukemia virus type-I; HTLV-I)は、成人 T 細胞白血病(ATL)の原因ウイルスであるのみならず、痙性脊髄麻痺、ぶどう膜炎、関節リウマチ類似の関節炎、シェーグレン症候群類似の唾液腺炎、T 細胞性肺胞炎など、HTLV-I 関連疾患と総称される自己免疫疾患に類似した様々な疾患を引き起こすことが知られている。当教室では、このような HTLV-I の多彩な病原性について *in vivo* で解析するため、HTLV-I の *env* および p40-Tax 蛋白をコードする *env-pX* 遺伝子をウイルス自身の LTR プロモーターの制御下に WKAH/Hkm ラット受精卵に導入して HTLV-I LTR-*env-pX* トランスジェニックラット(*env-pX* ラット)を作製し、このラットにリウマチ様関節炎、壊死性血管炎、皮膚炎、心筋炎、筋炎など様々な自己免疫疾患が発症することを報告してきた。一方、CD4⁺CD25⁺ T 細胞は自己反応性 T 細胞の活性化を抑制し、自己免疫疾患の発症を抑制していると考えられている。実際に、自己免疫疾患モデル動物において CD4⁺CD25⁺ T 細胞の数的異常の存在が示されている。また当教室での *env-pX* ラットの解析から、本ラットの CD4⁺CD25⁺ T 細胞に数的異常は認めないものの、疾患発症前から免疫制御機能に異常が認められることを示してきた。

本研究では、*env-pX* ラットの CD4⁺CD25⁺T 細胞の機能異常の原因を明らかにするため、WKAH/Hkm ラット CD4⁺CD25⁺ T 細胞との間で各種表面分子、遺伝子発現の比較を行なった。CD4⁺CD25⁺ T 細胞は胸腺で免疫制御活性を持つ機能的に成熟した T 細胞に分化することが知られている。そこで *env-pX* ラットの CD4⁺CD25⁺ T 細胞の機能異常と *env-pX* 遺伝子を発現する胸腺フレームワークの関連を調べるため、*env-pX* ラットと WKAH/Hkm ラットの間で骨髄移植を行い、移植後の個体から採取した CD4⁺CD25⁺ T 細胞についての免疫制御機能も検討した。

CD4⁺CD25⁺ T 細胞の免疫制御機能の発現には APC との接着、すなわち TCR および CD28 や CTLA-4 などの副シグナル分子を介した細胞接着が重要な役割を果たしている。CD28 はそのリガンドである APC 上の CD80/86 からのシグナルに対して CTLA-4 と競合的に働き、CD4⁺CD25⁺ T 細胞の機能を抑制すると考えられている。本研究では、*env-pX* ラットと WKAH/Hkm ラットの CD4⁺CD25⁺ T 細胞で、TCR および CD28 の発現に違いがあるかどうか

かを検討したが、両ラット間でこれらの分子の発現量に明らかな差は認められなかった。また、env-pX ラットの末梢 T 細胞は疾患発症前から活性化準備状態にあり、CD80/86 の発現が増強していることが判明している。このことから、env-pX ラットの CD4⁺CD25⁺ T 細胞でもこれら分子の発現が増強し、APC 様に作用している可能性を考えた。しかし、env-pX ラットと WKAH/Hkm ラットの CD4⁺CD25⁺ T 細胞で CD80 および CD86 の発現に明らかな差は認められなかった。また、CD4⁺CD25⁺ T 細胞の抑制機能を媒介しているとの報告がある CD4⁺CD25⁺ T 細胞上に発現する膜結合型 TGF- β 1 (mTGF- β 1) について検討したが、env-pX ラットの CD4⁺CD25⁺ T 細胞では mTGF- β 1 の発現はむしろ増強していた。

ヒトの X-linked lymphoproliferative disease から発見された Foxp3 は CD4⁺CD25⁺ T 細胞の発生および免疫制御機能発現に重要である。env-pX ラットの CD4⁺CD25⁺ T 細胞では、この Foxp3 の発現が減少していた。また、Foxp3 によって発現が調節されることが知られている GITR の発現も減少していた。さらに本研究では、JAK/STAT 系のサイトカインシグナルを抑制することが知られている SOCS ファミリーの遺伝子発現についても検討した。その結果、env-pX ラットでは、SOCS-1、SOCS-2、SOCS-3、CIS の発現が WKAH/Hkm ラットと比べ有意に低下していた。その他、現時点で CD4⁺CD25⁺ T 細胞の機能への関与が報告されていない遺伝子についても検索するために、ラット cDNA アレイフィルターを用い網羅的遺伝子発現解析を行った。

CD4⁺CD25⁺ T 細胞は胸腺で免疫制御活性を持つ機能的に成熟した T 細胞に分化する。このことから、env-pX 遺伝子を発現する胸腺フレームワークによって、CD4⁺CD25⁺ T 細胞が分化段階で異常をきたし、その結果 env-pX ラットでは免疫制御機能を失っているのではないかと考えた。この仮説を検証するため、env-pX ラットと WKAH/Hkm ラットの間で骨髄移植実験を行なった。その結果、env-pX ラットの骨髄を WKAH/Hkm ラットに移植した個体では胸腺フレームワークには env-pX を持っていないにも関わらず CD4⁺CD25⁺ T 細胞の抑制機能が認められなかった。一方、WKAH/Hkm ラットの骨髄を env-pX ラットに移植した個体では CD4⁺CD25⁺ T 細胞にその抑制機能が認められた。従って、env-pX ラットの CD4⁺CD25⁺ T 細胞の機能異常は、env-pX 遺伝子を発現する胸腺フレームワークを通過する際の分化異常が原因ではなく、CD4⁺CD25⁺ T 細胞自体に env-pX 遺伝子が発現していることに起因していると考えられた。

以上の結果から、env-pX ラットの CD4⁺CD25⁺ T 細胞では env-pX 遺伝子が発現することによって、Foxp3、GITR、SOCS ファミリーの遺伝子に発現低下が起り、免疫制御機能を失っている可能性が示唆された。その他、cDNA アレイで発現差のみられた遺伝子のなかにも、CD4⁺CD25⁺ T 細胞の免疫制御機能と関連している遺伝子が含まれている可能性がある。env-pX 遺伝子がどのようなメカニズムによってこれら遺伝子の発現変化をもたらして CD4⁺CD25⁺ T 細胞機能異常の原因になっているのか、さらなる検討が必要である。さらに、この env-pX ラットの CD4⁺CD25⁺ T 細胞を用いることにより、より普遍的な CD4⁺CD25⁺ T 細胞の免疫抑制機構をさらに解明することができると期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 小 野 江 和 則

学 位 論 文 題 名

HTLV-I トランスジェニックラットにおける 免疫制御性CD4⁺CD25⁺T細胞の解析

ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型は、成人 T 細胞白血病の原因ウイルスであるのみならず、HAM/TSP、関節リウマチ類似の関節炎など、HTLV-I 関連疾患と総称される自己免疫疾患に類似した様々な疾患を引き起こすことが知られている。当教室では、このような HTLV-I の多彩な病原性について *in vivo* で解析するため、HTLV-I の *env-pX* 遺伝子を WKAH ラット受精卵に導入して HTLV-I LTR-*env-pX* トランスジェニックラット(*env-pX* ラット)を作製し、このラットにリウマチ様関節炎、壊死性血管炎、皮膚炎、心筋炎など様々な自己免疫疾患が発症することを報告してきた。一方、CD4⁺CD25⁺T 細胞は自己反応性 T 細胞の活性化を抑制し、自己免疫疾患の発症を抑制していると考えられている。また、本ラットの CD4⁺CD25⁺T 細胞では、疾患発症前から免疫制御機能に異常が認められることを示してきた。

本研究では、*env-pX* ラットの CD4⁺CD25⁺T 細胞の機能異常の原因を明らかにするため、WKAH ラット CD4⁺CD25⁺T 細胞との間で各種細胞表面分子、遺伝子発現の比較を行なった。CD4⁺CD25⁺T 細胞は胸腺で免疫制御活性を持つ機能的に成熟した T 細胞に分化することが知られている。そこで *env-pX* ラットの CD4⁺CD25⁺T 細胞の機能異常と *env-pX* 遺伝子を発現する胸腺フレームワークの関連を調べるため、*env-pX* ラットと WKAH ラットの間で骨髄移植を行い、移植後の個体から採取した CD4⁺CD25⁺T 細胞についての免疫制御機能を検討した。*env-pX* ラットと WKAH ラットの CD4⁺CD25⁺T 細胞では、フローサイトメトリーで調べ得た各種細胞表面分子の発現に両者の間で明らかな差は認められなかった。しかし、定量的リアルタイム RT-PCR で比較した Foxp3、GITR、CTLA-4、SOCS-1、2、3、CIS の発現は WKAH ラットに比べ *env-pX* ラットで有意に低下していた。骨髄移植の実験では、WKAH ラット

の骨髄細胞で env-pX ラットの骨髄を置換した個体では胸腺フレームワークに env-pX を持っているにも関わらず、その末梢 CD4⁺CD25⁺ T 細胞の抑制機能は保持されていた。一方、env-pX ラットの骨髄細胞で WKAH ラット骨髄を置換した個体では env-pX ラットと同様に CD4⁺CD25⁺ T 細胞の抑制機能が認められず、env-pX ラットに見る CD4⁺CD25⁺ T 細胞の機能異常は導入 env-pX 遺伝子の CD4⁺CD25⁺ T 細胞における直接的作用により、Foxp3、GITR、SOCS ファミリーの遺伝子に発現低下を誘導して、免疫制御機能を失っている可能性が示唆された。

公開発表において、副査の小池 隆夫教授より、CD4⁺CD25⁺ T 細胞における CTLA-4 の意義、CD4⁺CD25⁺ T 細胞の異常のみで全身性炎症が説明できるのか、stem cell に pX が入ることで CD4⁺CD25⁺ T 細胞の機能異常が起こるが、どのような機序を想定しているのか、HAM と CD4⁺CD25⁺ T 細胞の関連はなにか知られているのかについて質問があった。これらの質問に対して申請者は、CTLA-4 の関与についてははっきりとした見解が得られていないこと、env-pX ラットでは末梢リンパ球が hyper-responsive な状態にあり、これら細胞の関与も考えられること、pX が入ることによって NF κ B などの転写因子が関与している可能性があること、ヒト HAM 患者において CD4⁺CD25⁺ T 細胞の機能異常が報告されていることなど概ね適切に回答した。次いで、小野江和則教授より、種によって CD4⁺CD25⁺ T 細胞に違いはあるのか、末梢 T リンパ球に CD80/86 は発現しているのか、骨髄移植後のリンパ系の再建について、env-pX ラットの CD4⁺CD25⁺ T 細胞と活性化した CD4⁺CD25⁺ T 細胞とで決定的に違う点は何かについて質問があった。これらの質問に対しても、種によって多少の違いがあること、env-pX ラットの末梢 T リンパ球には CD80/86 が発現していること、骨髄移植後リンパ系が再建された状態で実験を行なったこと、現在 CD45RC の発現で区別していることなどほぼ妥当な回答をした。最後に、主査の吉木 敬教授より、env-pX 遺伝子と CD4⁺CD25⁺ T 細胞でのこれらの遺伝子発現変化について、今後その直接的証拠や経路を含めた解析を進めていくことが重要であるとの助言を受けた。

この論文は、env-pX ラットに見る CD4⁺CD25⁺ T 細胞の抑制機能の異常について、その抑制関連分子の遺伝子発現の低下に原因のあることを明らかにしたことで高く評価され、今後このモデルを用いた解析は、より普遍的な CD4⁺CD25⁺ T 細胞の免疫抑制機構をさらに明らかにすることができると期待される。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。