

主論文の要約

**CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup> regulatory T cells contain clonally expanded cells with identical CDR3 sequences of the T cell receptor  $\beta$  chain**

〔 CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>制御性 T 細胞は、単一の CDR3 配列を使用する T 細胞受容体  $\beta$  鎖を持つ、クローン性に増殖した細胞を含む 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 健康社会医学専攻

発育・加齢医学講座 小児科学分野

(指導：小島 勢二 教授)

奥野 友介

## 【緒言】

制御性 T 細胞は、他の免疫系の細胞が、自己を攻撃したり、攻撃対象に過剰に反応したりしないように、抑制している細胞である。最も有名なものは CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> 制御性 T 細胞である (Methods Mol Biol. 2011; 707:3) が、他の制御性 T 細胞も存在する (Hum Immunol. 2008; 69:715)。

当研究室は、CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>制御性 T 細胞を同定した。マウスにおいて、この細胞が欠落すると、他の T 細胞が異常活性化し、致死的な自己免疫反応が引き起こされる (J Exp Med 2004; 200:1123)。つまり、CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>制御性 T 細胞は、他の T 細胞が自己に被害を与えることを抑制する、重要な細胞である。その機能分子として、インターロイキン 10(IL-10)が重要であることを報告している (J Immunol. 2005;175:7093)。

T 細胞の機能を解析する上で、その T 細胞受容体(T cell receptor; TCR)が認識する、標的抗原を同定することが重要である。その T 細胞が何を標的として機能するのかを、直接的に知ることができる。

今回の研究の目的は、CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>制御性 T 細胞が認識する標的抗原を同定する前段階として、この細胞に特徴的に使用されている TCR を同定することである。TCR が同定されれば、TCR の認識する標的抗原の解析を進めることができる。

## 【対象及び方法】

C57BL/6 マウスにおいて検討を行った。フローサイトメトリーには、TCR の各 V $\beta$  領域に特異的な抗体を用いた。試験管内の IL-10 産生能の測定は、セルソーターにて分取した細胞を、培養プレート底面にコーティングされた抗 CD3 抗体で 48 時間刺激し、培養上清の IL-10 を、ELISA にて測定した。CDR3 配列の決定には、各細胞由来の cDNA を V $\beta$  13 に特異的なプライマーと、C 領域に特異的なプライマーを用いて PCR 増幅し、TA クローニング法により単離して、それぞれの配列を決定した。

## 【結果】

今回の研究を進めるに先立って、我々は、CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>細胞の亜集団を規定する分子マーカーとして、CD49d(Integrin alpha 4 chain)を検討していた。CD49d は、CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>細胞内に、CD49d<sup>low</sup>、CD49d<sup>high</sup> という 2 つの亜集団を規定する (図 1-A)。これらのうち、CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>CD49d<sup>low</sup> 細胞は機能分子である IL-10 をわずかしか産生せず、CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>CD49d<sup>high</sup> 細胞は比較的高い量の IL-10 を産生した (図 1-B)。以上の結果から、CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>CD49d<sup>high</sup> 細胞が真の制御性 T 細胞である可能性が考えられた。以下の検討においては、CD8<sup>+</sup>細胞を、CD8<sup>+</sup>CD122<sup>-</sup>細胞、CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>CD49d<sup>low</sup> 細胞、CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>CD49d<sup>high</sup> 細胞と 3 群に分け、それぞれを比較した。

TCR は  $\alpha$  鎖、 $\beta$  鎖からなる 2 量体であり、今回は、より解析のしやすい  $\beta$  鎖を解析した。TCR  $\beta$  鎖の可変領域は、遺伝子上の、24 種類の V 領域と、2 種類の D 領域、14 種類の J 領域から 1 つずつが選ばれ、再構成されることにより形成される。CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>CD49d<sup>high</sup> 細胞と、他の T 細胞における、V 領域の使用頻度の違いを検

討した(図 2)。脾臓においては、有意な差は認められなかった。腸間膜リンパ節においては、CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>CD49d<sup>high</sup>細胞において特徴的に、第 13 番の V 領域(Vβ 13)を使用する細胞が多いことがわかった(p < 0.01)。これは、Vβ 13 を使用する TCR の中に、CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>CD49d<sup>high</sup>細胞に特徴的な TCR が含まれる可能性を示唆する。

Vβ 13 を使用する CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>CD49d<sup>high</sup>細胞に、特徴的な TCR が存在するかを検討した。TCR 遺伝子の中でも最も多様性が生じる部位が、Complementarity-determining region 3(CDR3)領域であるが、この領域の塩基配列を、TA クローニング法により検討した。T 細胞の中に、ある 1 つの TCR を持つ細胞集団が大量に含まれていれば、相同の CDR3 配列が何度も得られることになる。CD8<sup>+</sup>CD122<sup>-</sup>細胞、CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>CD49d<sup>low</sup>細胞、CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>CD49d<sup>high</sup>細胞のそれぞれについて、100 個ほどの配列を解析した(表 1)。CD8<sup>+</sup>CD122<sup>-</sup>細胞では、41 個の解析できた CDR3 配列のうち、2 個が相同であった。CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>CD49d<sup>low</sup>細胞では、56 個のうち、2 個が相同という CDR3 配列が、3 組得られた。CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>CD49d<sup>high</sup>細胞では、61 個のうち、2 個が相同という CDR3 配列が 6 組、それに加えて 5 個が相同の CDR3 配列が 1 組見られた。同じ CDR3 配列が 5 回出現したということは、統計学的に有意な頻度であり(p=0.016)、CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>CD49d<sup>high</sup>細胞の中に、特徴的な TCR をもつ細胞集団が存在することが示された。この CDR3 配列を、Vβ 13-C12 と命名した。Vβ 13-C12 は、CD8<sup>+</sup>CD122<sup>-</sup>細胞、あるいは CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>CD49d<sup>low</sup>細胞においては検出されなかった。

### 【考察】

今回の研究では、CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>という分子マーカーに加えて、CD49d という分子マーカーを用いながら、CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>制御性 T 細胞の TCR の特徴を解析した。真の制御性 T 細胞と思われる CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>CD49d<sup>high</sup>細胞の TCR β 鎖において、Vβ 13 の使用頻度が他の細胞群と異なることが判明した。CDR3 領域の遺伝子配列を検討した結果、その中に特定の TCR を持つ T 細胞集団が存在することが示された。この TCR β 鎖の CDR3 配列(Vβ 13-C12)は、CD8<sup>+</sup>CD122<sup>-</sup>細胞や、CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>CD49d<sup>low</sup>細胞においては検出されなかった。以上のことから、Vβ 13-C12 で規定される TCR β 鎖が、CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>CD49d<sup>high</sup>細胞に特徴的であるということが明らかになった。

Vβ 13 の使用頻度は、脾臓においては各細胞群に差は認められず、腸間膜リンパ節においてのみ、有意な差が認められた。脾臓と比較すれば、腸管は常に腸内細菌という異物にさらされており、免疫系の主要な活動の場の一つである。そこで活性化した T 細胞が異常な攻撃を行わないよう、腸管に付属したリンパ節において、CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>制御性 T 細胞が活発に活動しているのかもしれない。

### 【結語】

今回の研究の範囲で得られた結果は、明らかに、CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>制御性 T 細胞の標的抗原の同定への段階を進めるものである。引き続き研究によって、CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>制御

性 T 細胞の標的抗原を明らかにし、その作用機構を解明することができると考えられる。