

氏 名	や ぎ はる ひこ 八 木 治 彦
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2828 号
学位授与の日付	平 成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学位論文題目	Crucial role of <i>FOXP3</i> in the development and function of human CD25 ⁺ CD4 ⁺ regulatory T cells (ヒト CD25 陽性 CD4 陽性制御性 T 細胞の分化及び機能における <i>FOXP3</i> 遺伝子の重要な役割)
論文調査委員	(主 査) 教 授 三 森 経 世 教 授 淀 井 淳 司 教 授 松 岡 雅 雄

論 文 内 容 の 要 旨

【背景・目的】免疫学的自己寛容を維持する機構の一つとして、正常動物個体中に制御性 T (regulatory T, T_R) 細胞と総称される細胞集団が自然状態で存在し、自己反応性 T 細胞の活性化を能動的に抑制している事実が近年明らかにされてきた。T_R 細胞は移植・腫瘍免疫にも関与しており、動物モデルにおいて T_R 細胞の操作により移植免疫寛容や抗腫瘍免疫反応を誘導しうる。T_R 細胞はその大部分が CD25 (IL-2 受容体 α 鎖) 陽性の表現型をもち、末梢リンパ組織 CD4⁺T 細胞の約10%を占める。試験管内においては、CD25⁺CD4⁺T_R 細胞は T 細胞受容体 (TCR) 刺激下で他の T 細胞の活性化・増殖を細胞接触依存的に抑制し、それら自体は TCR 刺激に対して増殖応答・サイトカイン産生を呈さない。ヒトにおいても CD25⁺CD4⁺T 細胞、特にそのうち CD45RO⁺ の集団が、同様に制御性 T 細胞の形質を有する。

CD25⁺CD4⁺T_R 細胞が一つの細胞系譜としてその分化がプログラムされた集団であるかについてはこれまで不明であった。最近マウスにおいて、転写因子 Scurfin をエンコードする遺伝子 *Foxp3* が CD25⁺CD4⁺T_R 細胞の分化や抑制機能発現に重要な役割を担うことが示された。しかし、ヒト CD25⁺CD4⁺T_R 細胞における *FOXP3* 遺伝子の意義については未だ明らかにされておらず、ここに検討した。

【方法・結果】健常成人の末梢血単核球を用いた。第一に、各リンパ球分画における *FOXP3* mRNA 発現につき定量的 RT-PCR 法で、また蛋白発現につき Western blot 法で解析した。結果として、CD25⁺CD4⁺T_R 細胞に選択的に *FOXP3* の mRNA および蛋白発現がみられ、CD25⁺CD4⁺T 細胞および CD25⁻CD4⁺T 細胞に TCR 刺激を加えても、*FOXP3* の発現量に大きな変化はみられなかった。次に、ヒト T 細胞性白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) 感染 T 細胞は構成的に CD25 分子を発現するなど CD25⁺CD4⁺T_R 細胞に類似した形質を幾つか有することより、HTLV-1 感染 T 細胞における *FOXP3* mRNA および蛋白発現を検討した。その結果、幾種かの HTLV-1 感染 T 細胞に *FOXP3* 発現を認めた。

次に、レトロウイルスを用いてヒト CD25⁻CD45RO⁻CD4⁺ ナイーブ T 細胞に *FOXP3* を導入する系を構築した。*FOXP3* 導入 T 細胞の TCR 刺激に対する増殖応答・サイトカイン産生、および細胞表面マーカー発現につき、レポーター遺伝子のみを導入した T 細胞 (対照 T 細胞) と比較検討した。結果として、*FOXP3* 導入 T 細胞では対照 T 細胞に比して、TCR 刺激に対する増殖応答およびサイトカイン産生が抑制されており、CD25, CD45RO, CTLA-4, GITR など T_R 細胞に関連する分子の発現が亢進していた。さらに、*FOXP3* 導入 T 細胞または対照 T 細胞を、新たに調製した CD25⁻CD4⁺T 細胞と共培養しその抑制活性を評価したところ、*FOXP3* 導入 T 細胞は CD25⁻CD4⁺T 細胞の増殖を細胞接触依存的に抑制した。

【結論】ヒトにおいて、*FOXP3* は CD25⁺CD4⁺T_R 細胞に選択的に発現しその発現は活性化の影響を受けにくいこと、CD4⁺ ナイーブ T 細胞に *FOXP3* を導入することで CD25⁺CD4⁺T_R 細胞様の形質を有する細胞に転換されること、が示された。これらの結果より、ヒトにおいても *FOXP3* が CD25⁺CD4⁺T_R 細胞の分化および抑制機能発現におけるマスター制御遺伝子である可能性が示唆された。また、活性化の影響を受ける CD25 分子に比して、*FOXP3* はより特異性の高い T_R

細胞のマーカーであることが示された。これらに基づき、*FOXP3* 導入による「オーダーメイド」制御性 T 細胞を用いた免疫寛容の導入、*FOXP3* 発現の定量を介した免疫抑制状態の評価など、新たな免疫学的治療、診断法の開発が期待される。

論文審査の結果の要旨

本論文は、ヒト制御性 T (T_R) 細胞の分化及び機能において、*FOXP3* 遺伝子が重要な役割を担うことを示したものである。

個体中には $CD25^+CD4^+$ の表現型をもつ T_R 細胞が存在し、自己免疫応答、さらには腫瘍免疫や移植・母児免疫にも関与している。近年動物での検討で、転写因子 *Foxp3* 遺伝子が T_R 細胞のマスター制御遺伝子であることが示されつつある。

申請者らは、ヒトにおける *FOXP3* の定量・操作を介した新たな免疫学的診断・治療法の開発の端緒として、ヒト T_R 細胞の分化及び機能における *FOXP3* の意義について検討した。

第 1 に、末梢血リンパ球における *FOXP3* 遺伝子・蛋白発現につき解析した。ヒトでは $CD25^+CD4^+T$ 細胞は $CD45RO^+$ の T_R 細胞分画と $CD45RO^-$ の活性化・非制御性 T 細胞分画が存在し、*FOXP3* は $CD25^+CD4^+CD45RO^+$ の T_R 細胞に特異的かつ安定に発現することを示した。一方、非制御性 T 細胞では刺激にても *FOXP3* 発現が誘導されないことを示した。また、*CD25* を構成的に発現するなど T_R 細胞と類似した免疫学的形質を呈する HTLV-1 感染 T 細胞においても、幾種かの細胞株が *FOXP3* を発現していることを明らかにした。

第 2 に、ヒト末梢 $CD4^+$ ナイーブ T 細胞に *ex vivo* で *FOXP3* 遺伝子を導入することにより T_R 細胞様の形質をもつ細胞に転換されることを、その反応性、細胞表面マーカー、増殖抑制能の解析により示した。

これらの結果より、*FOXP3* 遺伝子がヒト T_R 細胞の分化及び機能において重要な役割を担うこと、また、*FOXP3* は特異性の高い T_R 細胞のマーカーであること、が強く示唆された。

以上の研究は、ヒト T_R 細胞の分化及び機能の分子メカニズムの解明に貢献し、さらに、*FOXP3* 発現の定量を介した免疫抑制状態の評価など、新たな免疫学的診断・治療法の開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 17 年 1 月 20 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。