



Title	CD4+CD25+ regulatory T cells in the small intestinal lamina propria show an effector/memory phenotype
Author(s)	郭, 子進
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48997
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	郭 子 進
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 1 8 6 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 20 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科未来医療開発専攻
学 位 論 文 名	CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatory T cells in the small intestinal lamina propria show an effector/memory phenotype (小腸粘膜固有層 CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatory T 細胞はエフェクター/メモリフェノタイプを示す)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 宮坂 昌之 (副査) 教 授 平野 俊夫 教 授 竹田 潔

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

免疫寛容は自己および無害の外来抗原、例えば食物抗原に対する免疫応答を抑制する機構である。最近、少しずつそのメカニズムが解明されつつあるが、その中で、特に制御性 T 細胞と呼ばれる T 細胞サブセットが注目されている。この細胞集団は自己免疫だけでなく、炎症、感染免疫、腫瘍免疫、アレルギーなどにおける種々の免疫反応を制御する能力をもち、免疫系の恒常性維持に重要な働きを果たす。制御性 T 細胞は CD4⁺CD25⁺ というフェノタイプをもち、転写因子 Foxp3 を特異的に発現する。Foxp3 は制御性 T 細胞のマスター遺伝子として機能するらしい。これまで、胸腺や脾臓に存在する制御性 T 細胞について主に研究が行われてきたが、腸管粘膜固有層に存在する制御性 T 細胞については不明点が多い。消化管粘膜は生体が外部抗原を取り込む場所であり、そこでは外来抗原に対する免疫応答を積極的に抑制する経口免疫寛容機構が働く。しかし、この機構に対して制御性 T 細胞がどのような寄与をするのかは不明である。そこで、私は腸管粘膜固有層制御性 T 細胞を分離し、その性質を調べることによって、経口免疫寛容の機構に対する関与を明らかにすることを試みた。

〔 方法ならびに成績 〕

私は、まず、これまでの細胞分離法を改良して、腸管からの効率的なリンパ細胞分離法を考案した。次に、分離後の細胞を CD4、CD25、Foxp3 に対する抗体で染色し、FACS 解析を行った。その結果、腸管粘膜固有層には、脾臓と腸間膜リンパ節と同様に、CD4⁺CD25⁺ 細胞が存在し、CD4 細胞集団の約 15% を占めることがわかった。腸管粘膜固有層由来の CD4⁺CD25⁺ 細胞 (LP-Treg) では約 70% が Foxp3 陽性であり、一方、脾臓や腸管膜リンパ節の CD4⁺CD25⁺ 細胞は 85% が Foxp3 陽性であった。さらに、抗 CD45RB、CD44、CD62L、integrin $\beta 7$ 抗体で免疫染色したところ、LP-Treg の多くは CD44^{hi}CD45RB^{lo}CD62L^{lo} $\beta 7$ ^{hi} で、「エフェクター/メモリー」フェノタイプを示すことが明らかになった。一方、このようなフェノタイプをもつ Treg は脾臓と腸管膜リンパ節では少数であった。

次に、ケモカインレセプターの発現を FACS および real time PCR で調べた結果、LP-Treg は脾臓の Treg に比べて CCR7 を低発現したが、CCR9 と CCR4 を高発現していた。Transwell chemotaxis assay を用いて走化性を調べたところ、LP-Treg は CCR9 の ligand である CCL25/TECK のみならず、CCR4 の ligands である CCL17/TARC お

よび CCL22/MDC に対して効率的な走化性を示した。今まで、CCR4 シグナルは T 細胞の皮膚への遊走に重要とされていたが、今回の結果から、CCR4 シグナルは腸管においても重要な働きを果たしていることが示唆された。

これまで腸管における CCR4 ligand 産生細胞は不明である。これまでに、成熟樹状細胞が CCR4 ligand を分泌し、*in vitro* では T reg の遊走性を誘導できることが報告されている。従って、LP-Treg においてもこの機構が働く可能性について検討した。まず、腸管粘膜固有層樹状細胞 (LP-DC) を分離し、*real time PCR* で確認したところ、CCR4 ligand 発現は腸間膜リンパ節と脾臓に存在する樹状細胞より明らかに高かった。さらに、脾臓樹状細胞、LP-DC と腸間膜固有層好酸球細胞を分離し、三日間培養した後、上清を ELISA に用いた。脾臓樹状細胞と腸管粘膜固有層好酸球細胞の上清に CCR4 ligand が検出されなかったのに対して、LP-DC の培養上清には CCR4 ligand が大量に検出された。この培養上清を *transwell chemotaxis assay* に用いたところ、LP-Treg は遊走し、この遊走は抗 CCR4 ligand 抗体により阻害された。さらに、免疫染色で LP-DC と LP-Treg の局在を調べた結果、約 60% の LP-Treg は LP-DC に近接しているかまたは直接に接触していることが明らかになった。この結果から、LP-Treg は LP-DC の産生した CCR4 ligand により小腸粘膜固有層に局在する可能性が示唆された。

〔 総 括 〕

LP-Treg は、脾臓やリンパ節の Treg と比較してきわめてユニークな細胞集団であり、 $CD44^{hi}CD45RB^{lo}CD62L^{-}$ の「エフェクター/メモリー」フェノタイプを示した。LP-Treg は CCR4 を高発現するとともに、CCL17/TARC および CCL22/MDC に対して効率的な走化性を示した。また、腸管では約 60% の LP-Treg が LP-DC と共局在を示していた。これらのことから、LP-Treg が腸管に局在するメカニズムの一つとして、CCR4 を発現する LP-Treg が LP-DC が産生する CCR4 リガンドに対して動員される可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

制御性 T 細胞 (Treg) と呼ばれる T 細胞サブセットが免疫系の恒常性維持に重要な働きを果たすことが明らかにされているが、小腸粘膜固有層 (LP) Treg、その存在および性質については詳しく知られていない。申請者は今まで LP 細胞分離法を改良し、より効率的にリンパ球を分離でき、その中に Treg の存在を確認した。さらに、この細胞集団が $CD62L^{-}CD44^{hi}CD45RB^{lo}$ のエフェクター/メモリーフェノタイプをもち、CCR4 が高く発現し、LP 樹状細胞 (DC) によって分泌される CCR4 リガントに対する濃度依存的に遊走することを明らかにした。LP において、約 60% の Treg が DC と共局在し、Treg が CCR4 リガントにより DC の近傍に遊走することが示唆された。本論文は小腸粘膜固有層 Treg の存在およびその性質を明らかにし、Treg および粘膜免疫の分子機構の理解に貢献したと考えられ、博士の学位授与に値する。