
ヒト T 細胞の成熟に伴う
スーパー抗原性外毒素に対する反応性の推移

(研究課題番号 16590372)

平成16年度～平成18年度 科学研究費補助金
(基盤研究 (C)) 研究成果報告書



平成19年3月

東京女子医科大学医学部 助手
藤巻 わかえ



緒言

黄色ブドウ球菌が産生する代表的なスーパー抗原性外毒素 (toxic shock syndrome toxin-1, TSST-1) は、成人では toxic shock syndrome (TSS) を起こし、新生児では neonatal TSS-like exanthematous disease (NTED) を起こす。両疾患の病態はともにスーパー抗原性外毒素による過剰な T 細胞の活性化作用によるが、病像はかなり異なり、成人では重篤で新生児では予後良好である。病像の差は、年齢による T 細胞の反応性の差、つまり宿主側の因子によると考えられる。新生児ではこの他にも種々の感染症での病像や免疫応答性が成人とは大幅に異なっていることが知られている。さらに、幹細胞移植で臍帯血が用いられており、graft-versus-host disease (GVHD) の発症率が骨髄移植とは異なることが知られており、新生児期の免疫担当細胞の特異性が窺われる。以上より、臍帯血の免疫学的特性を明らかにすることは、細胞の成熟過程を明らかにするという免疫学的な問題の理解にとどまらず、新生児期における感染症の病態の理解や治療の向上、さらに臍帯血移植における諸問題の解決に重要であると考えられる。

ヒトの T 細胞は CD4 と CD8 に大別され、さらに naïve と memory,

Th/c1 と Th/c2 といった反応性の異なる細胞群に分類される。最近では免疫反応を強く抑制制御する CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞が注目されている。当然のことながらこれらの細胞群の役割は異なる。一方、T 細胞の成熟過程として、ヒト個体が幼若な新生児期に T 細胞が胸腺から末梢リンパ組織に移行して胸腺外成熟する。つまり、成熟した胸腺細胞は末梢血に流出すべく準備されたもっとも未熟な T 細胞であり、続いて臍帯血、乳幼児の末梢血の順に成熟すると考えられる。以上より、いろいろな種類の細胞の反応性が、さらにその成熟度とともに機能的に変化し、これらの各細胞群間の相互作用が生体のトータルとしての免疫応答を形作っていると考えられる。

我々は先に述べたように、新生児の感染防御機構や免疫反応性の特異性を明らかにすることを最終目的として、成熟度の異なるヒト T 細胞（胸腺細胞、臍帯血、成人末梢血）を用いて、各種細胞の反応機構の違いを検討してきた。現在までに、生物学的反応性やシグナルの伝達機構について、数々の知見を報告してきた。本研究期間においては、CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞に焦点をあて、その成熟過程を明らかにするとともに、成熟度により isotype に変化がみられる C45 分子や、C45 分子に会合する分子で多彩な機能を示す CD26 分子の挙

動を検討した。

本報告書においては、本研究の期間にわれわれが明らかにしたヒト制御性T細胞の成熟過程について報告した。

研究組織

研究代表者： 藤巻わかえ（東京女子医科大学・医学部・助手）

研究分担者： 内山竹彦（東京女子医科大学・医学部・教授）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成16年度	1800	0	1800
平成17年度	1000	0	1000
平成18年度	700	0	700
総計	3500	0	3500

研究発表

1. Yagi J, Uchiyama T, et al: Genetic background influences Th cell differentiation by controlling the capacity for IL-2-induced IL-4 production by naive CD4⁺ T cells. *Int Immunol* 18(12):1681-90, 2006.
2. Miki M, Uchiyama T, et al: A severe case of neonatal toxic shock syndrome-like exanthematous disease with superantigen-induced high T cell response. *Pediatr Infect Dis J.* 25(10):950-2, 2006.
3. Kobayashi H, Uchiyama T, et al: Safety profile and anti-tumor effects of adoptive immunotherapy using gamma-delta T cells against advanced renal cell carcinoma: a pilot study. *Cancer Immunol Immunother.* 56(4):469-476, 2006.
4. Miyoshi-Akiyama T, Uchiyama T, et al: Use of DNA arrays to identify a mutation in the negative regulator, *csrR*, responsible for the high virulence of a naturally occurring type M3 group A streptococcus clinical isolate. *J Infect Dis.* 193(12):1677-84, 2006.
5. Fukada K, Uchiyama T, et al: CD28 is required for induction and maintenance of immunological memory in toxin-reactive CD4⁺ T cells *in vivo*. *Cell Immunol.* 238(2):103-12, 2005.
6. Papageorgiou AC, Uchiyama T, et al: Expression, purification and crystallization of *Streptococcus dysgalactiae*-derived mitogen. *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun* 62(Pt3):242-4, 2006.
7. Miyoshi-Akiyama T, Uchiyama T, et al: Cytocidal effect of *Streptococcus pyogenes* on mouse neutrophils *in vivo* and the critical role of streptolysin S. *J Infect Dis.* 192(1):107-16, 2005.

8. Nakagawa S, Uchiyama T, et al: Specific inhibitory action of anisodamine against a staphylococcal superantigenic toxin, toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1), leading to down-regulation of cytokine production and blocking of TSST-1 toxicity in mice. *Clin Diagn Lab Immunol.* 12(3):399-408,2005.
9. Fujimaki W, Uchiyama T, et al: The effects of fluorescent lamp coated with a photocatalyst film on the number of floating microorganisms or smell molecules in a room installed with the lamp. *Kansenshogaku Zasshi.* 78(7):588-96, 2004.
10. Ohnishi A, Fujimaki W, Uchiyama T, et al: Polarization of human CD4⁺ T cells to T-helper type 1 and type 2 cells by superantigen stimulation. *Journal of Tokyo Women's Medical University* 174:147-156, 2004
11. Koyanagi M, Uchiyama T, et al: Immunologic immaturity, but high IL-4 productivity, of murine neonatal thymic CD4 single-positive T cells in the last stage of maturation. *Int Immunol.* 16(2):315-26, 2004
12. Arimura Y, Uchiyama T, et al: Akt is a neutral amplifier for Th cell differentiation. *J Biol Chem.* 279(12):11408-16, 2004.

研究成果

以下に研究成果の総括と主たる発表論文をまとめた。

1. 研究成果の総括

1) 成熟度の異なるヒト CD25⁺CD4⁺制御性T細胞を用いた検討

T細胞は胸腺内で分化成熟して末梢血へ流出する。我々は、分化成熟したヒト胸腺T細胞は成人末梢血T細胞に比べて、スーパー抗原性外毒素に対して非常に低反応で機能的に未熟であること、また臍帯血T細胞は、胸腺T細胞と成人末梢血T細胞の中間的な反応性を示すことをすでに報告した。さらに、T細胞の活性化には、CD45によるLckの活性化が重要であること、そして、機能的に未熟である成熟胸腺細胞においては、両分子の物理的乖離によりLckが活性化されず、免疫寛容状態が維持されていることを報告した。以上により、conventional T cellsに胸腺外成熟の過程があると考えられた。

本研究期間においては、CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞に焦点をあてて、成熟度の異なる細胞系（ヒト胸腺、臍帯血、成人末梢血）の phenotype や機能を検討し、conventional T cells と同様の胸腺外成熟の有無を検討した。臍帯血由来の制御性 T 細胞は多くが naive type で FOXP3 弱陽性であり、胸腺細胞と成人末梢血由来の制御性 T 細胞に比べて機能が低下していた。成人末梢血中では従来報告されていた memory type が比較的多く、FOXP3 強陽性の細胞群を含み、十分な機能を有していた。しかしながら、成人末梢血の中には臍帯血に類似した naive type の制御性 T 細胞も存在し、成人末梢血の memory type と臍帯血由来の制御性 T 細胞の中間的な機能を有することが明らかとなった。FOXP3 蛋白の発現も、機能の低下に応じて発現も比較的弱かった。胸腺細胞では成人末梢血と同様に memory type と naive type の制御性 T 細胞が存在し、双方ともに十分な FOXP3 蛋白発現を示した。一方、臍帯血由来の制御性 T 細胞を刺激増殖すると、成人末梢血や胸腺細胞の制御性 T 細胞にも増して非常に強い機能を獲得し、相応して naive type から memory type への移行と FOXP3 蛋白発現の強い増強がみられた。成人末梢血も培養により同様の変化を示したが、その変化は臍帯血に比して軽微であった。胸腺細胞もまた軽度

の機能亢進と FOXP3 蛋白増強を示したが、CD45 isotype の変化は逆であったことが特徴的であり、memory type から naive type への移行が観察された。

以上より、胸腺細胞、臍帯血、成人末梢血への制御性 T 細胞の成熟過程において、FOXP3 や CD45 isotype の変化に伴う一連の流れが存在することが明らかになった。臍帯血が十分な潜在的機能を有しながらも見かけ上の機能低下を示すのは、出産という materno-fetal tolerance の破綻に関係していることが推測された。

2) ヒト CD25⁺CD4⁺T 細胞における CD26 分子の検討

CD26 分子は 110Kda の膜蛋白質であり、T 細胞の活性化に伴いその発現は増大する活性化抗原である。その機能の多彩さはすで知られており、dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) 酵素として種々の生理活性タンパク質 (TNF- α , IL-1 β , IL-2, RANTES, CXCL12/SDF-1 α , etc.) を分解する作用、ヒト T 細胞共刺激分子としてシグナル伝達を担う作用、adenosine deaminase (ADA) や fibronectin などを接着する作

用などがある。興味深いことに、この CD26 分子は成人末梢血と臍帯血の T 細胞に対する attitude が異なっており、成人末梢血では CD45R0 と会合してシグナルを正に伝えるが、臍帯血では CD45RA に会合してシグナル伝達が抑制されることが報告され、臍帯血の抗原に対する低反応性に、この CD26 分子が関わっていることが示唆された。このことから、制御性 T 細胞の抑制作用についても CD26 分子が関わっている可能性が考えられたので、制御性 T 細胞における CD26 分子の表現や機能を検討した。

フローサイトメーターを用いた多重染色による解析では、成人末梢血における制御性 T 細胞は、CD26 分子の発現が、陽性と陰性の 2 群に分けられた。ただし、陽性の群においても、その発現強度は中程度であり、いわゆる活性化 T 細胞にみられるような強発現は認められなかった。興味深いことに、CD26 分子は、CD45RA⁺タイプの制御性 T 細胞に発現しており、RA⁺から R0⁺への CD45 isotype の移行に遅れてその発現を失った。前述した制御性 T 細胞の成熟過程からすると、memory type の制御性 T 細胞の一部が、機能的に最も成熟した制御性 T 細胞であると思われるので、その意味では、CD45R0⁺ CD26⁻ type の制御性 T 細胞が、最も成熟していることになる。臍帯血の制御性 T

細胞は、多くが naïve type で機能的に未熟であることは前述したが、CD26 分子もまた多くが発現していたことから、「CD45R0⁺ CD26⁻ type の制御性 T 細胞が最も成熟している」との仮定に矛盾しない。

今後、CD26 分子が制御性 T 細胞の成熟過程や機能発現にどのように関与しているのかを検討する必要がある。最終的に論文報告を行うまでにはいましばらくの研究が必要であると考えている。

2. 主たる論文

以下別紙