

CD25陽性 CD4陽性 T細胞の 抑制機能における CTLA-4 の役割

学位論文内容の要旨

Cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 (CTLA-4)は活性化T細胞上にもみ発現誘導され、活性化を抑制するシグナルを伝達する分子である。T細胞上に恒常的に発現しているCD28と同様に抗原提示細胞上のB7 (CD80, 86)をリガンドとするが、CD28と比較し、B7に対する親和性は10-20倍であり、CD28と競合して共刺激シグナルを遮断するとともに、抑制シグナルを伝達することにより活性化T細胞を抑制する。

正常マウスやヒトに内在するCD25⁺CD4⁺T細胞 (Treg) は末梢CD4⁺T細胞およびCD4⁺CD8⁻ (CD4SP) 胸腺細胞の約5-10%を占めており、末梢において自己反応性T細胞を抑制して自己寛容の維持に重要な役割を果たしている。TregはCTLA-4を恒常的に発現しており、抗CTLA-4抗体により抑制機能の阻害効果がみられたことから、Tregの抑制活性にCTLA-4が重要であるとされているが、否定的な報告もありその意義については未だ明確になっていない。

TregにおけるCTLA-4分子の役割を明らかにするため、CTLA-4発現マウス (Tg) およびCTLA-4欠損マウス (KO) のTregおよび非抑制性細胞であるCD25⁻T細胞につき検討した。

CTLA-4TgとしてヒトCD2プロモーターの下流にCTLA-4の全長 (FL) あるいは細胞内領域を欠いた配列 (TL) のcDNAを挿入した発現ベクターを用いたマウスを確立した。FL由来のCD25⁺T細胞 (FL25⁺) およびCD25⁻T細胞 (FL25⁻) のCTLA-4は正常CD25⁺ (WT25⁺) と同程度に発現し、TL由来のCD25⁺T細胞 (TL25⁺) およびCD25⁻T細胞 (TL25⁻) のCTLA-4はWT25⁺、FL25⁺あるいはFL25⁻と比較し数十倍高い発現がみられた。

以下に結果の要約を示す。

1) Tregの分化及び機能に重要とされる*Foxp3*遺伝子の発現に対するCTLA-4発現の影響をReal-time RT-PCR法を用いて調べたところ、WT25⁺、FL25⁺、TL25⁺の間に量的な差は認められず、CD25⁻T細胞においてその発現は誘導されなかった。

2) X線照射した脾臓細胞と抗CD3抗体を用いて刺激した正常CD25⁻T細胞の増殖反応に対するTregの抑制活性をCTLA-4Tgにおいて検討したところ、CTLA-4発現レベルとTregの抑制活性に相関はなかった。

3) CTLA-4を発現させることにより非抑制性CD25⁻T細胞に抑制活性が誘導できるかどうかを上記の系を用いて検討したところ、FL25⁻は抑制活性を示さず、生理的なレベルのCTLA-4発現ではCD25⁻T細胞に抑制活性を誘導することはできなかった。TL25⁻はWT25⁺

と同等の抑制活性を示し、高度にCTLA-4を発現させるとCD25⁺T細胞は抑制活性を示した。

4) CTLA-4KOの末梢T細胞は活性化されておりCD25を発現しているため、末梢T細胞からCD25をマーカーとしてTregを分離することは困難である。また現在知られているTregのマーカーすなわちGITR (glucocorticoid-induced TNF receptor) やCD103を用いても区別することは不可能である。しかし若いCTLA-4KOの胸腺には活性化T細胞が浸潤せず、CD25をマーカーとして、抑制活性を有するCD25⁺CD4⁺CD8⁻細胞(CD25⁺CD4SP)をFACS Ariaにより分離することができた。上記の系を用いてCTLA-4^{-/-}由来のCD25⁺CD4SPの抑制活性を検討したところ、*in vitro*でCTLA-4^{+/+}およびCTLA-4^{-/-}のCD25⁺CD4SPと同等の抑制活性を示した。

以上よりCTLA-4の発現レベルと*Foxp3*の発現およびTregの抑制活性は相関せず、生理的レベルのCTLA-4発現では非抑制性T細胞に抑制活性を誘導することが不可能であることより、*in vitro*でのTregの抑制機能においてCTLA-4は不要であることが示された。CTLA-4を高度に発現したCD25⁺T細胞の抑制活性については、*Foxp3*が誘導されていないことから、細胞表面のCTLA-4が抗原提示細胞のB7分子に結合して、共刺激シグナルを阻害するためと考えられた。

しかしながらCTLA-4KOはTregが胸腺内で分化するにもかかわらず、致死的なリンパ増殖性疾患をきたす。この事実はTregが末梢で維持されるためにCTLA-4が必要である可能性があることを示唆している。今後Tregの末梢維持におけるCTLA-4の役割を検討することにより、Tregによる自己免疫疾患の発症抑制機能について解明され、自己免疫疾患の治療に応用できる可能性がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 小 野 江 和 則

副 査 教 授 上 出 利 光

学 位 論 文 題 名

CD25陽性 CD4陽性 T細胞の 抑制機能における CTLA-4 の役割

Cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 (CTLA-4)は活性化 T細胞上にもみ発現誘導され、活性化を抑制するシグナルを伝達する分子である。正常マウスやヒトに内在する CD25⁺CD4⁺T細胞 (Treg) は末梢 CD4⁺T細胞および CD4⁺CD8⁻ (CD4SP) 胸腺細胞の約 5-10% を占めており、末梢において自己反応性 T細胞を抑制して自己寛容の維持に重要な役割を果たしている。Treg は CTLA-4 を恒常的に発現しているが、その意義については未だ明確になっていない。Treg における CTLA-4 分子の役割を明らかにするため、CTLA-4 発現マウス (Tg) および CTLA-4 欠損マウス (KO) の Treg および非抑制性細胞である CD25⁻T細胞につき検討した。CTLA-4Tg としてヒト CD2 プロモーターの下流に CTLA-4 の全長 (FL) あるいは細胞内領域を欠いた配列 (TL) の cDNA を挿入した発現ベクターを用いたマウスを確立した。FL 由来の CD25⁺T細胞 (FL25⁺) および CD25⁻T細胞 (FL25⁻) の CTLA-4 は正常 CD25⁺ (WT25⁺) と同程度に発現し、TL 由来の CD25⁺T細胞 (TL25⁺) および CD25⁻T細胞 (TL25⁻) の CTLA-4 は内在化が起こらないため、WT25⁺、FL25⁺あるいは FL25⁻と比較し数十倍高い発現がみられた。Treg の分化及び機能に重要とされる *Foxp3* 遺伝子の発現に対する CTLA-4 発現の影響を Real-time RT-PCR 法を用いて調べたところ、WT25⁺、FL25⁺、TL25⁺の間に量的な差は認められなかった。X線照射した脾臓細胞と抗 CD3 抗体を用いて刺激した正常 CD25⁻T細胞の増殖反応に対する Treg の抑制活性を CTLA-4Tg において検討したところ、CTLA-4 発現レベルと Treg の抑制活性に相関はなかった。幼弱 CTLA-4^{-/-}由来の CD25⁺CD4SP の抑制活性を検討したところ、*in vitro* で CTLA-4^{+/+}および CTLA-4^{+/-}の CD25⁺CD4SP と同等の抑制活性を示した。CD25⁻T細胞においては *Foxp3* 遺伝子の発現は誘導されず、FL25⁺が抑制活性を示さないことから、生理的なレベルの CTLA-4 発現では CD25⁻T細胞に抑制活性を誘導できないことが明らかになった。一方 TL25⁺は WT25⁺と同等の抑制活性を示し、高度に CTLA-4 を発現させると CD25⁻T細胞は抑制活性を示した。以上より CTLA-4 の発現レベルと *Foxp3* の発現および Treg の抑制活性は相関せず、生理的レベルの CTLA-4 発現では非抑制性 T細胞に抑制活性を誘導することが不可能であることより、*in vitro* での Treg の抑制機能において CTLA-4 は重要でないことが明らかとなった。質疑応答では、副査主査から紹介があった後、申請者はスライドを用いながら約 18 分に渡って学位論文内容の発表を行った。そ

の後、副査上出利光教授から、1) Treg 上のラフトあるいは免疫シナプスの形成における CTLA-4 の機能と、活性化 T 細胞におけるそれとの相違について、2) マウス CD2 プロモータではなく、ヒト CD2 プロモータを用いた理由、3) 解析意義があると考えられる他のコンストラクトの CTLA-4 トランスジェニックマウスの樹立について、4) CD25 陰性細胞に CTLA-4 が発現していることとプロモータの種類との関連についての質問があった。次いで副査小野江和則教授から、1) regulatory T cell の訳語について、2) 抗 CTLA-4 抗体による抑制阻害実験結果と本研究との相違点について、3) Treg の末梢性維持における CTLA-4 の役割および、自己反応性 T 細胞における CTLA-4 の役割について、4) 胸腺における Treg の分布についての質問があった。次いで主査小池教授から、1) Treg の抑制機構に関与する分子についての今後の研究方法について、2) 抗 CD3 抗体以外の刺激を用いた、*in vivo* の反応により近い Treg の抑制活性解析方法について 3) Treg の異常と全身性自己免疫疾患の発症との関連についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者はこれまでの文献的報告および実験結果を引用し、概ね適切に回答した。

この論文は、Treg の *in vitro* での抑制機能に関する CTLA-4 の役割について明らかにした点で高く評価され、今後の Treg の抑制機能解析の進展および自己免疫疾患の治療への臨床応用が期待される。

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。