

161. 末梢由来制御性 T 細胞の恒常性における CD28 の役割

若松 英

Key words : CD28 シグナル, 制御性 T 細胞,
末梢由来制御性 T 細胞, 細胞増殖

東京理科大学 生命医科学研究所
免疫生物学部門

緒 言

制御性 T 細胞 (regulatory T cell: Treg) は末梢での免疫寛容および免疫応答の恒常性に重要な役割を果たしている。Treg は転写因子である Foxp3 を発現している。Foxp3 の欠損は Treg の機能不全が起これば自己免疫疾患を引き起こすことから、Treg のマスター転写因子として考えられている。生体内で Treg は分化過程によって胸腺由来 Treg (thymus-derived Treg: tTreg) と末梢由来 Treg (peripherally derived Treg: pTreg) に分類される。pTreg は特に腸管に豊富に存在することが知られている。T 細胞上の CD28 分子と抗原提示細胞上の CD80/CD86 が結合することで T 細胞に活性化補助シグナルが惹起される。このシグナルは T 細胞受容体からのシグナルを増強し、エフェクター T 細胞 (conventional T cell: Tconv) の細胞増殖および IL2 産生を誘導する。CD28 シグナルは Tconv の活性化だけでなく、tTreg の胸腺での分化に重要な役割を果たしている。近年では、tTreg の末梢リンパ組織および皮膚などの末梢組織での維持にも CD28 シグナルが寄与していることが報告されている。我々は、以前マイクロアレイ解析を用いて、CD28 シグナルが Tconv と Treg の transcriptome に与える影響について比較検討を行った。その結果、Tconv と Treg では CD28 シグナルによって異なった転写プログラムが惹起されることが明らかとなった¹⁾。これらのことから、CD28 シグナルは細胞によって異なった影響を及ぼす可能性が考えられる。上記したように、CD28 シグナルが tTreg の分化および維持に重要な役割を果たしていることが明らかとなっているが、pTreg における CD28 シグナルの役割は十分には理解されていない。また、Treg 間において、CD28 シグナルが同様の影響を及ぼすかも不明である。本研究では、pTreg における CD28 シグナルの役割を明らかにし、細胞間での CD28 シグナルによる影響の類似性と相違性の理解を目的とした。

方法および結果

1. CD28 欠損マウス腸管に pTreg は豊富に存在する

pTreg における CD28 シグナルの役割を明らかにするために、我々は CD28 欠損マウスにおける pTreg の解析を行った。tTreg は特異的に Helios 分子を発現しているため、Helios の発現を指標に pTreg (CD4⁺Foxp3⁺Helios⁻) の検出を行った。過去の知見と一致して、CD28 欠損マウスの脾臓、末梢リンパ組織、および腸管で tTreg が顕著に減少していた (図 1 A, B)。tTreg と同様に、CD28 欠損マウスの脾臓、末梢リンパ節で顕著に pTreg が減少していた。しかし、興味深いことに、野生型と同様に、CD28 欠損マウス小腸、および大腸において、pTreg が豊富に存在していた。腸管は pTreg の分化が促進されやすい臓器と知られているため、CD28 シグナルは pTreg の分化には必要ではない可能性が考えられる。一方で、CD28 欠損マウスの末梢リンパ組織で pTreg が減少していたことから、pTreg の維持に CD28 シグナルが必要である可能性が考えられた。

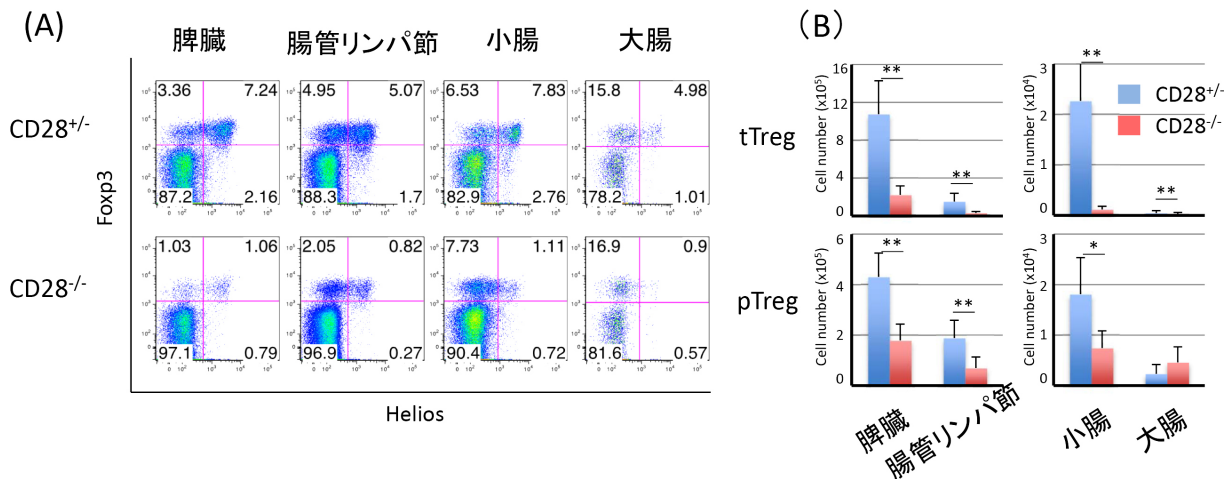


図1. CD28 欠損マウス腸管にも末梢由来 Treg は豊富に存在する.

(A) CD28^{+/-}マウスと CD28^{-/-}マウス脾臓, 腸管リンパ節, 大腸における CD4⁺T 細胞中の Treg の割合. (B) 各組織における tTreg (CD4⁺Foxp3⁺Helios⁺) および pTreg (CD4⁺Foxp3⁺Helios⁻) の細胞数. Error bar: SD. *p < 0.05. **p < 0.01, Student t-test.

2. pTreg の分化は CD28 シグナルを必要としない

CD28 欠損マウスの腸管に pTreg が豊富に存在したことから, CD28 シグナルが pTreg の分化に必要とされない可能性が考えられた. そのため, 我々は pTreg 分化における CD28 シグナルの要求性について検討するため, CD28 欠損マウス由来のナイーブ CD4⁺T 細胞 (CD4⁺Foxp3⁻CD44^{int}) を Rag2 欠損マウスに移入した. 図2に示したように, 野生型マウス由来のナイーブ CD4⁺T 細胞から分化した pTreg は腸管だけでなく, 脾臓でも検出された. 野生型と同様に, CD28 欠損ナイーブ CD4⁺T 細胞からも pTreg が分化しており, 分化の割合は野生型と比較して顕著に多かった. これらの結果から, tTreg と異なり, pTreg の分化には CD28 シグナルは必須ではなく, むしろ抑制的に作用している可能性が示唆された.

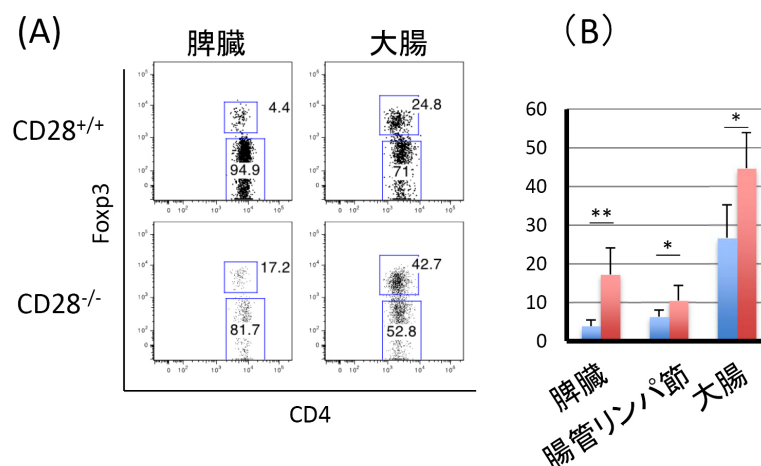


図2. 末梢由来 Treg 分化は CD28 を必要としない.

Foxp3^{EGFP} CD28^{+/+}マウス, および Foxp3^{EGFP} CD28^{-/-}マウスから単離された CD4⁺EGFP⁻CD44^{int} 細胞は Rag2 欠損マウスに移入された. Rag2 欠損マウスに移入後に分化した pTreg の割合. (A) 脾臓と大腸の代表的な FACS plot. (B) 分化した pTreg の割合の平均値. Error bar: SD. *p < 0.05. **p < 0.01, Student t-test.

3. CD28 欠損マウスにおける pTreg の減少は CD28 の内因性欠損が原因である

CD28 欠損 Tconv は IL2 産生能が顕著に低下していることが知られている。IL2 は Treg の増殖を促進するため、CD28 欠損マウスにおいて pTreg が減少している原因として IL2 の供給量の低下が考えられた。そのため、野生型マウスと CD28 欠損マウス由来の骨髓細胞を用いて骨髓キメラマウスを作製し、IL2 が正常に供給される環境における CD28 欠損 pTreg の評価を行った。図 3A に示されたように、CD28 欠損マウスと同様に、骨髓キメラマウスにおいても CD28 欠損 CD4⁺T 細胞における Treg の割合は回復しなかった。また、tTreg における CD28 欠損細胞の割合はどの組織においてもほとんど検出されなかった。一方で、腸管 pTreg 中の CD28 欠損細胞は野生型と同程度認められた。しかし、末梢リンパ組織では減少していた (図 3 B)。これらの結果から、CD28 欠損マウスにおける pTreg の減少は IL2 の供給低下ではなく、CD28 シグナルの内因性の欠損が原因となっていることが示唆された。

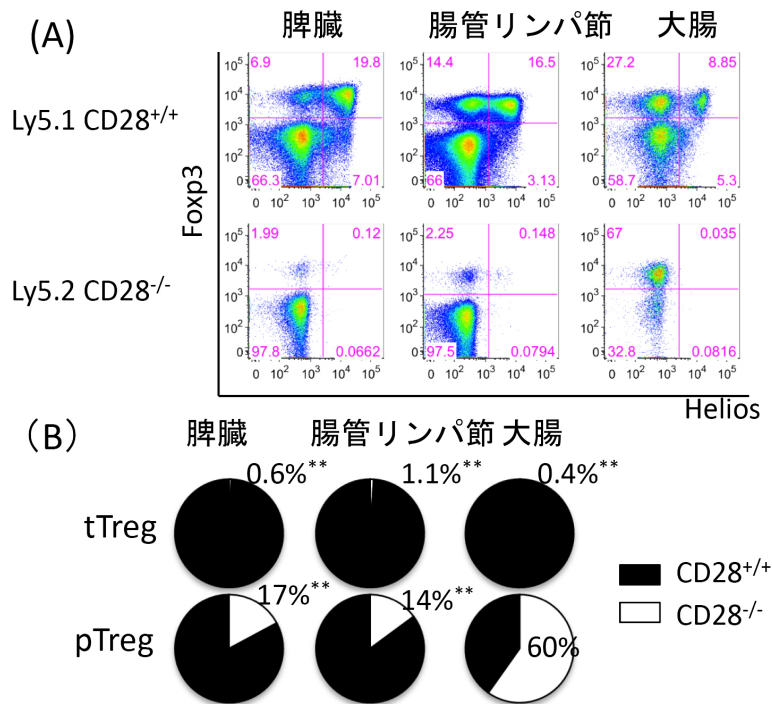


図 3. CD28 欠損マウスにおける pTreg の減少は CD28 の内因的な欠損が原因である。

Ly5.1/5.1 CD28^{+/+}マウス、および Ly5.2/5.2 CD28^{-/-}マウス由来の骨髓細胞は致死量の γ 線を照射した Ly5.1/5.2 マウスに共移入し、骨髓キメラマウスを作製した。(A) 骨髓キメラマウスにおける CD28^{+/+}もしくは CD28^{-/-} CD4⁺T 細胞中の Treg の割合。(B) 骨髓キメラマウスにおける tTreg および pTreg 中の CD28^{+/+}と CD28^{-/-}細胞の割合。 **p < 0.01, Student t-test.

4. pTreg において CD28 シグナルは細胞死抑制よりむしろ細胞周期に影響を与える

過去の研究から、CD28 シグナルは T 細胞の細胞死の抑制、および細胞周期の進行に寄与していることが明らかとなっている。そのため、CD28 欠損マウスにおいて pTreg の減少が細胞死の惹起、もしくは細胞周期の異常が原因となっているかを検討した。開裂型 caspase3 (cleaved caspase3) を細胞死の指標として、CD28 欠損マウス脾臓中の Tconv, tTreg, pTreg を解析した。図 4A に示されたように、野生型マウスと比較して、CD28 欠損マウスの tTreg において顕著に細胞死が誘導されていることが明らかとなった。一方で、Tconv と pTreg において、野生型と CD28 欠損マウスで細胞死にほとんど差が認められなかった。予備の実験から、骨髓キメラマウスでも CD28 欠損 tTreg の細胞死誘導は抑制できない結果が得られており、CD28 の内因性の欠損が tTreg に細胞死を誘導している可能性が考えられた。一方で、pTreg では細胞死に違いが認められなかったことから、CD28 欠損マウスにおける pTreg の減少には過剰な細胞死が原因ではないことが示唆された。次に、CD28 欠損 pTreg の細胞周期の進行に異常が起こっているかを明らかにするために、野生型マウスおよび CD28 欠損マウスに BrdU を投与し細胞周期進行の解析を行った。解析

の際、ki67を細胞周期マーカー、BrdUを細胞周期進行マーカーとして用いた。図4Bおよび図4Cに示したように、TconvおよびtTregにおいて、ki67⁺細胞中のBrdU⁺細胞の割合は野生型とCD28欠損細胞で顕著な違いが認められなかった。一方で、CD28欠損pTregにおけるki67⁺中のBrdU⁺細胞の割合は野生型と比較すると低下していた。これらの結果から、CD28欠損マウスにおけるpTregの減少は細胞周期の異常、特にS期への進行抑制が原因となっている可能性が考えられた。予備的実験から骨髄キメラマウスでは、CD28欠損tTregにおけるki67⁺細胞がほとんど消失することから、CD28シグナルがtTregの細胞周期への移行に寄与している可能性も示唆されている。

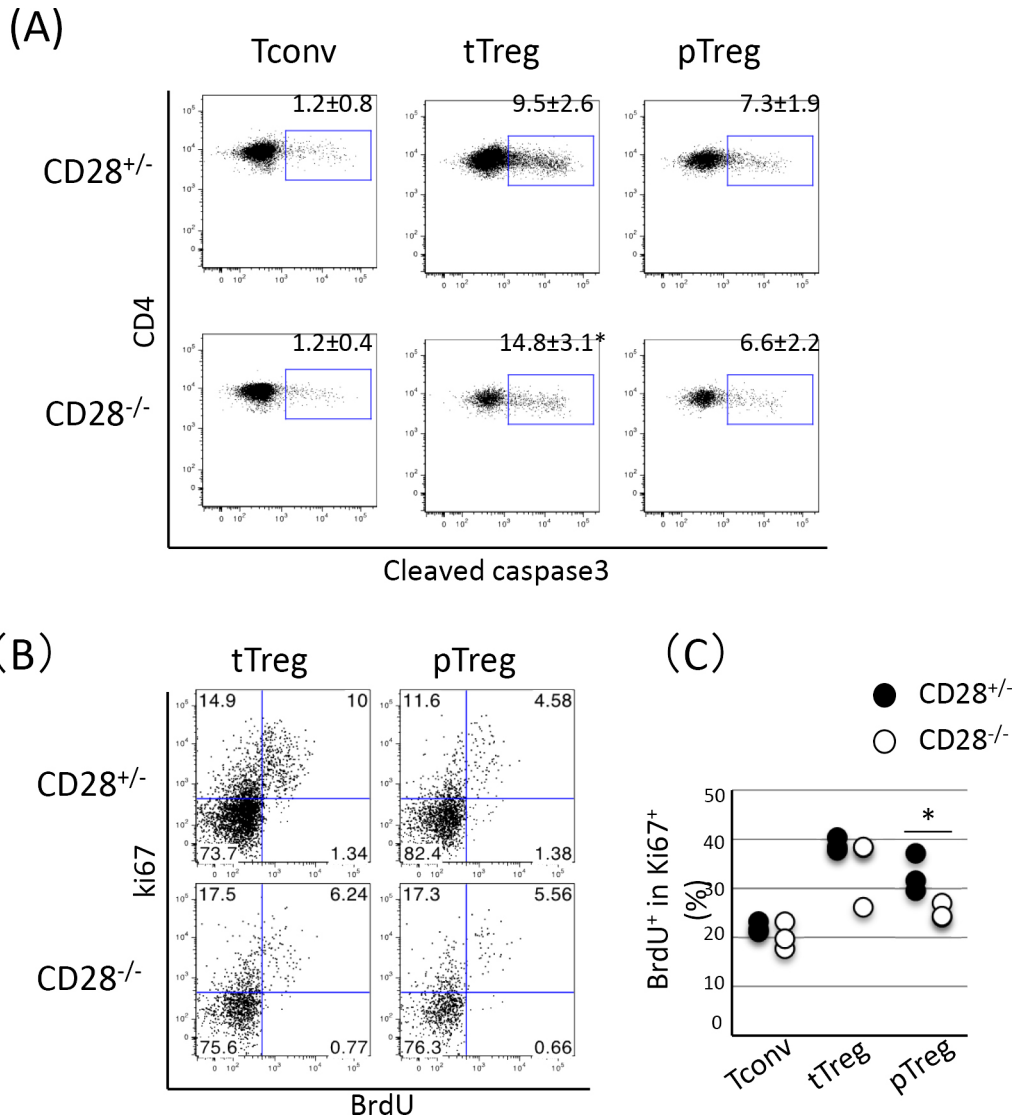


図4. pTregにおいてCD28シグナルは細胞死抑制よりもむしろ細胞周期に寄与する。

(A) CD28^{+/-}マウスおよびCD28^{-/-}マウス脾臓におけるTconv, tTreg, pTregにおける細胞死を活性化型であるcleaved caspase3を指標に評価した。Mean ± SD. *p < 0.05. (B, C) CD28^{+/-}マウスおよびCD28^{-/-}マウスにBrdUを腹腔内投与で3日間投与した。BrdU投与したマウス脾臓におけるTconv, tTreg, pTregにおける細胞周期に入った細胞をki67の発現で、DNA合成期への進行をBrdUで評価した。(B) tTregおよびpTregの代表的なFACS plot (C) 細胞周期に入った細胞の中でS期に進行した細胞の割合。p < 0.05, Student t-test.

考 察

CD28 シグナルは胸腺からの Treg の分化に重要な役割を果たしており、また末梢での維持にも寄与していることが報告されてきた。しかし、本研究から胸腺で分化する tTreg と末梢で分化する pTreg は CD28 の分化における要求性が異なることが明らかとなった。さらに、CD28 シグナルは tTreg, pTreg 両方の末梢での維持に寄与しているが、CD28 シグナルによる効果は細胞によって異なり、tTreg がより強い影響を受けている可能性が示唆された。また、pTreg は Tconv から分化するが、CD28 シグナルの要求性は pTreg と Tconv 間でも相違性は認められた。現在は CD28 シグナルの要求性の違いが、なぜ起こるのかを細胞内シグナル経路に注目して、解析を行っている。

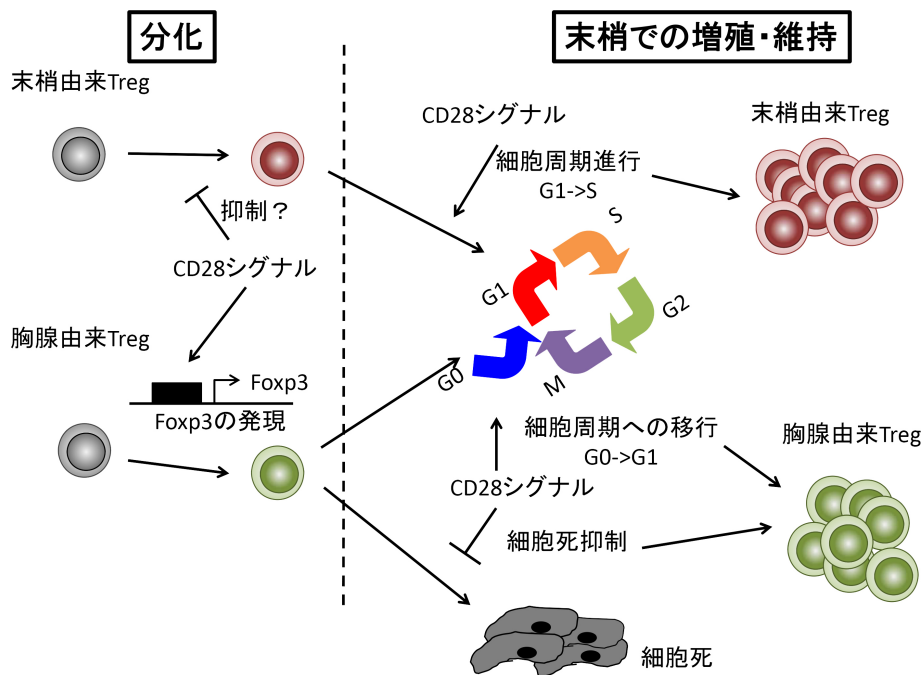


図5. CD28 シグナルの寄与は胸腺由来, 末梢由来 Treg で異なる。

tTreg において、CD28 シグナルは Foxp3 の発現を制御し分化に寄与する。また細胞死の抑制、細胞周期の移入を促進することで、末梢での維持に関与している。一方で、pTreg では、分化には CD28 シグナルは重要ではなく、細胞周期の進行に影響を与えることで末梢での維持に寄与している。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東京理科大学生命医科学研究所免疫生物学研究部門の安部 良である。最後に、本研究を行うにあたり、御支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Wakamatsu, E., Mathis, D. & Benoist, C. : Convergent and divergent effects of costimulatory molecules in conventional and regulatory CD4⁺ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **110** : 1023-1028, 2013.