

主論文の要旨

CD8⁺CD122⁺CD49d^{low} regulatory T cells maintain T-cell homeostasis by killing activated T cells via Fas/FasL-mediated cytotoxicity

〔 CD8⁺CD122⁺CD49d^{low} 制御性 T 細胞は Fas/FasL 経路を介して
活性化 T 細胞を傷害することで T 細胞の恒常性を維持する 〕

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)

赤根 和之

【緒言】

バクテリアやウイルス感染に対する免疫反応においては、病原体排除後、適切に免疫反応が収束することは極めて重要なことである。その場合に活性化した T 細胞自らが鎮静化したり死んだりすることもあるが、他の細胞が活性化 T 細胞に働きかけて活動を鎮めることもあり、結果として T 細胞の恒常性が維持される。この様な働きを担う細胞集団の一つとして CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞があり、その機能を担う代表的な分子として CTLA-4 がある。われわれは、また別の免疫制御を担う細胞集団として CD8⁺CD122⁺制御性 T 細胞を同定しその解析を進めてきた。これまでの研究により CD8⁺CD122⁺T 細胞分画に制御性 T 細胞が多く含まれることが分かっていたが、ここには多くのメモリー T 細胞も含まれており、これらを除外し、CD8⁺制御性 T 細胞を濃縮できる細胞表面マーカーが必要であった。さらに CD8⁺CD122⁺制御性 T 細胞の免疫制御作用を担う機能分子として IL-10 を考えていたが、CD8⁺CD122⁺T 細胞が分泌する IL-10 は CD4⁺T 細胞など他のリンパ球と比較しても少量であり、IL-10 を欠失した細胞もある程度の制御活性を持つことから、IL-10 はこの制御性 T 細胞の制御作用に必須ではなく、IL-10 以外の機能分子の存在が考えられた。このような中で本研究では CD8⁺制御性 T 細胞をより厳密に定義できる細胞表面マーカーの探索と、同制御性 T 細胞による免疫制御の分子メカニズムとその機能分子の探索を目的として研究を行った。

【対象及び方法】

C57BL/6 マウス (CD45.2/CD45.2) とその CD45 コンジェニック系統 C57BL/6(CD45.1/CD45.1)マウス、Rag-2KO(ノックアウト)マウス、Fas 変異マウスである *lpr* マウス、FasL 変異マウスである *gld* マウス (いずれも 6-8 週齢で C57BL/6 を遺伝的背景とする) を用いて実験を行った。細胞表面マーカーである CD122, CD49d, CD62L に対する抗体を用いて CD8⁺T 細胞の各種細胞分画をセルソーターにて分取し、T 細胞受容体刺激下に 24 時間単独培養し、その後共培養を行い 24 時間ごとに細胞割合、分裂回数等を解析する *in vitro* 実験を行った。さらに Rag-2KO マウスに、naïve CD8⁺T 細胞と CD8⁺CD122⁺CD49d^{low}T 細胞とを共移入する実験系を構築し、マウスの生存率を解析する *in vivo* 実験を行った。本研究は名古屋大学動物実験委員会の承認を得て行った。

【結果】

CD8⁺CD122⁺T 細胞は CD49d^{high} と CD49d^{low} 分画に分けられ (Figure 1a)、これらと naïve CD8⁺細胞との共培養を行った。すると 72 時間後には CD49d^{low} 分画と共培養した場合のみ naïve CD8⁺の細胞割合が著しく減少していた (Figure 1b,c)。この現象は、naïve CD8⁺細胞と CD122⁺CD49d^{low}細胞との増殖スピードの差が著しく、naïve CD8⁺細胞と CD122⁺CD49d^{high}細胞との場合にはそれほどでもない、といったことには起因しない。なぜなら、CD122⁺CD49d^{low}細胞と CD122⁺CD49d^{high}細胞の増殖速

度は、ほぼ同じだからである (Figure 1d)。naïve CD8⁺ T 細胞を Fas 変異マウスである *lpr* マウス由来のものに変更したところ、この細胞割合の減少効果は見られなかった (Figure 2a.b)。これは野生型マウス由来と *lpr* マウス由来の naïve CD8⁺ T 細胞とでは増殖速度に違いがあるからではないかとも考えられたため、それぞれを単独培養し、細胞数を絶対値で測定したが、この二つの細胞集団の間には有意な差は見られなかった (Figure 2c)。続いて CFSE にて両 naïve CD8⁺ T 細胞の分裂回数を比較したところ、両者の間には明らかな差は見られなかった (Figure 2d)。次に naïve CD8⁺ T 細胞と CD8⁺CD122⁺CD49d^{low} T 細胞、あるいは CD8⁺CD122⁺CD49d^{high} T 細胞と共培養した系において Fas/FasL signaling の下流にある caspase-8 の活性化を測定した。すると CD8⁺CD122⁺CD49d^{low} T 細胞と共培養した場合のほうが CD49d^{high} T 細胞と共培養した場合に比べて、naïve CD8⁺ T 細胞では明らかに caspase-8 の活性化した細胞が多かった (Figure 2e) これらの結果から、CD49d^{low} 細胞が naïve CD8⁺ T 細胞に及ぼす細胞数減少効果は細胞分裂回数の抑制ではなく、アポトーシス誘導による細胞傷害であることが考えられた。

さらに CD49d^{low} 細胞分画を *gld* マウス由来のものに変更したところ、明らかに CD49d^{low} 細胞が naïve CD8⁺ T 細胞に及ぼす細胞数減少効果は減弱していた (Figure 3a.b)。 *in vitro* 実験の結果を総合的に解釈すると、CD8⁺CD122⁺CD49d^{low} 細胞は、標的細胞である活性化した naïve CD8⁺細胞に Fas/FasL を介してアポトーシスを誘導し、数を少なくさせていると考えられた。

次に Rag-2KO マウスに naïve CD8⁺ T 細胞と解析対象とする細胞を共移入する実験系を用いて、CD8⁺CD122⁺CD49d^{low} T 細胞の *in vivo* における効果を検討した。naïve CD8⁺ T 細胞のみ、あるいは naïve CD8⁺ T 細胞を CD8⁺CD122⁺CD49d^{high} T 細胞と共移入すると、マウスは 100 日前後でほぼすべて死ぬが、CD8⁺CD122⁺CD49d^{low} T 細胞と共移入すると生存期間が延長した (Figure 4a)。

さらに naïve CD8⁺ T 細胞を野生型マウス由来のものではなく *lpr* マウス由来のものに変更しても CD8⁺CD122⁺CD49d^{low} T 細胞移入による生存期間延長効果は減弱していた (Figure 4b)。同様に CD8⁺CD122⁺CD49d^{low} T 細胞を野生型由来から *gld* マウス由来のものに変更すると野生型の場合と比較して生存期間延長効果が減弱した (Figure 4c)。

【考察】

naïve CD8⁺ T 細胞と共培養した結果、CD8⁺CD122⁺CD49d^{low} T 細胞のみが、naïve CD8⁺ T 細胞の細胞割合を著しく減少させたことから、この細胞分画が CD8⁺制御性 T 細胞をより濃密に含んでいると考えられた。さらに *gld* あるいは *lpr* マウス由来の細胞を用い、細胞間相互作用の Fas/FasL 経路を遮断することで、抑制作用に減弱が見られたことから、CD8⁺制御性 T 細胞はその抑制作用において Fas/FasL 経路が重要な働きを担っていることが推察された。

更に共培養の実験系において抑制作用が観察される CD8⁺CD122⁺CD49d^{low} T 細胞

は、naïve CD8⁺ T 細胞と共培養すると、naïve CD8⁺ T 細胞にアポトーシスに関与する caspase-8 の活性化を誘導することから、これらの抑制作用は Fas/FasL 経路を介したアポトーシス誘導作用によるものであると考えられた。

In vivo の実験系においても、CD8⁺CD122⁺CD49d^{low}T 細胞の生存期間延長効果が Fas/FasL 経路を遮断することで低下することから、生体内においても Fas/FasL 経路を介した CD8⁺CD122⁺CD49d^{low}T 細胞による免疫制御作用は有効に機能すると考えられた。

【結論】

以上の *in vivo*, *in vitro* 双方の実験結果から、CD8⁺制御性 T 細胞すなわち CD8⁺CD122⁺CD49d^{low}T 細胞は、Fas/FasL 経路を介して活性化 T 細胞をアポトーシスに導くことで、T 細胞の恒常性を維持することが示された。