

学 位 論 文 題 名

IL-6 and IFN- α from dsRNA-stimulated dendritic cells control expansion of regulatory T cells

(二本鎖 RNA により刺激された樹状細胞から放出される IL-6ならびに IFN- α は制御性 T 細胞の増殖に関与する)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell (Treg)は、自己免疫反応を抑制することで免疫学的自己寛容を維持し、また、外来微生物に対する生体反応の強弱を調節することが知られている。Treg の増殖ならびに機能は転写因子である forkhead/winged helix transcription factor (Foxp3) で規定される。naturally occurring Treg (nTreg)は胸腺由来であるのに対し、induced Treg (iTreg)は末梢組織で CD4⁺CD25⁻細胞から誘導される。

RNA virus 感染においては、樹状細胞 (dendritic cell: DC) が主たる役割を果たし、自然免疫ならびに獲得免疫を誘導する。マウス DC 上の pathogen-associated molecular pattern receptor である、Toll-like receptor (TLR)3, TLR7, TLR8, RIG-like receptor (RLR)はウイルス由来の RNA を認識するが、そのうち endosome に存在する TLR3 は double-stranded (ds)RNA を認識する。この認識により TIR-containing adaptor molecule (TICAM) -1 を介した signaling pathway が活性化され、type- I IFN や炎症性サイトカイン (IL-6, TNF- α など) が分泌される。

TLR は CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg にも発現していることが知られており、その刺激は Treg の増殖または／かつ機能に直接関与していることが既に指摘されている。しかしながら、dsRNA (TLR3 刺激) に対する Treg の反応は未だよくわかっていない。

今回我々は、合成 dsRNA である PolyI:C が Treg の増殖ならびに機能に如何に関与するかを検討した。

【材料と方法】

- ・ C57BL/6J マウスならびに IL-6, TICAM-1 ノックマウトマウスに対して PolyI:C 250 μ g または同量のリン酸緩衝生理食塩液 PBS を 2 日おきに 2 回腹腔内投与した。24 時間後、鼠径リンパ節と脾臓を摘出し、細胞数を算出すると共に FACS 解析により CD4⁺細胞ならびに CD4⁺Foxp3⁺細胞分画を評価した。

- ・ CD4⁺CD25⁺ Treg 細胞、CD4⁺CD25⁻細胞はマウス脾臓から MACS CD4⁺CD25⁺ Regulatory T cell Isolation Kit を用いて精製した。骨髓由来樹状細胞 BMDC はマウス骨髓細胞から recombinant granulocyte macrophage colony-stimulating factor を用いて誘導した。

- ・ 1×10^6 /ml に調整した BMDC に 50 μ g/ml の PolyI:C ないしは同量の PBS を添加し、24 時間培養し、培養上清中のサイトカインを市販の ELIZA キットにより測定した。

In vitro における Treg proliferation assay として、 5×10^4 Treg 細胞を丸底 96 well plate に $1 \mu\text{g/ml}$ 抗 CD3 抗体と 100IU/ml recombinant IL-2 と共に 2 日間培養した。BMDC との共培養系ではさらに 1×10^6 の BMDC を加えた。培養最後の 6 時間、 $[\text{H}]$ thymidine を加えて培養し、シンチレーターで取り込みを測定することで Treg 細胞の増殖を評価した。Treg suppression assay として、上記 Treg/BMDC 共培養系から再度 MACS により Treg 細胞を精製した。Mitomycin C で固定した脾細胞 (1×10^6) と $\text{CD4}^+ \text{CD25}^-$ 細胞 (responder) を共培養し、suppressor としての Treg を加えた。上記の如く $[\text{H}]$ の取り込みを測定することで Treg の抑制能を評価した。

【結果】

PolyI:C は in vivo, in vitro の両方において、BMDC 依存性に Treg を増加させた。Treg の増加には、BMDC 上の TICAM-1 と IL-6 が必要であった。PolyI:C 刺激によって BMDC から IL-6 と IFN- α が産生されるが、Treg の増殖に対し前者は正に働き、後者は負に働く。PolyI:C によって Treg の抑制機能が変化することはなかった。

【考察】

IFN- α は抗ウイルスサイトカインとして知られているが、Treg の増加を抑制することにより抗ウイルス作用を担っているのかもしれない。

我々の以前の報告によれば、 $\text{CD8}^+ \text{CD205}^+$ 脾臓由来 DC を用いた場合、外因性 TGF- β は $\text{Foxp3}^+ \text{CD25}^- \text{CD4}^+$ T 細胞を抗原特異性 Foxp3^+ Treg (iTreg) に誘導することがわかっている。このように、組織特異的な DC とある種のサイトカインが iTreg の誘導に関与しているのである。今回の BMDC を用いた我々の実験系とは区別する必要があるが、IL-6 と IFN- α が各々 nTreg の増殖を担っているのは興味深い。

IL-6 は様々な作用を持つ炎症性サイトカインであるが、nTreg と iTreg に対してはむしろ反対の作用をもたらす。LPS 刺激により IL-6 は IL-1 と協同して nTreg の増殖をもたらす。一方、iTreg は IL-17 分泌細胞 (Th17) との鏡面的 reciprocal なバランスの上に成り立っているが、IL-6 と TGF- β の 2 者により naïve T 細胞から Th17 への分化が誘導され、さらに IL-6 により nTreg は Th17 に誘導される。IL-6 は Treg ではなく Th17 の分化に大きく影響しているとされており、今回の我々の報告とは若干の違いがある。

我々の実験の結果では、Poly I:C は $\text{CD4}^+ \text{CD25}^-$ T 細胞を $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+ \text{Foxp3}^+$ Treg に誘導することはなかった。TGF- β は上記の如く iTreg の誘導に大事なサイトカインであるが、Poly I:C の腹腔内投与で血清濃度も上昇しなかったし、DC から分泌されることもなかった。したがって Treg の増殖を nTreg によるものか iTreg によるもののかを検討すべきであったが、in vivo においてその両者を区別する方法がなかったため今後の課題である。

TLR4 など、他の TLR リガンドが Treg の数と機能を制御していることがわかっている。TLR4 のリガンドである LPS は同様に TICAM-1 pathway を介することから本研究と同様の機序が関与しているかもしれない。

【結論】

IFN- α は BMDC を介して Treg の増殖を抑制することがわかった。IL-6 はその抑制を凌駕する作用があり、この 2 つのサイトカインによって Treg を制御することができれば抗 RNA ウイルス治療を大きく前進させることができるかもしれない。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 笠 原 正 典

副 査 教 授 瀬 谷 司

副 査 教 授 丸 藤 哲

副 査 教 授 今 村 雅 寛

学 位 論 文 題 名

IL-6 and IFN- α from dsRNA-stimulated dendritic cells control expansion of regulatory T cells

(二本鎖 RNA により刺激された樹状細胞から放出される IL-6ならびに IFN- α は制御性 T 細胞の増殖に関与する)

Foxp3⁺CD4⁺ regulatory T 細胞 (Treg) は自己免疫反応を抑制する T 細胞サブセットとして知られている。Treg は Toll like receptor (TLR) の刺激による制御を受ける。RNA ウイルス感染時に産生される double-stranded RNA (dsRNA) は TLR3 のリガンドであるが、この TLR3 シグナルを介した Treg の制御機構については詳細が明らかになっていない。本研究は合成 dsRNA (PolyI:C) を用いて Treg の免疫応答機序を解析した。PolyI:C の *in vivo* 投与により、脾臓/リンパ節の Foxp3⁺CD4⁺T 細胞が増加した。この効果は IL-6 KO マウス、TLR3 のアダプター分子である TICAM1 KO マウスにおいては認められなかった。*in vitro* においては PolyI:C は Treg に直接機能せず、樹状細胞 dendritic cell (DC) と Treg を共培養したときに Treg 数の増加を認めた。次に DC による Treg 制御機序を解析した。DC は PolyI:C に応答して様々な炎症性サイトカインや I 型 IFN を産生するが、DC が分泌する IL-6 により Treg 数が増加し、また IFN- α により減少した。最後に Treg を DC 存在下で Poly I:C、IL-6、IFN α 、IL-6+IFN α で刺激した後に Treg の抑制機能を評価したが、Treg の抑制機能は保たれていた。RNA ウイルス感染がおきている局所では IL-6 と IFN- α の相対的なバランスが、その部位における Treg 数を規定しており、それによってウイルス感染に対する免疫応答が効率よく働く可能性が示唆された。

以上の発表に対して、血液内科学分野今村教授より、骨髓系樹状細胞以外の細胞群の関与の可能性の有無について質問があった。申請者は、「形質細胞様樹状細胞については TLR3 が発現していないので今回の実験では考慮しなかったが、今後樹状細胞のみならず他の細胞群についても検討するべきである」との回答を行なった。

救急医学分野丸藤教授より、TICAM-1KO における IL-6 産生が完全に抑制されていない点、また、創薬についての可能性についての質問があった。申請者は「前者については RIG-I などの RLR を介する情報伝達経路が関与している可能性がある。後者については IRF-3 のリン酸化を抑制しないしは同物質の核内移行を抑制する薬剤の有効性が期待される」との回答をした。

続いて、免疫学分野瀬谷教授から、ヒト HCV 感染における Treg の増減についての質問がされた。申請者は「慢性 C 型肝炎患者では Treg の割合が多いとされており、IFN による治療によって Treg の数が変動している可能性があり、今後明らかにするべき課題である」との回答を行なった。

さらに、分子病理学分野笠原教授から、IL-6 と IFN- α による Treg 制御が感染や移植免疫、悪性腫瘍の各病態において、どういう意義を持つのか？との質問があった。申請者は「悪性腫瘍の患者において、予後と腫瘍局所における Treg は相関し、Treg が多いと予後が悪いことが報告されている。逆に sepsis モデルなどでは Treg の投与により予後が良くなることが報告されており、以上相反する報告が多数されている。したがって今後 Treg の増減が原因なのか、結果なのかを検討するとともに、生体内における抑制能ならびにその変化を評価するべきである。その上で Treg の数ならびに機能を制御することができれば、前述の病態の改善に寄与するであろう」と回答した。

この論文は、TLR3 刺激によって生体内で Regulatory T cell (Treg) が制御され、かつその制御には IL-6 と IFN- α が関与するというメカニズムを明らかにしたものとして高く評価され、今後の感染症治療、癌治療などに寄与すると期待される。

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。