The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	IL-6により分化、活性が制御されるFoxP3+CD8+T細胞の解析
Author(s)	中川, 貴之
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/49290
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

IL-6 により分化、活性が制御される FoxP3^{+}CD8^{+}T 細胞の解析

大阪大学大学院生命機能研究科

中川貴之

平成２０年３月修了

要旨

FoxP3^{+}CD4^{+}T 細胞として知られる制御性 T 細胞は生体内にて自己に対する免疫寛容を誘導し、自己免疫疾患の発症を阻止する重要な細胞である。最近の研究により FoxP3^{+}CD8^{+}T 細胞も試験管内と生体内で制御性 T 細胞活性を持つことが明らかになってきている。しかし、この細胞のその生理的な機能や生体内での発生については未だ不明な点が多い。

本研究においては IL-6 により FoxP3^{+}CD8^{+}CD25^{+}T 細胞の分化が支持されることを試験管内で明らかにし、この細胞群は試験管内で T 細胞活性化を抑制すること、さらにマウス生体内にて CD4^{+}T 細胞依存性の自己免疫性腸炎の発症を抑制することから機能的に制御性 T 細胞であることが明らかになった。さらに IL-6 濃度がマウスの週齢と共に上昇してくる関節炎発症モデルの F759 マウスでは IL-6 と週齢依存的に FoxP3^{+}CD8^{+}T 細胞が増加することを明らかにし、この FoxP3^{+}CD8^{+}T 細胞が関節炎の発症を抑制していることが明らかになった。これらの結果は、炎症性サイトカインとしてよく知られている IL-6 による一種のネガティブフィードバック機構として FoxP3^{+}CD8^{+}T 細胞が機能していることを示唆するものである。

目次

要旨	2
緒言	4
結果	6
考察	9
材料と方法	11
図の解説	14
引用文献	16
図	21
業績	41

緒言

自己と非自己の区別は免疫システムの根幹をなすものであり、自己反応性の細胞を抑制、除去することができなければ関節リウマチや、全身性エリテマトーデスといった自己免疫疾患に陥ってしまい、逆に非自己認識のしきい値が高すぎ、多量の免疫細胞を抑制、または除去してしまうと外来感染などに対する防御ができなくなる。このような免疫の恒常性を維持する機構に関しては、これまでに様々なメカニズムが明らかにされてきた。生体内では主にT細胞が抗原認識に関わっていることが示されており、免疫恒常性維持のメカニズムの1つはT細胞が発生する場である胸腺における自己反応性のT細胞の除去である。血液幹細胞より産生された自己をも含む多数の抗原特異性を持ったT細胞前駆体は胸腺で自己抗原を提示され、自己反応性のT細胞はアポトーシスにより死滅してしまう。このような仕組みを中枢トレランスと呼び、自己と非自己の認識に関して大きな役割を担っている(Kyewski and Klein, 2006)。しかしながら、これだけでは自己免疫疾患の回避に対して完璧ではなく、末梢における免疫恒常性維持の機構が存在することが現在までに明らかになっている(Bhandoola et al., 2002; Sakaguchi, 2004; Walker and K., 2002)。これまでに制御性T細胞、NKT細胞など、様々な免疫を制御する細胞集団の存在が末梢における免疫恒常性の維持機構として明らかになってきたが(Taniguchi et al., 2003)、その中でも$CD4^+CD25^+$Tregが一般的な制御性T細胞として知られ、多くの自己免疫疾患の発症を抑制し、末梢における代表的な免疫制御メカニズムであることがよく知られている(Sakaguchi, 2000; Shevach, 2000)。$CD4^+CD25^+$Tregは胸腺で分化するものと、末梢で分化するものが知られているが、その分化の詳細なメカニズムは未だ明らかになっておらず、分化した$CD4^+CD25^+$Tregには転写因子FoxP3が発現し、この分子は最も$CD4^+CD25^+$Tregに特異的なマーカーであり、この発現が$CD4^+CD25^+$Tregの分化と機能発現に必須なマスター遺伝子であることが知られている(Fontenot, 2003; Hori, 2003; Khattri, 2003; Sakaguchi et al., 2006)。ヒトにおけるFoxP3の遺伝子変異は糖尿病、腸炎など多種の自己免疫疾患を合併したIPEX（immune disregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked）と呼ばれる自己免疫疾患の原因遺伝子になっている(Bacchetta et al., 2006)。さらにこの細胞群はインターロイキン2（IL-2）受容体のα鎖を形成するCD25を高発現しており、$CD4^+CD25^+$制御性T細胞の維持、機能発現にはIL-2が必要であることもよく知られている(Sakaguchi et al., 2006)。$CD4^+CD25^+$T細胞を他の細胞と区別する表面マーカーとしてはCD25以外にGITR、CTLA-4、CD103などの分子が特異的に発現していることが知られているが、これらの分子群が制御性T細胞活性とどのように関与しているか研究が進んでいるところである(Read, 2000; Shimizu, 2002; Takahashi, 2000)。一方、CD8陽性の制御性T細胞に関してはこれまでにいくつかの報告はあるものの(Billerbeck et al., 2007; Kapp et al., 2006; Manavalan et al., 2004)、$CD4^+CD25^+$制御性T細胞と比較すると圧倒的に知見が少なく、特にその分化メカニズム、自己免疫疾患との関係に関しては知見が

得られていなかった。

また、これまでに我々の研究室においてはインターロイキン6（IL-6）の機能とその受容体からのシグナル伝達に関して研究を行ってきた(Hirano et al., 1986; Kamimura et al., 2003)。IL-6は当初、B細胞分化因子、インターフェロンβ2、肝細胞刺激因子、II型単球／顆粒球分化因子など、様々な名前で発見された分子であり、試験管内、生体内において多様な機能を有するサイトカインである(Kamimura et al., 2003)。これまでに得られた知見よりIL-6は炎症性サイトカインとして働き、急性期蛋白を誘導し、感染防御に働くことが免疫反応における主な作用だと考えられてきた。さらに最近、IL-6は新たなT細胞サブセットで自己免疫疾患の発症に重要であるIL-17産生性のTh17細胞と$CD4^+CD25^+$制御性T細胞の分化の分岐点における重要なサイトカインであることがわかり、自己免疫疾患とIL-6との関係が再注目されるようになってきている(Bettelli et al., 2006; Cua et al., 2003; Harrington et al., 2005; Langrish et al., 2005; Mangan et al., 2006; Nishihara et al., 2007; Park et al., 2005; Veldhoen et al., 2006)。

我々の研究室ではIL-6のシグナル伝達分子であるgp130のシグナル伝達部位に変異を入れたノックインマウスを作製し、生体内でのgp130のシグナルの機能を検討する研究を行ってきた。そのなかでもgp130のY759をフェニルアラニンに置換したF759マウスにおいては生後1年以内に自己免疫性の関節炎を自然発症し(Atsumi et al., 2002)、この疾患は$CD4^+$T細胞依存性、さらにはTh17細胞が深く関与していることを明らかにしている。さらに、この疾患は$CD4^+$T細胞依存性であるが、$CD8^+$T細胞を欠損させた場合、疾患が重症化、早期化することも認められてきた(Sawa et al., 2006)。しかし、$CD8^+$T細胞がどのようなメカニズムでこの自己免疫疾患の抑制を行っているかは不明であった。

今回、私の研究においては、IL-6が$FoxP3^+CD8^+CD25^+$制御性T細胞の分化に正に働くことにより、自己免疫疾患の発症を抑制していることを示した。

結果

試験管内において FoxP3$^+$CD8$^+$T 細胞は FoxP3$^+$CD4$^+$T 細胞と異なり IL-6 によりその数が増加する。

私は IL-6 が FoxP3$^+$細胞の誘導にどのように関与しているかを検討するため、試験管内においてナイーブ T 細胞を用いて CD4$^+$、CD8$^+$双方の T 細胞を FoxP3$^+$細胞に分化させた。ナイーブ CD4$^+$T 細胞は試験管内で TCR 刺激と TGFβ の添加により FoxP3$^+$細胞へ分化することが知られているが、そこに IL-6 を添加すると、FoxP3$^+$細胞の分化は抑制され、IL-17 産生性の Th17 細胞に分化することが知られており(Nishihara et al., 2007)、本検討においても同様の結果を得た（Fig1A,B)。さらに、ナイーブ CD8$^+$T 細胞を用いてもナイーブ CD4$^+$T 細胞を用いたときと同様 TCR 刺激と TGFβ の添加により FoxP3$^+$細胞へ分化した（Fig.1C,D)。このとき、IL-6 を培養系に添加すると、低濃度（1-10ng/ml）の IL-6 を添加した場合 FoxP3$^+$細胞の数が増加し、高濃度（100-1000ng/ml）の IL-6 を添加した場合はナイーブ CD4$^+$T 細胞の場合と同様、FoxP3$^+$細胞の分化は抑制され、IL-17 産生性の CD8$^+$T 細胞が増加した(Fig1C)。このとき、全体の CD8$^+$T 細胞に占める FoxP3$^+$CD8$^+$ T 細胞の割合は IL-6 添加によって減少するが、細胞数は増加していることから、CD8$^+$T 細胞全体の増加が FoxP3$^+$CD8$^+$ T 細胞の数の増加を支持していることが明らかになった(Fig1D)。以上の結果より、試験管内において低濃度の IL-6 は CD4$^+$T 細胞の場合と異なり、FoxP3$^+$CD8$^+$ T 細胞の細胞数の増加を支持していることが明らかになった。

試験管内で誘導された FoxP3$^+$CD8$^+$T 細胞には他の T 細胞を抑制する制御性 T 細胞活性があり、IL-6 によりその制御活性は増強されている。

次に、誘導された FoxP3$^+$CD8$^+$T 細胞に制御性 T 細胞活性があるかどうかを試験管内における２次培養の実験系を用いて検討した。TCR 刺激、TGFβ、IL-6 を用いて培養した CD8$^+$T 細胞には 3~10%の FoxP3$^+$細胞とその他の活性化 CD8$^+$T 細胞が含まれており、これらを分離するため、FoxP3 陽性細胞に発現する特異的マーカーの探索を行った。CD4$^+$CD25$^+$制御性 T 細胞に発現していると報告されている分子（CD25,GITR,CD103,CTLA-4）とその他多数の分子を細胞内染色によりフローサイトメトリーにより検討した（Fig2A and data not shown)。FoxP3$^+$CD4$^+$T 細胞に発現している分子は全て FoxP3$^+$CD8$^+$T 細胞に発現しており、表面マーカー上は FoxP3$^+$CD4$^+$T 細胞と非常によく似た細胞群であることが明らかになった（Fig2A)。さらに、培養中の他の活性化 CD8$^+$T 細胞と、FoxP3$^+$CD8$^+$T 細胞を分離するためのマーカーを探索したところ、CD25 分子のみが培養細胞中の活性化

$CD8^+$T 細胞に発現しておらず、$FoxP3^+CD8^+$T 細胞に特異的に発現していた(Fig2B and data not shown)。以上の結果から CD25 分子の発現を指標にセルソーターを用いて $CD8^+$T 細胞の培養細胞中から CD25 陽性細胞のみを分離した。分離した $CD8^+CD25$ 陽性 T 細胞には FoxP3 陽性細胞が 90%以上含まれることを細胞内染色にて確認した（Fig2B)。以上のように精製した $FoxP3^+CD8^+$T 細胞の制御性 T 細胞活性を測定するため、ナイーブ T 細胞と共培養し、その増殖活性を MTT アッセイ法により検討したところ、$FoxP3^+CD8^+$T 細胞はナイーブ T 細胞の増殖を抑制することができた（Fig2C)。さらに活性化 T 細胞から産生される IL-2 を ELISA 法により検出したところ $FoxP3^+CD8^+$T 細胞は IL-2 産生を顕著に抑制していた（Fig2D)。

IL-6 による $FoxP3^+CD8^+$T 細胞の制御活性の変化を検討するため、TCR と TGFβ 刺激により $FoxP3^+CD8^+$T 細胞を誘導する際に IL-6 を添加して誘導した細胞と添加せずに誘導した細胞をそれぞれ MoFlo により精製し、試験管内における制御性 T 細胞活性を検討した。その結果、IL-6 を添加して誘導した $FoxP3^+CD8^+$T 細胞は IL-6 を添加せずに誘導した $FoxP3^+CD8^+$T 細胞より強力な制御性 T 細胞活性を持つことを明らかにした（Fig2E)。以上の結果より、試験管内で誘導された $FoxP3^+CD8^+$T 細胞は $CD4^+CD25^+$制御性 T 細胞と同様、試験管内における制御性 T 細胞活性を有し、その活性は IL-6 により正に制御されていることを明らかにした。

IL-6 で誘導した $FoxP3^+CD8^+$T 細胞は RAG2KO マウスにおける自己免疫性腸炎を抑制する。

次に、IL-6 により試験管内で誘導した $FoxP3^+CD8^+$T 細胞が生体内における自己免疫疾患を抑制できるかどうかを検討した。これまでによく知られた自己免疫疾患モデルとしてリンパ球が減少した宿主マウスにナイーブ $CD4^+$T 細胞を移入して誘導する腸炎モデルがある(Asseman et al., 1999; Kullberg et al., 2005; Read et al., 2006)。このモデルは $CD4^+CD25^+$T 細胞によりその発症が抑制されることがよく知られている。Fig2B と同様に IL-6 で誘導し、CD25 の発現により精製した $FoxP3^+CD8^+$T 細胞を $CD25^-CD44^{low}CD4^+$T 細胞と共に RAG2KO マウスに移入し、その体重の変化により自己免疫性腸炎の症状を検討したところ、$FoxP3^+CD8^+$T 細胞は $CD4^+CD25^+$制御性 T 細胞と同様に RAG2KO マウスにおける自己免疫性腸炎の発症を抑制することを大腸組織切片のヘマトキシリン・エオジン染色（Fig3A）とマウス個体の体重減少（Fig3B）を指標にして明らかにした。以上の結果より、$FoxP3^+CD8^+$T 細胞は生体内においても制御性 T 細胞活性を有し、ナイーブ $CD4^+$T 細胞により引き起こされる自己免疫性腸炎の発症を抑制することが明らかとなった。

加齢した F759 マウスの生体内において FoxP3^{+}CD8^{+}T 細胞は IL-6 依存的に増加している。

F759 マウスは gp130 の点変異により SOCS3 によるネガティブフィードバックが欠如しているユニークなマウスモデルであり、自己免疫性の関節炎を生後 1 年ほどで自然発症する(Atsumi et al., 2002)。私は加齢した F759 マウスにおいて血清中の IL-6 濃度が増加することに着目し (Fig4A)、加齢した F759 マウスにおいて FoxP3^{+}CD8^{+}T 細胞が増加する可能性について検討した。その結果、加齢した F759 マウスにおいては FoxP3^{+}CD8^{+}T 細胞の細胞数と CD8^{+}T 細胞全体に占める割合が増加しており(Fig4D,E)、2006 年の報告(Sawa et al., 2006)で示したように FoxP3^{+}CD4^{+}制御性 T 細胞の細胞数には変化がなかった(Fig4B,C)。さらに、加齢した IL-6KO/F759 二重変異マウスにおいては FoxP3^{+}CD8^{+}T 細胞の細胞数、割合は加齢した F759 マウスと比較して有意に減少していた(Fig4D,E)。以上の結果より、FoxP3^{+}CD8^{+}T 細胞は F759 マウスの加齢により IL-6 依存的にその細胞数が増加していることが明らかとなった。

FoxP3^{+}CD8^{+}T 細胞は F759 マウスにおける自己免疫性関節炎を抑制している。

F759 マウスの生体内で加齢に伴って誘導されてくる FoxP3^{+}CD8^{+}T 細胞が自己免疫性関節炎を修飾しているか検討した。そのために CD8^{+}T 細胞でのみ FoxP3 を欠如するような骨髄キメラマウスを作製し、そのキメラマウスにおける関節炎のスコアリングを行った。FoxP3 を欠損した Scurfy/F759 マウスの骨髄と CD8KO/F759 マウスより調整した骨髄を等量ずつ混和し、放射線照射した F759 マウスに移入して作製したキメラマウスにおいてはコントロールの骨髄キメラマウスと比較して FoxP3^{+}CD8^{+}T 細胞のみが欠如しており、FoxP3^{+}CD4^{+}制御性 T 細胞の割合には変化が無いことを確認した (Fig5A)。このようなマウスにおいて自己免疫性関節炎のスコアリングを行ったところ、FoxP3^{+}CD8^{+}T 細胞のみを欠損する骨髄キメラマウスにおいては関節炎の発症が有意に早期化、重症化した(Fig5B)。以上の結果より、F759 マウスの生体内で誘導されてくる FoxP3^{+}CD8^{+}T 細胞は F759 マウスにおける自己免疫性関節炎の発症を抑制していることが明らかとなった。

考察

生体内にはCD4陽性とCD8陽性の二つのFoxP3陽性細胞があるが、一般的な制御性T細胞とはFoxP3$^+$CD4$^+$T細胞のことを指す。なぜならFoxP3$^+$CD4$^+$T細胞の中でもとりわけ胸腺から自然に発生してくるものに関しては生体内で自己免疫疾患を抑制する細胞として非常によく研究されているためである(Fontenot, 2003; Hori, 2003; Khattri, 2003; Sakaguchi et al., 2006)。一方、FoxP3$^+$CD8$^+$T細胞に関してはいくつかの(Billerbeck et al., 2007; Jiang et al., 2007; Kapp et al., 2006; Noble et al., 2006; Zheng et al., 2004)の報告があるものの未だその生理的な機能や、分化メカニズムが明らかになっていない。本研究において私はFoxP3$^+$CD8$^+$T細胞の生体内での分化メカニズムと、生理的な機能を明らかにした。

まず、試験管内においてIL-6依存的にFoxP3$^+$CD8$^+$T細胞の数が増加することを示し(Fig1C)、このように誘導されたFoxP3$^+$CD8$^+$T細胞が試験管内と生体内においてT細胞の活性化を抑制し、試験管内におけるナイーブT細胞の分裂と生体内におけるCD4$^+$T細胞依存的な自己免疫疾患を抑制することを明らかにした（Fig2,3)。さらに、試験管内で誘導したFoxP3$^+$CD8$^+$T細胞の制御性T細胞活性に関してもIL-6により正に制御されていることを試験管内で示した（Fig2E)。次に、gp130のSOCS3結合部位に変異を導入することにより、SOCS3のネガティブフィードバックが欠如し、IL-6-gp130-STAT3のシグナルが亢進したF759マウスを使用し、このマウスにおいて加齢に伴い血清中のIL-6濃度が上昇することを示した（Fig4A)。さらに加齢したF759マウスにおいてはFoxP3$^+$CD8$^+$T細胞が増加しており、IL-6の欠損によりFoxP3$^+$CD8$^+$T細胞も減少した（Fig4D)。これらの結果はFoxP3$^+$CD8$^+$T細胞は少なくともIL-6の産生が増加している遺伝的背景（F759マウス）においてIL-6依存的に増加していることを示すものである。さらにはFoxP3がCD8$^+$T細胞でのみ欠損したF759マウスにおいては自己免疫性の関節炎の発症が亢進することを明らかにした（Fig5B)。以上の結果からIL-6によって誘導されるFoxP3$^+$CD8$^+$T細胞は生体内において種々の自己免疫疾患の発症を抑制する機能を有するものと考えられる。

FoxP3$^+$CD8$^+$T細胞の生理的な機能に関しては今後さらなる検討が必要となるが、本研究より考察すると、私はIL-6によるFoxP3$^+$CD8$^+$T細胞の分化は炎症に対するネガティブフィードバック機構ではないかと考えている。IL-6は免疫反応において、これまでは炎症性サイトカインとしての機能が主であると考えられており、例えば、IL-6は肝臓からのCRPや血清アミロイド蛋白A、フィブリノゲンといった急性期蛋白の産生を増加させ、これらは臨床における重要な炎症マーカーとなっているし(Dayer E, 2007)、炎症時の体温上昇にも関わることがよく知られている(Conti et al., 2004)。さらに、IL-6は様々な自己免疫疾患の発症に関与していることが知られており、IL-6を欠損したマウスにおいては自己免疫性脳脊髄炎、自己免疫性腸炎、自己免疫性関節炎といった様々な実験的自己免疫疾患モデルの発症が有意に抑制される(Boe et al., 1999; Campbell et al., 1991; Hata et al., 2004; Hirota

et al., 2007; Okuda et al., 1998; Sasai et al., 1999)。近年ではIL-6はTh17細胞を誘導することにより自己免疫疾患を誘導することが示されている。F759マウスにおいても同様であり、IL-6欠損F759マウスにおいては自己免疫性の関節炎の発症が有意に抑制されることが示されている(Sawa et al., 2006)。このようにIL-6が炎症において重要な分子であることはよく知られており、以上に示すようなIL-6の炎症性サイトカインとしての機能のフィードバックメカニズムとして本研究で示したFoxP3$^+$CD8$^+$T細胞の誘導をIL-6が行っていることが考えられる。

もう1つの疑問点としてIL-6がどのようにFoxP3$^+$CD8$^+$を誘導しているのかという問題がある。この疑問に対する結論はまだ得られておらず、今後の検討が必要になるが、1つの仮説は低濃度のIL-6がTCRとTGFβにより刺激を受けたCD8$^+$T細胞のFoxP3の発現を亢進させている可能性と、もう1つは低濃度のIL-6がCD8$^+$T細胞の生存や分裂を亢進させることによりCD8$^+$T細胞全体の数を増加させ、その結果、FoxP3$^+$CD8$^+$T細胞の数を増加させている可能性の二つがある。本研究において私は後者の仮説が正しいのではないかと考えている。なぜなら、試験管内におけるTCR、TGFβ刺激に低濃度IL-6を添加する実験において、培養細胞中のFoxP3$^+$細胞の割合はIL-6添加によりむしろ低下する傾向にあり、培養細胞中のCD8$^+$T細胞全体の細胞数が増加することがFoxP3$^+$CD8$^+$T細胞の細胞数の増加に寄与しているからである（Fig1D and FigS1)。

では、なぜIL-6はCD4$^+$T細胞の生存、細胞数の増加には影響が少なく、CD8$^+$T細胞の生存、細胞数の増加に作用するのであろうか。その原因はCD4$^+$T細胞、CD8$^+$T細胞のTGFβに対する反応性の差にある可能性を示唆する結果を得ている（FigS2)。TGFβはCD8$^+$T細胞に対しては細胞増殖の抑制を行い、CD4$^+$T細胞に対しては細胞増殖を抑制する活性はほとんど見られなかった（FigS2)。これらの結果から、IL-6シグナルはTGFβシグナルによるCD8$^+$T細胞の増殖活性の減少を抑制することによりCD8$^+$T細胞全体の生存、増殖を支持し、FoxP3$^+$CD8$^+$T細胞を増加させている可能性が示唆される。今後の検討課題はCD8$^+$T細胞におけるTGFβシグナルとIL-6シグナルのクロストークの分子メカニズム解析であると考えている。

謝辞

本研究を進めるにあたってご指導賜りました平野俊夫教授、村上正晃准教授、および大阪大学大学院生命機能研究科免疫発生学研究室の皆様と、理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センターサイトカイン制御グループの皆様に深く感謝を申し上げます。

材料と方法

マウス

C57BL/6 マウス　　日本クレア（静岡）より購入
RAG2KO マウス　　IBL (群馬)より購入
F759 マウス　　当研究室で作成、維持(Atsumi et al., 2002; Ohtani et al., 2000)
IL-6KO マウス　M.Kopf 博士（MaxPlank-Institut fur Immunobilogie）より岩倉博士（東京大学）を通じて譲渡(Park et al., 2004)。
C57BL/6　FoxP3$^{+/Scurfy}$ マウス　　堀博士（RIKEN RCAI）より譲渡(Komatsu and Hori, 2007)
F759/CD8KO マウス　　当研究室で掛け合わせ、維持(Sawa et al., 2006)
F759 骨髄移植キメラマウス　　骨髄移植の欄に記載
マウスは全て大阪大学医学部付属動物実験施設にて SPF 環境下で維持、管理。
動物実験は全て大阪大学生命機能研究科と医学系研究科の動物実験指針に基づき行った。図の解説に特記していない限り 7-12 週齢の若齢マウスを使用した。

抗体、試薬

Allophicocyanin(APC)-conjugated　anti-CD4, anti-CD25(eBiosciences, San Diego, CA)
FITC-conjugated　anti-CD19(Biolegend, San Diego, CA), anti-I-Ab(BD Biosciences, San Diego, CA), anti-FoxP3, anti-CD4(eBiosciences)
PE-conjugated　anti-CD4, anti-CD19, anti-I-Ab, anti-CD25(以上 eBiosciences)
PE-Cy5-conjugated　anti-CD8(eBiosciences)
PacificBlue-conjugated　anti-CD4(eBiosciences)
Biotin-conjugated　anti-CD103, anti-GITR, anti-CTLA4(eBiosciences)
PE-streptavidin(eBiosciences)
Purified 抗 CD3 抗体,anti-CD28(Biolegend)

フローサイトメトリー解析

培養後の細胞、もしくはマウスの脾臓、リンパ節より調製した T 細胞を蛍光標識された抗体と 4℃で 30 分間インキュベートすることにより染色を行った。解析は FACSCalibur(BD)、もしくは CyAn(Dako Cytomation, Glostrup Denmark)を用いて行った。

細胞調整とセルソーティング

リンパ節と脾臓をマウスより回収し、ほぐして調製した細胞懸濁液をナイロンウールカラムによって T 細胞を精製した後、Pacific-Blue 標識抗 CD4 抗体、PE-Cy5

標識抗 CD8 抗体、PE 標識抗 CD25 抗体、APC 標識抗 CD44 抗体、FITC 標識抗 CD19 抗体、FITC 標識抗 MHC クラス II 抗体により染色し、MoFlo セルソーター（Dako Cytomation）を用いてナイーブ T 細胞（$CD25^{-}CD44^{-}CD19^{-}MHCII^{-}/CD4orCD8^{+}$）、制御性 T 細胞（$CD25^{+}CD44^{-}CD19^{-}MHCII^{-}/CD4orCD8^{+}$）、それぞれの細胞集団を分取した。精製した後のそれぞれの純度は 99%以上であった。

細胞内染色

試験管内アッセイ：推奨濃度の GolgiPlug(BD)を培養液中に添加し、6 時間インキュベートした後、細胞を回収し、APC 標識抗 CD4 抗体、PE-Cy5 標識抗 CD8 抗体により染色し、次に細胞を CytoFix(BD)にて固定、Perm/Wash バッファーによって細胞膜を透過性にした後に FITC 標識抗 FoxP3 抗体と PE 標識抗 IL17 抗体で染色を行った。データの取り込みは FACSCalibur を用い、解析は FlowJo(TreeStar, Ashland, OR)を用いて行った。

生体内アッセイ：リンパ節もしくは脾臓より調整した T 細胞を Pacific-Blue 標識抗 CD4 抗体、PE 標識抗 CD19 抗体, 抗 $I\text{-}A^{b}$ 抗体、PE-Cy5 標識抗 CD8 抗体、APC 標識抗 CD25 抗体で染色した後、試験管内アッセイと同様に、固定、膜透過処理を行った後、FITC 標識抗 FoxP3 抗体で染色した。データの取り込みは CyAn フローサイトメーターにより行い、解析は FlowJo ソフトウェアにて行った。

試験管内における T 細胞分化

MoFlo により精製したナイーブ $CD4^{+}$もしくは $CD8^{+}$T 細胞（$5x10^{5}$/ml）を抗 CD3 抗体（10ng/ml）、TGFβ（5ng/ml）、BMDC（$1x10^{5}$/ml）と IL-6（濃度は図中に記載）を 5 日間試験管内で培養した。制御性 T 細胞活性を測定する実験においては培養した細胞を $CD25^{high}$ の T 細胞のみ MoFlo にてソーティングした。ソーティングした後の $CD25^{high}$、CD4 陽性もしくは CD8 陽性 T 細胞は 90%以上の $FoxP3^{+}$T 細胞を含むことを細胞内染色によって確認した。

試験管内における T 細胞増殖アッセイと IL-2 産生能の評価

MoFlo により精製した CD4 陽性もしくは CD8 陽性かつ CD25 陰性 T 細胞（$5x10^{4}$/well）を BMDC（$1x10^{4}$/well）、図中に示す制御性 T 細胞（$5x10^{4}$/well）と共に抗 CD3 抗体（0.5ug/ml）を添加して 96well U-bottom plate で 72 時間培養した。細胞増殖に関しては MTT 試薬（DOJIN, Kumamoto）を用いて 550nm の吸光度により解析した。IL-2 の産生能に関しては 72 時間培養した培養上清を ELISA 法（eBiosciences）により解析した。

自己免疫性腸炎の誘導と臨床経過の観察

ナイーブ T 細胞と制御性 T 細胞は上記の通り精製し、$2.5x10^5$ cell のナイーブ $CD4^+$ T 細胞と $1x10^5$ cell の制御性 T 細胞（試験管内において IL-6 により誘導した $FoxP3^+CD8^+$T 細胞、試験管内において誘導した $FoxP3^+CD4^+$T 細胞、野性型マウスより調整した $CD4^+CD25^+$T細胞）を RAG2KO マウスに静脈注射により移入した。細胞移入後レシピエントマウスを SPF 環境下で 4 週間飼育し、その大腸における HE 染色組織切片の作成（奈良病理研究所、奈良）を行い、病理学的所見の検討を行った。さらに、それぞれの個体における体重減少を 3 日おきにモニターし、腸炎の臨床経過を解析した(Asseman et al., 1999; Kullberg et al., 2005; Read et al., 2006)。

ELISA

血清中の IL-6 濃度は ELISA キット（eBiosciences）により定量した。

骨髄移植

骨髄細胞は CD8KO/F759 マウス、Scurfy/F759 マウス、F759 マウスの脛骨と大腿骨より調整し、細胞数を計測した後に図中に示す様等量混和し、移入の 24 時間前に 9.5Gy の X 線照射した F759 ホストマウス（CD45.1 陽性）に $4.0x10^6$ 個ずつ静脈注射により移入した(Sawa et al., 2006)。2 ヶ月経過後の末梢血と、関節炎観察後のマウスのリンパ節と脾臓の細胞懸濁液により移植効率を解析したところドナー細胞（CD45.2 陽性）の割合は 95%以上であった（Data not shown)。

関節炎の臨床経過観察

関節炎の経過観察に関しては以前の報告(Sawa et al., 2006)にならい、生後 30 週に関して毎週 1 回の経過観察を行った。関節炎の重症度は四肢に関してそれぞれ 0~4 点の点数をつけ、その合計（四肢の合計で最高 16 点）により評価した。

統計学的解析

2 つの実験データを比較する際のの統計学的解析は t 検定を用いて行った。有意差の判定基準は P 値<0.05 とした（図中の*は　*, $p<0.05$ **, $p<0.01$ ***, $p<0.001$ を示す。)。

図の解説

Figure 1. FoxP3^{+}CD8^{+}T 細胞は試験管内において TCR 刺激、TGFβ 刺激と共に低濃度の IL-6 刺激により効率的に分化する。

(A) 5x10^{5} の MoFlo で精製した CD4^{+}CD25^{-}CD44^{low}T 細胞を 1x10^{5} の BMDC、抗 CD3 抗体、図中に示すサイトカインと共に培養した。5 日間培養した後に細胞内染色により解析した。図には FoxP3^{+}（黒丸）もしくは IL-17^{+}（白丸）の CD4^{+}T 細胞の細胞数と標準偏差（±SD）を示した。(B) (A) における FACS ヒストグラムと、CD4^{+}T 細胞に占める FoxP3 陽性、IL17 陽性細胞のそれぞれの割合を示した。(C) 5x10^{5} の MoFlo により精製した CD8^{+}CD25^{+}CD44^{low}T 細胞を (A) と同様に解析した。(D) (C) における FACS ヒストグラムと、CD8^{+}T 細胞に占める FoxP3 陽性、IL17 陽性細胞のそれぞれの割合を示した。以上のデータは独立した 3 回の同様な実験データのうち代表的なものを示した。

Figure 2. FoxP3^{+}CD8^{+}T 細胞は試験管内において T 細胞増殖と IL-2 産生を抑制する。

(A) 試験管内で誘導した FoxP3^{+}CD4^{+}T 細胞（点線）と FoxP3^{+}CD8^{+}T 細胞（太線）をそれぞれ細胞内染色により解析した。FoxP3^{+}細胞における CD25、CD103、GITR、CTLA-4 の発現について検討した。陰付きヒストグラムはアイソタイプコントロールを示した。(B) CD4^{+}CD25^{-}CD44^{low}T 細胞、CD8^{+}CD25^{-}CD44^{low}T 細胞を TCR、TGFβ 刺激、CD8^{+}T 細胞に関してはさらに IL-6 を添加して培養することにより、それぞれ FoxP3^{+}T 細胞に分化させた。5 日間培養した後、FoxP3^{+}T 細胞を精製するため CD25^{high}CD4^{+}T 細胞、もしくは CD25^{high}CD8^{+}T 細胞を MoFlo により分取した。回収した T 細胞の FoxP3 発現を細胞内染色により確認した。(C) (B) と同様に培養を行い、MoFlo により分取した CD4^{+}CD25^{high} もしくは CD8^{+}CD25^{high}T 細胞とポジティブコントロールとして精製した WT CD4^{+}CD25^{+}制御性 T 細胞をナイーブ CD8^{+}T 細胞、BMDC、抗 CD3 抗体と共培養した。72 時間培養した後、MTT 法により T 細胞の分裂能を解析した。図には 550nm の吸光度の平均値と標準偏差を示し、p 値は t 検定により算出した（それぞれ P=0.000024,P=0.00023,P=0.00032）。(D) (C) と同様に分取したそれぞれの制御性 T 細胞とナイーブ CD4^{+}T 細胞、BMDC、抗 CD3 抗体を共培養し、72 時間後、培養上清を回収し IL-2 濃度を ELISA 法により解析した。図には IL-2 濃度の平均値と標準偏差を示した。p 値は t 検定により算出した（それぞれ P=0.00017, P=0.000276, P=0.001967）。(E) TCR、TGFβ 刺激に加え、IL-6 の添加、無添加により培養した CD8^{+}T 細胞を用いて上記と同様、MoFlo により CD8^{+}CD25^{high}T 細胞を精製し、その制御性 T 細胞活性をナイーブ T 細胞と BMDC、抗 CD3 抗体と 72 時間共培養した培養上清の ELISA により解析した。図には IL-2 濃度の平均値と標準偏差を示した。p 値は t 検定により算出した（P=0.00024）。以上のデータは独立した 3 回の同様な実験データのうち代表的なものを示した。

Figure 3.　試験管内で誘導した FoxP3^{+}CD8^{+}T 細胞は T 細胞依存性の自己免疫性の腸炎を抑制する。

RAG2KO マウスに 2.5x10^{5} 個の CD25^{-}CD44^{low}CD4^{+}T 細胞を移入し自己免疫性腸炎を誘導した。CD25^{-}CD44^{low}CD4^{+}T 細胞とともに 1x10^{5} 個の WT マウスより回収した CD4^{+}CD25^{+}制御性 T 細胞、もしくは試験管内で誘導した CD4^{+}CD25^{high}FoxP3^{+}T 細胞、CD8^{+}CD25^{high}FoxP3^{+}T 細胞を移入した。それぞれの個体数はナイーブ CD4^{+}T 細胞のみが 7 匹、野性型マウスより精製した CD4^{+}CD25^{+}制御性 T 細胞を共移入した群が 10 匹、試験管内で誘導した FoxP3^{+}CD4^{+}T 細胞を共移入した群が 7 匹、FoxP3^{+}CD8^{+}T 細胞を共移入した群を 6 匹とした。(A) T 細胞移入から 30 日経過後マウスより大腸組織の HE 染色切片を作製し、それぞれの絨毛組織の観察を行った。(B) それぞれの T 細胞を移入したマウスの体重を図中に示した日数に測定した。図には移入前と比較した体重の割合の平均値と標準誤差（±SEM）を示し、p 値は t 検定により算出した(WT CD4^{+}CD25^{+} T cells: day 18, 21, 24, 27, 30; それぞれ P= 0.015, 0.00047, 0.0014, 0.00048, 0.00037; *in vitro* FoxP3^{+}CD4^{+} T cells: day 21, 24, 27, 30;それぞれ P= 0.0034, 0.011, 0.032, 0.044; *in vitro* FoxP3^{+}CD8^{+} T cells: day 21, 24, 27, 30; それぞれ P= 0.021, 0.013, 0.00034, 0.0016)。以上のデータは独立した 3 回の同様な実験データのうち代表的なものを示した。

Figure 4.　FoxP3^{+}CD8^{+}T 細胞は IL-6 依存的に加齢した F759 マウス内で増加する。

(A) 若齢（2 ヶ月齢）と加齢（10-12 ヶ月齢）の F759 マウスにおける血清中の IL-6 濃度を ELISA 法により測定した。図には平均値と標準偏差を示した。(B) 若齢野性型マウス（n=8)、加齢野性型マウス（n=15)、若齢 F759 マウス（n=7)、加齢 F759 マウス (n=7)、加齢 F759 マウス (n=13)、加齢 F759/IL-6KO マウス (n=5) よりリンパ節を取り出し、その CD4^{+}T 細胞の細胞内染色を行うことにより、FoxP3^{+}CD4^{+}T 細胞の細胞数を FACS 法により解析した。図にはそれぞれのマウスの細胞数（白丸）とその平均値（黒棒）を示し、p 値は t 検定により算出した（全ての組み合わせは有意差なし、P>0.05)。(C) (B) における FACS ヒストグラムと、CD4 陽性 T 細胞に占める FoxP3 陽性細胞の割合を示した。(D) (B) と同じサンプルにおける FoxP3^{+}CD8^{+}T 細胞の細胞数を解析した。図にはそれぞれのマウスの細胞数（白丸）とその平均値（黒棒）を示し、p 値は t 検定により算出した（それぞれ P=0.00430、P=0.00341)。(E) (D) における FACS ヒストグラムと、CD8 陽性 T 細胞に占める FoxP3 陽性の割合を示した。以上のデータは独立した 3 回の同様な実験データのうち代表的なものを示した。

Figure 5.　FoxP3 を欠如した CD8$^+$T 細胞を持つ F759 マウスは加齢と共に発症する自己免疫性関節炎の発症が、早期化、重症化する。

（A）骨髄移植キメラマウスより調整したリンパ節の細胞を細胞内染色により FACS 法で解析した。図には CD4$^+$T 細胞と CD8$^+$T 細胞の CD25$^+$FoxP3$^+$細胞を検出したヒストグラムを示した。(B) CD8KO/F759 と scurfy/F759 マウスの骨髄を混和した骨髄による骨髄移植キメラマウス（n=9、黒丸）とコントロールの F759 由来骨髄による骨髄移植キメラマウス（n=16、白丸）の関節炎の臨床経過を示した。図には関節炎のスコアの平均値と標準誤差（±SEM）を示し、p 値は t 検定により算出した(21$^-$, 22$^-$, 23$^-$, 24$^-$, 25$^-$, 26$^-$, 27$^-$, 28$^-$, 29$^-$, 30$^-$週齢;　それぞれ P= 0.0017, 0.0028, 0.0018, 0.00028, 0.011, 0.0052, 0.0046, 0.00052, 0.0035, 0.001)。

Figure S1.　CD4$^+$T 細胞と比較して CD8$^+$T 細胞は IL-6 に対する反応性が高く、その細胞数の増加が起きる。

Figure1 と同様に培養した CD4$^+$T 細胞（左図）と CD8$^+$T 細胞（右図）の１ウェルあたりの細胞数の平均値と標準偏差を示した。p 値は t 検定により算出した（*, p<0.05)。以上のデータは独立した３回の同様な実験データのうち代表的なものを示した。

Figure S2. CD4$^+$T 細胞と比較して CD8$^+$T 細胞は TGFβ によりその細胞増殖が抑制されやすい。

MoFlo により精製した CD25$^-$CD4$^+$T 細胞（左図）もしくは CD25$^-$CD8$^+$T 細胞（右図）を BMDC,抗 CD3 抗体と、さらに TGFβ を添加した群と非添加の群を作製して培養し、５日後の１ウェルあたりの細胞数の平均値と標準偏差をそれぞれグラフに表示した。p 値は t 検定により算出した（***, P=0.0042）以上のデータは独立した３回の同様な実験データのうち代表的なものを示した。

参考文献

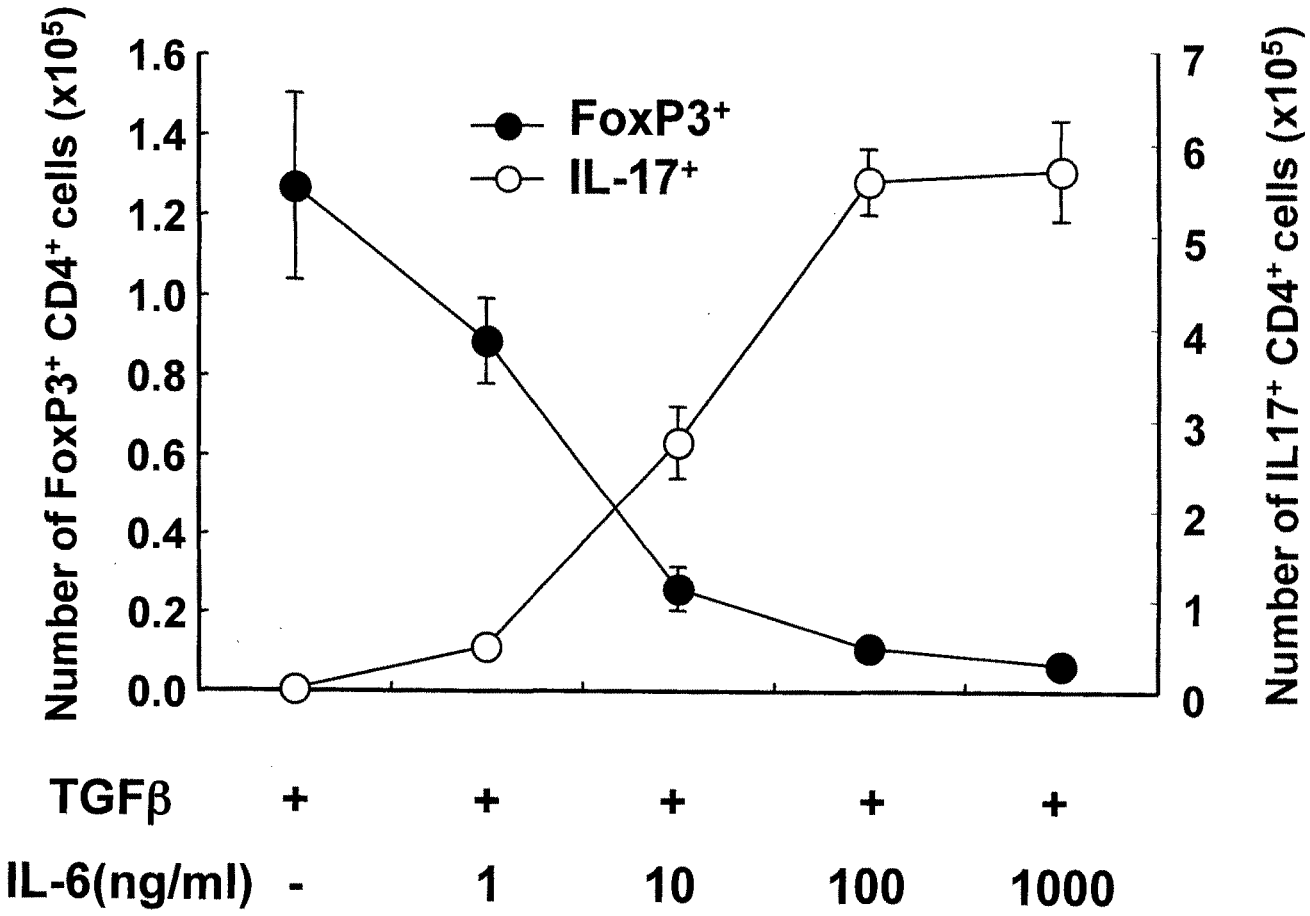
Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L., and Powrie, F. (1999). An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. J Exp Med *190*, 995-1004.
Atsumi, T., Ishihara, K., Kamimura, D., Ikushima, H., Ohtani, T., Hirota, S., Kobayashi, H., Park, S., Saeki, Y., Kitamura, Y., and Hirano, T. (2002). A point mutation of Tyr-759 in interleukin 6 family cytokine receptor subunit gp130 causes autoimmune arthritis. J Exp Med *196*, 979-990.
Bacchetta, R., Passerini, L., Gambineri, E., Dai, M., Allan, S. E., Perroni, L., Dagna-Bricarelli, F., Sartirana, C., Matthes-Martin, S., Lawitschka, A., *et al.* (2006). Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. J Clin Invest *116*, 1713-1722.
Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T., Oukka, M., Weiner, H., and Kuchroo, V. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. Nature *441*, 235-238.
Bhandoola, A., Tai, X., Eckhaus, M., Auchincloss, H., Mason, K., Rubin, S. A., Carbone, K. M., Grossman, Z., Rosenberg, A. S., and A., S. (2002). Peripheral expression of self-MHC-II influences the reactivity and self-tolerance of mature $CD4^+$ T cells: evidence from a lymphopenic T cell model. . Immunity *17*, 425-436.
Billerbeck, E., Blum, H. E., and Thimme, R. (2007). Parallel expansion of human virus-specific FoxP3- effector memory and de novo-generated $FoxP3^+$ regulatory $CD8^+$ T cells upon antigen recognition in vitro. J Immunol *179*, 1039-1048.
Boe, A., Baiocchi, M., Carbonatto, M., Papoian, R., and Serlupi-Crescenzi, O. (1999). Interleukin 6 knock-out mice are resistant to antigen-induced experimental arthritis. Cytokine *11*, 1057-1064.
Campbell, I., Kay, T., Oxbrow, L., and Harrison, L. (1991). Essential role for interferon-γ and interleukin-6 in autoimmune insulin-dependent diabetes in NOD/Wehi mice. Journal of Clinical Investigation *87*, 739-742.
Conti, B., Tabarean, I., Andrei, C., and Bartfai, T. (2004). Cytokines and fever. Front Biosci *9*, 1433-1449.
Cua, D. J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C. A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., *et al.* (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. Nature *421*, 744-748.
Dayer E, D. J., Roux-Lombard P. (2007). Primer: the practical use of biological markers of rheumatic and systemic inflammatory diseases. Nat Clin Pract Rheumatol *3*, 512-520.

Fontenot, J. D., M. A. Gavin, A. Y. Rudensky. (2003). FoxP3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. . Nat Immunol *4*, 330-336.
Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M., and Weaver, C. T. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nat Immunol *6*, 1123-1132.
Hata, H., Sakaguchi, N., Yoshitomi, H., Iwakura, Y., Sekikawa, K., Azuma, Y., Kanai, C., Moriizumi, E., Nomura, T., Nakamura, T., and Sakaguchi, S. (2004). Distinct contribution of IL-6, TNF-alpha, IL-1, and IL-10 to T cell-mediated spontaneous autoimmune arthritis in mice. J Clin Invest *114*, 582-588.
Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S., Nakajima, K., Koyama, K., Iwamatsu, A., *et al.* (1986). Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. Nature *324*, 73-76.
Hirota, K., Hashimoto, M., Yoshitomi, H., Tanaka, S., Nomura, T., Yamaguchi, T., Iwakura, Y., Sakaguchi, N., and Sakaguchi, S. (2007). T cell self-reactivity forms a cytokine milieu for spontaneous development of IL-17+ Th cells that cause autoimmune arthritis. J Exp Med *204*, 41-47.
Hori, S., T. Nomura, S. Sakaguchi. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor FoxP3. Science *299*, 1057-1061.
Jiang, L., Yang, P., He, H., Li, B., Lin, X., Hou, S., Zhou, H., Huang, X., and Aize, K. (2007). Increased expression of FoxP3 in splenic CD8+ T cells from mice with anterior chamber-associated immune deviation. Mol Vis *13*, 968-974.
Kamimura, D., Ishihara, K., and Hirano, T. (2003). IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. Rev Physiol Biochem Pharmacol *149*, 1-38.
Kapp, J. A., Honjo, K., Kapp, L. M., Xu, X., Cozier, A., and Bucy, R. P. (2006). TCR transgenic CD8+ T cells activated in the presence of TGFbeta express FoxP3 and mediate linked suppression of primary immune responses and cardiac allograft rejection. Int Immunol *18*, 1549-1562.
Khattri, R., T. Cox, S. A. Yasayko, F. Ramsdell. (2003). An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. Nat Immunol *4*, 337-342.
Komatsu, N., and Hori, S. (2007). Full restoration of peripheral FoxP3+ regulatory T cell pool by radioresistant host cells in scurfy bone marrow chimeras. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 8959-8964.
Kullberg, M. C., Hay, V., Cheever, A. W., Mamura, M., Sher, A., Letterio, J. J., Shevach, E. M., and Piccirillo, C. A. (2005). TGF-beta1 production by CD4+ CD25+ regulatory T cells is not essential for suppression of intestinal inflammation. Eur J Immunol *35*, 2886-2895.
Kyewski, B., and Klein, L. (2006). A central role for central tolerance. Annu Rev Immunol *24*, 571-606.

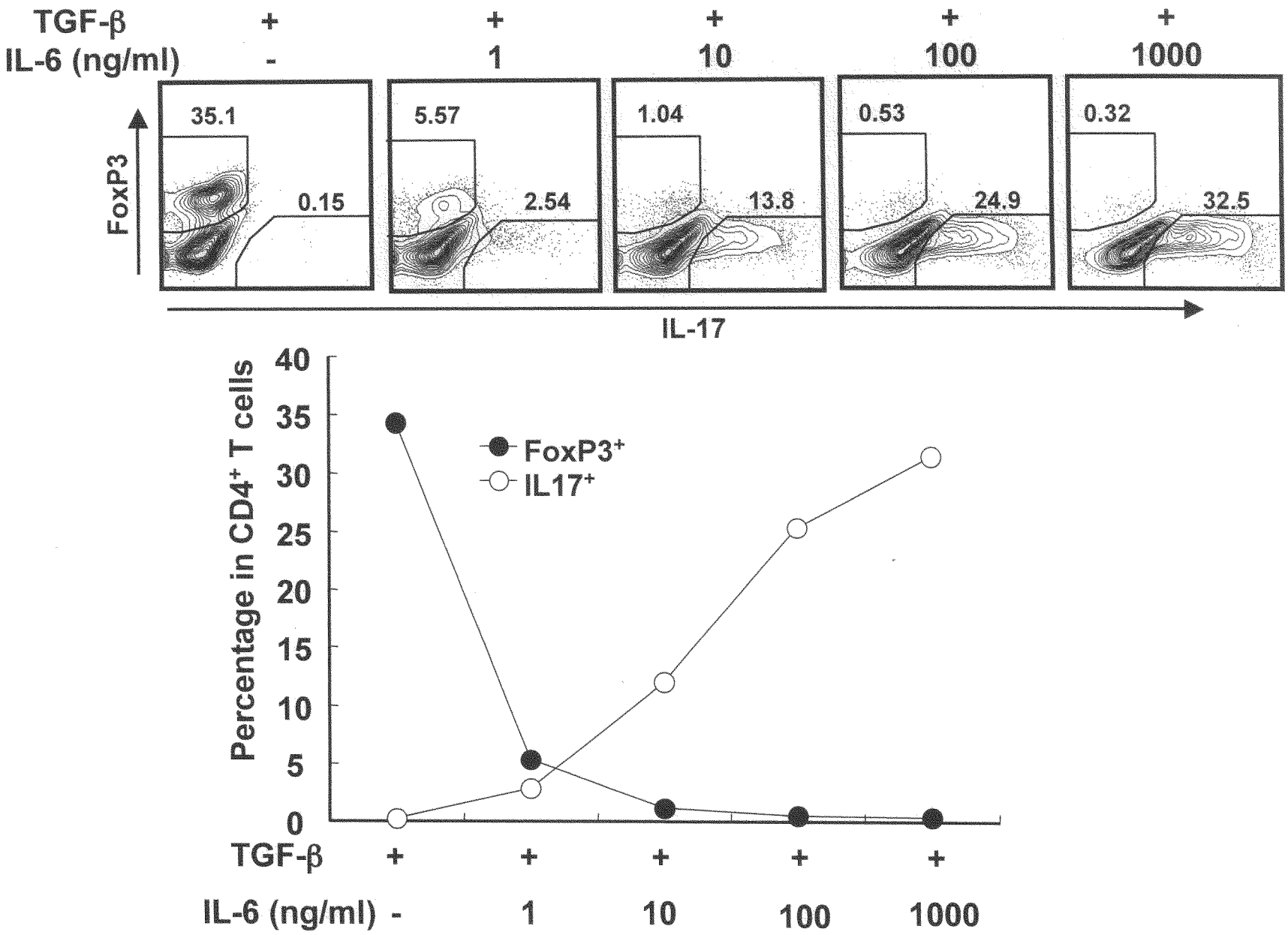
Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W. M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J. D., McClanahan, T., Kastelein, R. A., and Cua, D. J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. J Exp Med *201*, 233-240.
Manavalan, J. S., Kim-Schulze, S., Scotto, L., Naiyer, A. J., Vlad, G., Colombo, P. C., Marboe, C., Mancini, D., Cortesini, R., and Suciu-Foca, N. (2004). Alloantigen specific CD8$^+$CD28$^-$ FOXP3$^+$ T suppressor cells induce ILT3$^+$ ILT4$^+$ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. Int Immunol *16*, 245-258.
Mangan, P. R., Harrington, L. E., O'Quinn, D. B., Helms, W. S., Bullard, D. C., Elson, C. O., Hatton, R. D., Wahl, S. M., Schoeb, T. R., and Weaver, C. T. (2006). Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. Nature *441*, 231-234.
Nishihara, M., Ogura, H., Ueda, N., Tsuruoka, M., Kitabayashi, C., Tsuji, F., Aono, H., Ishihara, K., Huseby, E., Betz, U. A., *et al.* (2007). IL-6-gp130-STAT3 in T cells directs the development of IL-17$^+$ Th with a minimum effect on that of Treg in the steady state. Int Immunol *19*, 695-702.
Noble, A., Giorgini, A., and Leggat, J. A. (2006). Cytokine-induced IL-10-secreting CD8 T cells represent a phenotypically distinct suppressor T-cell lineage. Blood *107*, 4475-4483.
Ohtani, T., Ishihara, K., Atsumi, T., Nishida, K., Kaneko, Y., Miyata, T., Itoh, S., Narimatsu, M., Maeda, H., Fukada, T., *et al.* (2000). Dissection of signaling cascades through gp130 in vivo: reciprocal roles for STAT3- and SHP2-mediated signals in immune responses. Immunity *12*, 95-105.
Okuda, Y., Sakoda, S., Bernard, C., Fujimura, H., Saeki, Y., Kishimoto, T., and Yanagihara, T. (1998). IL-6-deficient mice are resistant to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis provoked by myelin oligodendrocyte glycoprotein. Int Immunol *10*, 703-708.
Park, H., Li, Z., Yang, X. O., Chang, S. H., Nurieva, R., Wang, Y. H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., and Dong, C. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. Nat Immunol *6*, 1133-1141.
Park, S., Nakagawa, T., Kitamura, H., Atsumi, T., Kamon, H., Sawa, S., Kamimura, D., Ueda, N., Iwakura, Y., Ishihara, K., *et al.* (2004). IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation. J Immunol *173*, 3844-3854.
Read, S., Greenwald, R., Izcue, A., Robinson, N., Mandelbrot, D., Francisco, L., Sharpe, A. H., and Powrie, F. (2006). Blockade of CTLA-4 on CD4$^+$CD25$^+$ regulatory T cells abrogates their function in vivo. J Immunol *177*, 4376-4383.
Read, S., V. Malmstrom, F. Powrie. (2000). Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25$^+$CD4$^+$ regulatory cells that control intestinal inflammation. J Exp Med *192*, 295-302.
Sakaguchi, S. (2000). Regulatory T cells: key controllers of immunologic

self-tolerance. . Cell *101*, 455-458.
Sakaguchi, S. (2004). Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. . Annu Rev Immunol *22*, 531-562.
Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T., and Nomura, T. (2006). FoxP3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. Immunol Rev *212*, 8-27.
Sasai, M., Saeki, Y., Ohshima, S., Nishioka, K., Mima, T., Tanaka, T., Katada, Y., Yoshizaki, K., Suemura, M., and Kishimoto, T. (1999). Delayed onset and reduced severity of collagen-induced arthritis in interleukin-6-deficient mice. Arthritis Rheum *42*, 1635-1643.
Sawa, S., Kamimura, D., Jin, G. H., Morikawa, H., Kamon, H., Nishihara, M., Ishihara, K., Murakami, M., and Hirano, T. (2006). Autoimmune arthritis associated with mutated interleukin (IL)-6 receptor gp130 is driven by STAT3/IL-7-dependent homeostatic proliferation of CD4+ T cells. J Exp Med *12*, 1459-1470.
Shevach, E. (2000). Regulatory T cells in autoimmmunity. Annu Rev Immunol *18*, 423-449.
Shimizu, J., S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida, S. Sakaguchi. (2002). Stimulation of CD25+CD4+ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. . Nat Immunol *3*, 135-142.
Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T. W. Mak, S. Sakaguchi. (2000). Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. . J Exp Med *192*, 303-310.
Taniguchi, M., Harada, M., Kojo, S., Nakayama, T., and Wakao, H. (2003). The regulatory role of Valpha14 NKT cells in innate and acquired immune response. Annu Rev Immunol *21*, 483-513.
Veldhoen, M., Hocking, R., Atkins, C., Locksley, R., and Stockinger, B. (2006). TGF in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. Immunity *24*, 179-189.
Walker, L. S., and K., A. A. (2002). The enemy within: keeping self reactive T cells at bay in the periphery. . Nat Rev Immunol *2*, 11-19.
Zheng, S. G., Wang, J. H., Koss, M. N., Quismorio, J., F.,, Gray, J. D., and Horwitz. D.A. (2004). CD4+ and CD8+ regulatory T cells generated ex vivo with IL-2 and TGF- suppress a stimulatory graft-versus-host disease with a lupus-like syndrome. J Immunol *172*, 1531-1539.

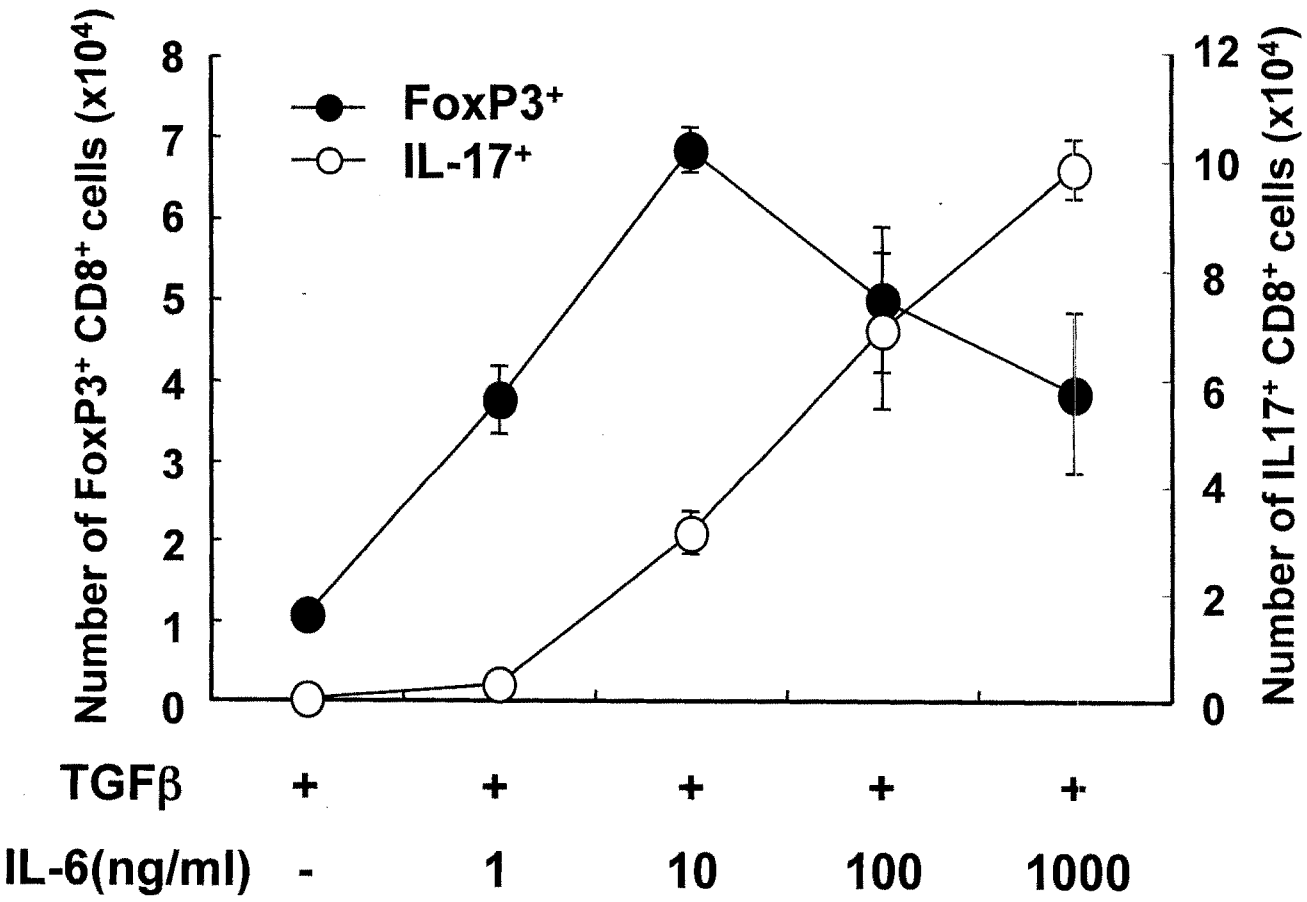
中川貴之 Fig. 1A


Number of FoxP3+ CD4+ cells (x10^5)
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
FoxP3+
IL-17+
Number of IL17+ CD4+ cells (x10^5)
7
6
5
4
3
2
1
0
TGFβ + + + + +
IL-6(ng/ml) - 1 10 100 1000

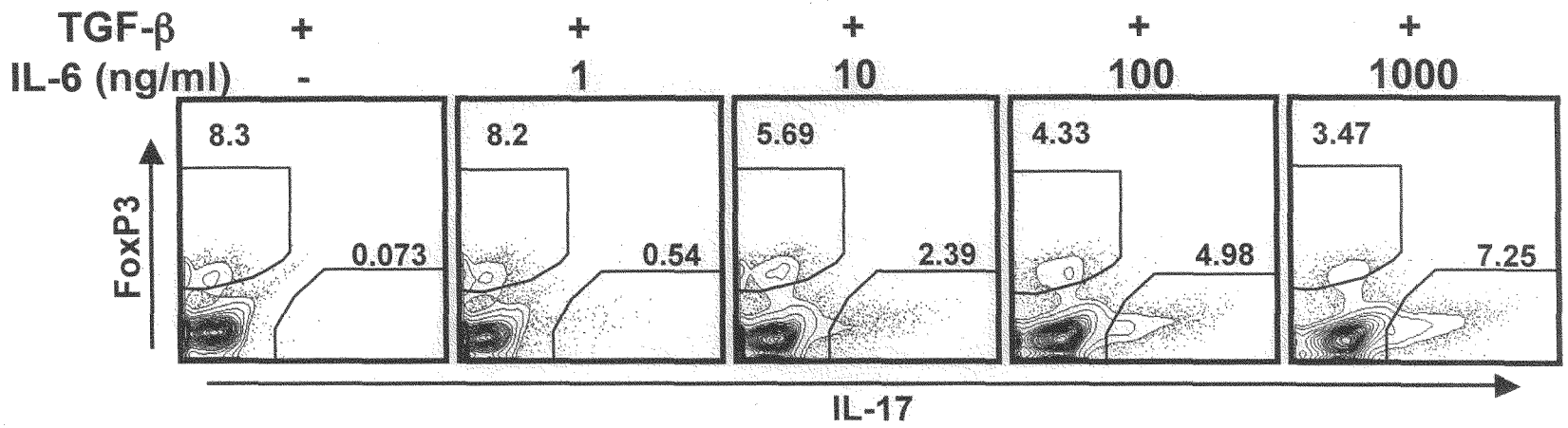
中川貴之 Fig. 1B

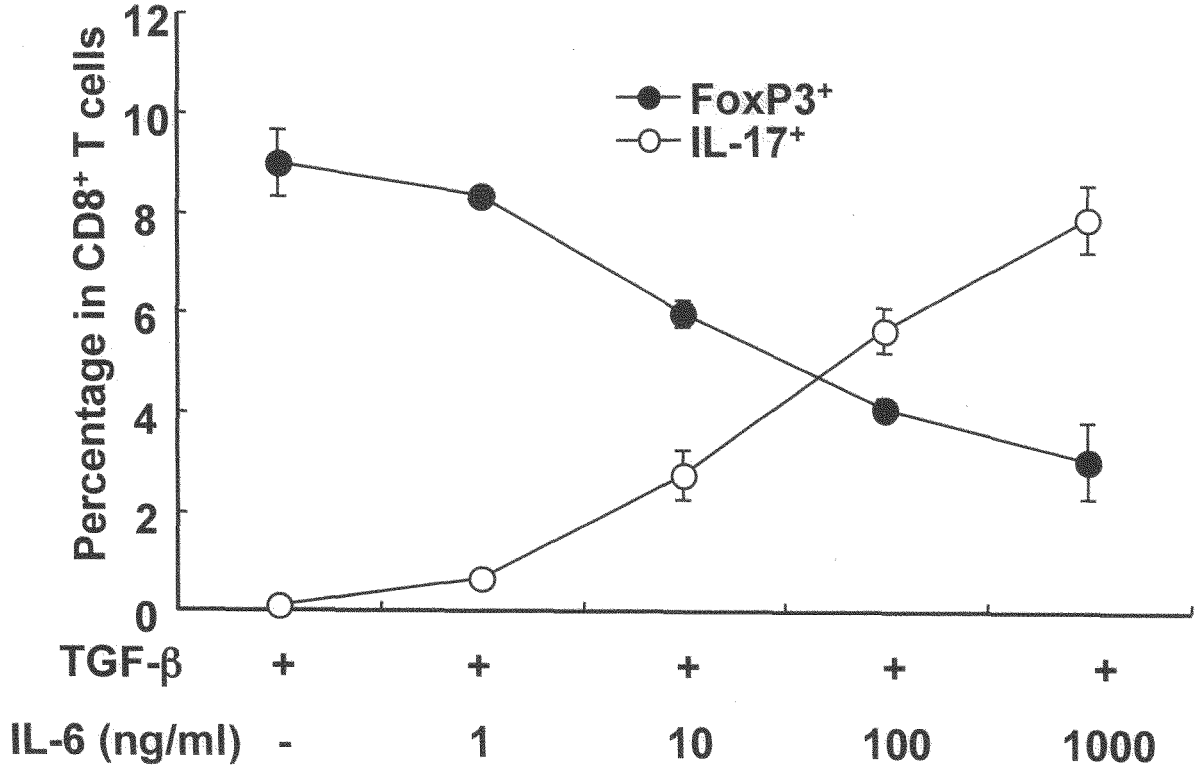

TGF-β + + + + +
IL-6 (ng/ml) - 1 10 100 1000
35.1
0.15
5.57
2.54
1.04
13.8
0.53
24.9
0.32
32.5
FoxP3
IL-17
Percentage in CD4+ T cells
40
35
30
25
20
15
10
5
0
FoxP3+
IL17+
TGF-β + + + + +
IL-6 (ng/ml) - 1 10 100 1000

中川貴之 Fig. 1C

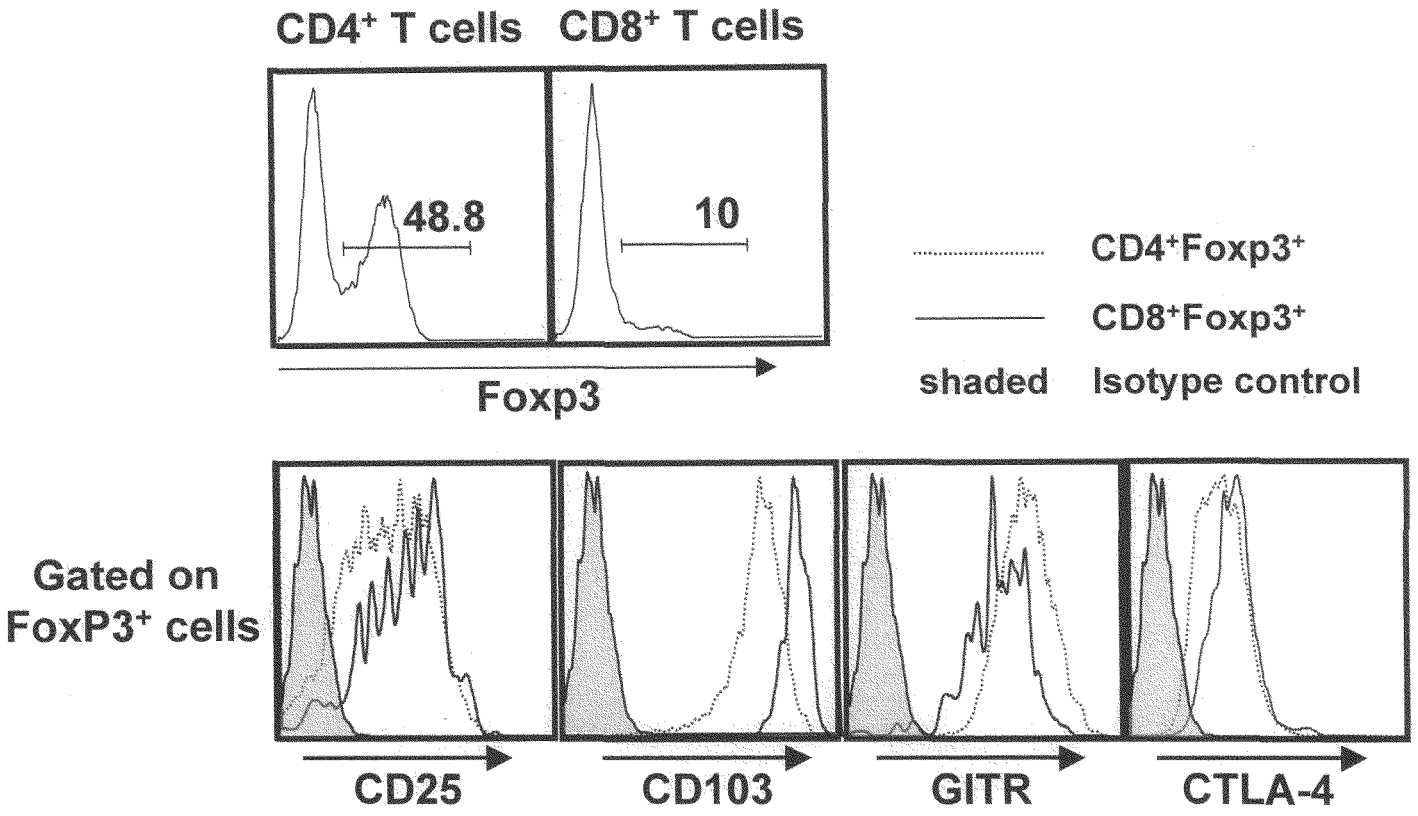

FoxP3+
IL-17+
Number of FoxP3+ CD8+ cells (x10^4)
Number of IL17+ CD8+ cells (x10^4)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
0
2
4
6
8
10
12
TGFβ + + + + +
IL-6(ng/ml) - 1 10 100 1000

中川貴之 Fig. 1D

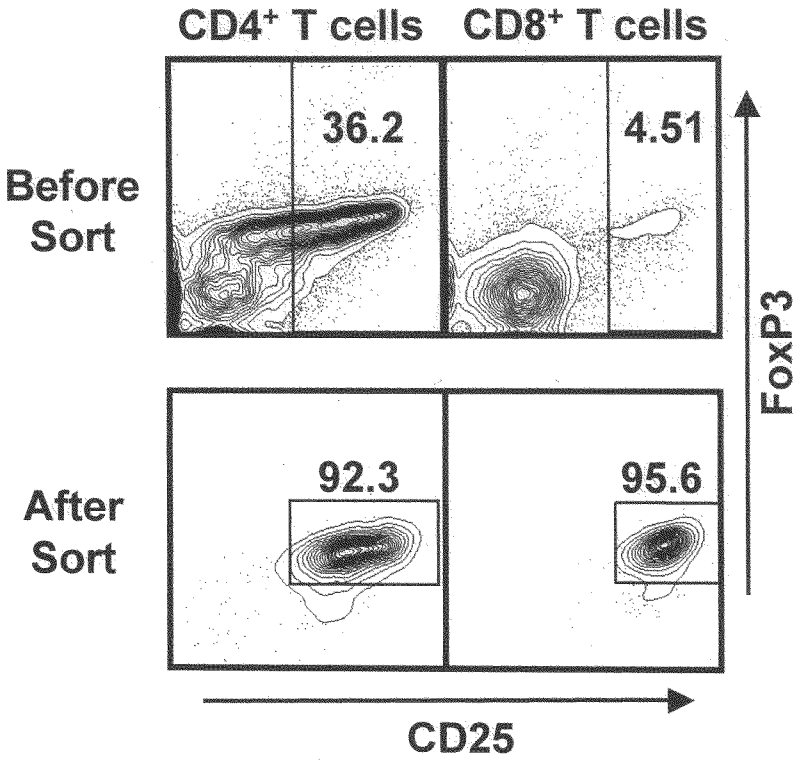

TGF-β + + + + +
IL-6 (ng/ml) - 1 10 100 1000
8.3
0.073
8.2
0.54
5.69
2.39
4.33
4.98
3.47
7.25
FoxP3
IL-17


Percentage in CD8+ T cells
0
2
4
6
8
10
12
FoxP3+
IL-17+
TGF-β + + + + +
IL-6 (ng/ml) - 1 10 100 1000

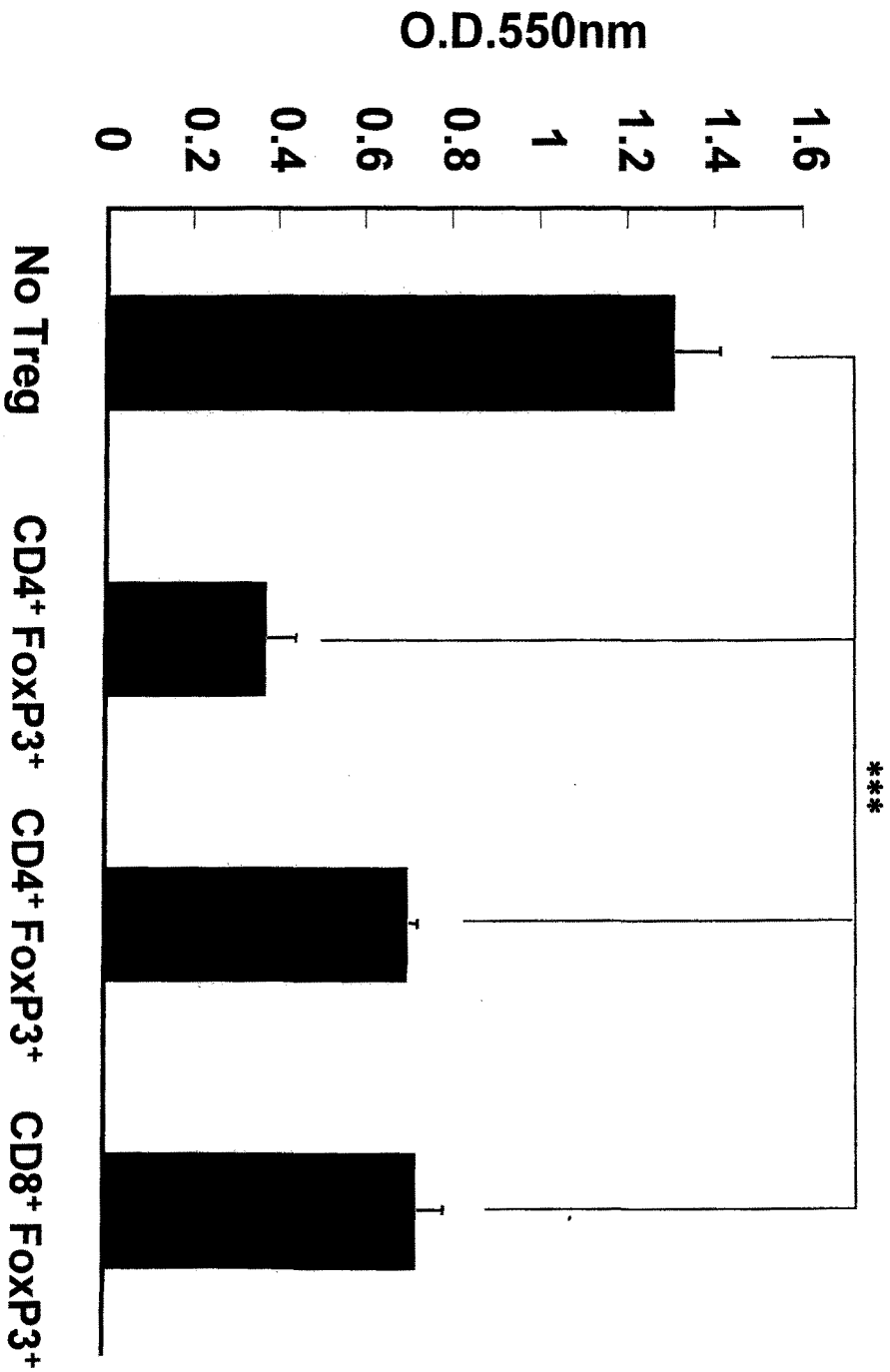
中川貴之 Fig. 2A


CD4+ T cells
CD8+ T cells
48.8
10
Foxp3
CD4+Foxp3+
CD8+Foxp3+
shaded
Isotype control
Gated on
FoxP3+ cells
CD25
CD103
GITR
CTLA-4

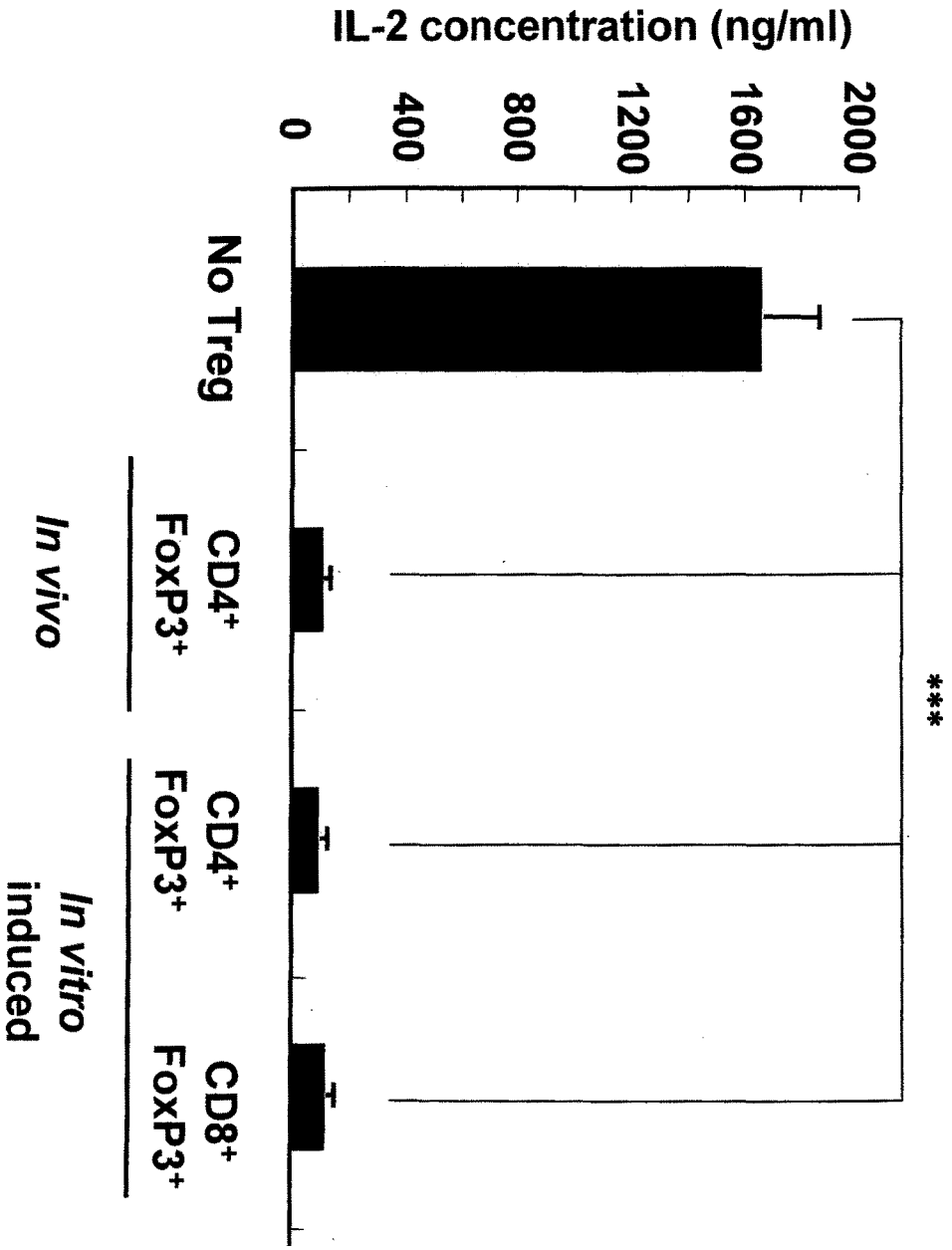
中川貴之 Fig. 2B


CD4+ T cells
CD8+ T cells
Before Sort
After Sort
36.2
4.51
92.3
95.6
FoxP3
CD25

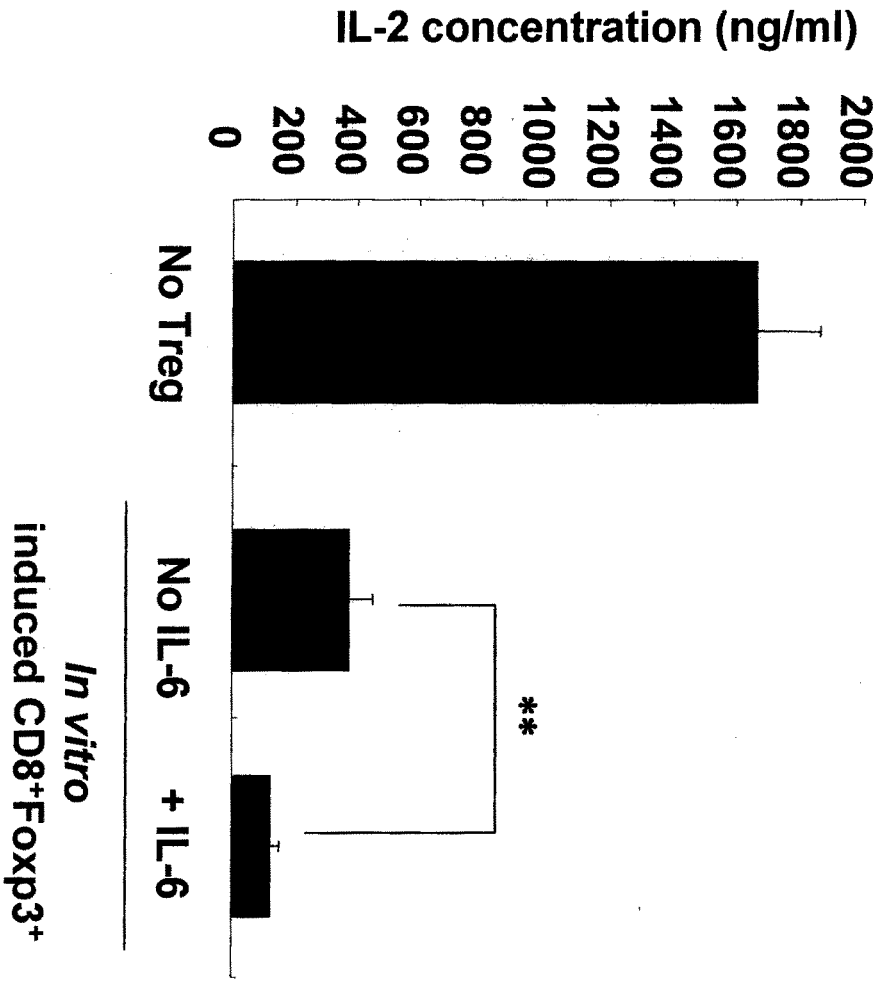
中川貴之 Fig. 2C


O.D.550nm
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
***
No Treg
CD4+ FoxP3+
CD4+ FoxP3+
CD8+ FoxP3+
In vivo
In vitro
induced

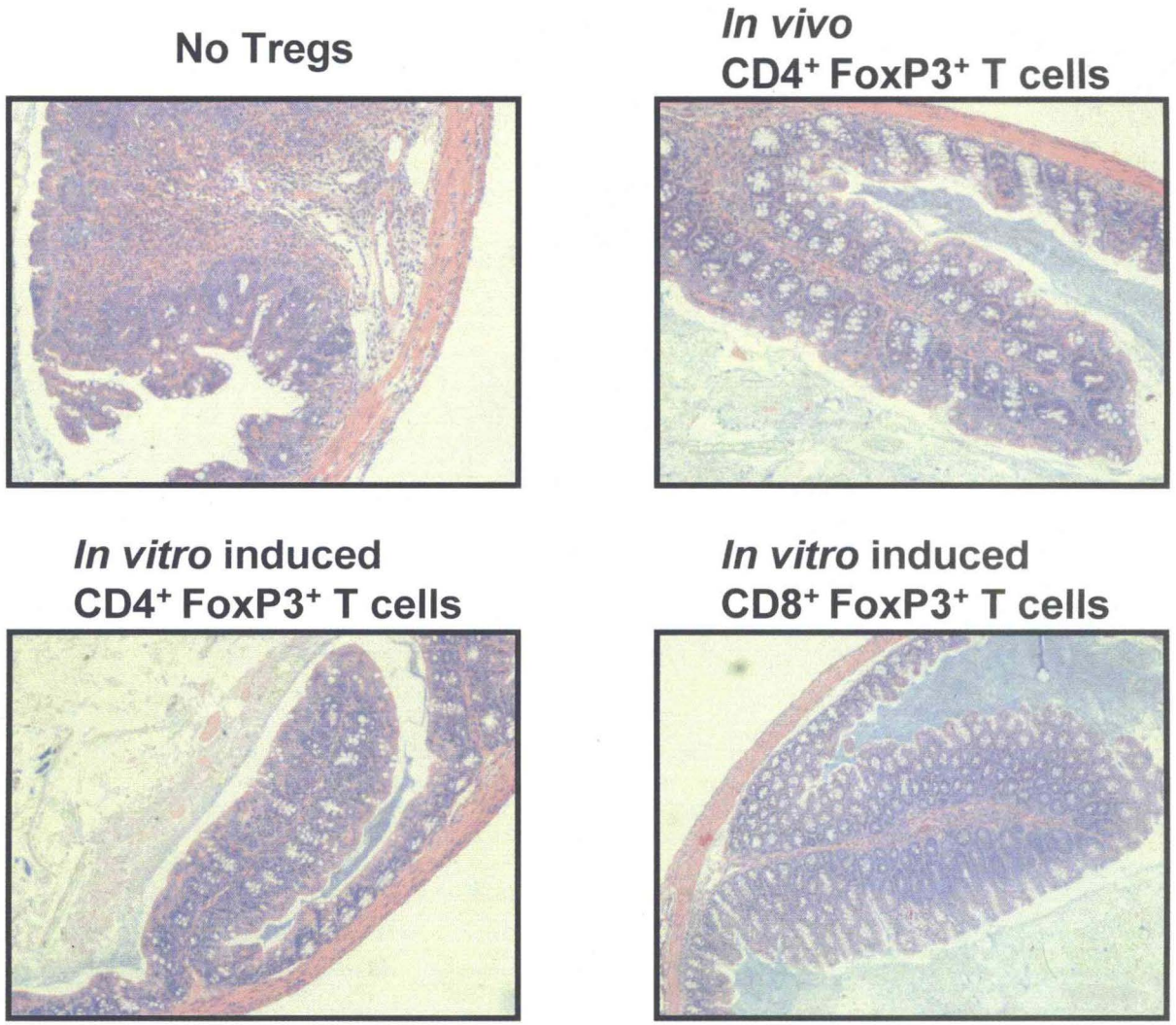
中川貴之 Fig. 2D


IL-2 concentration (ng/ml)
2000
1600
1200
800
400
0
***
No Treg
CD4+ FoxP3+
CD4+ FoxP3+
CD8+ FoxP3+
In vivo
In vitro induced

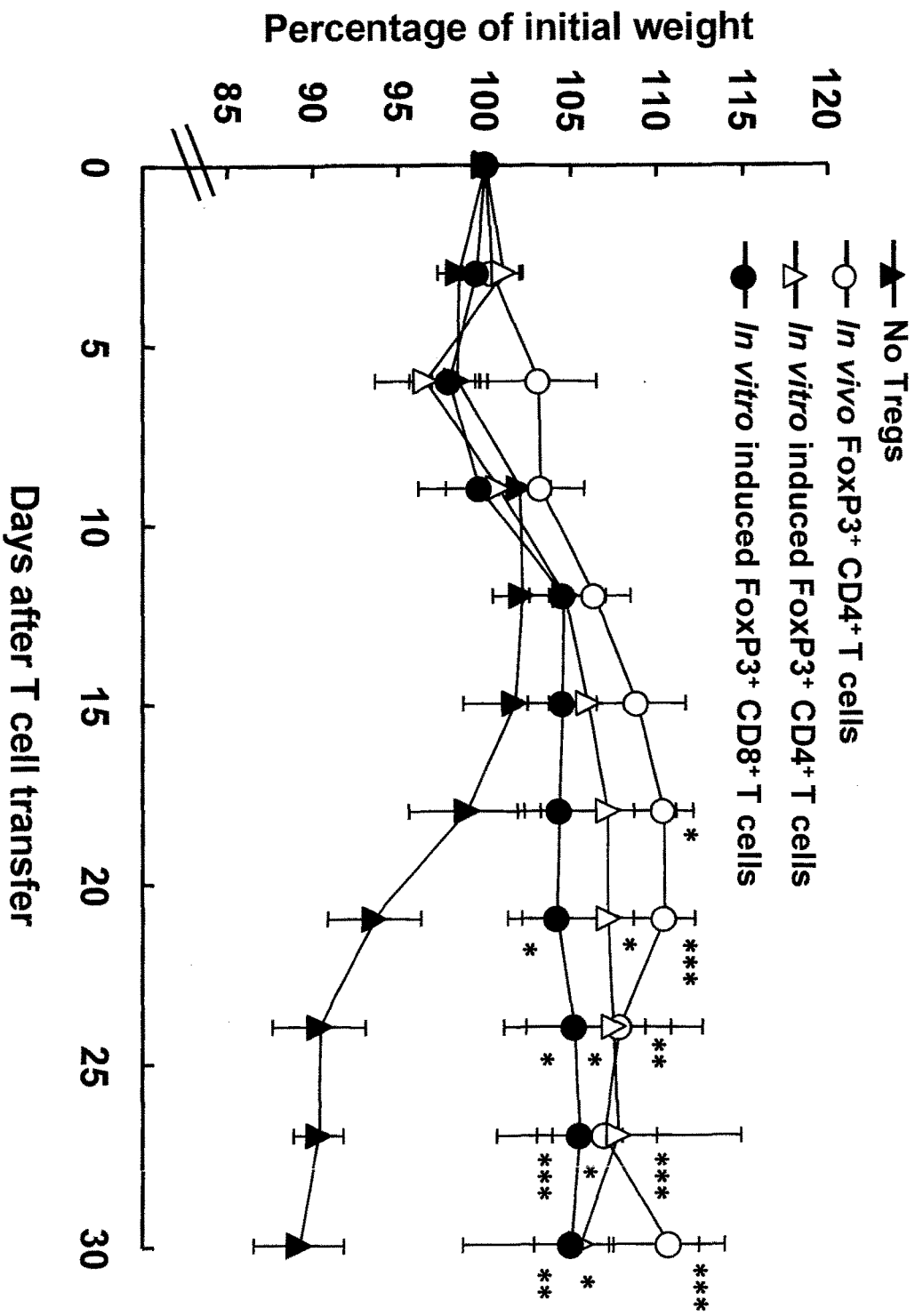
中川貴之 Fig. 2E


IL-2 concentration (ng/ml)
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
**
No Treg
No IL-6
+ IL-6
In vitro
induced CD8+Foxp3+

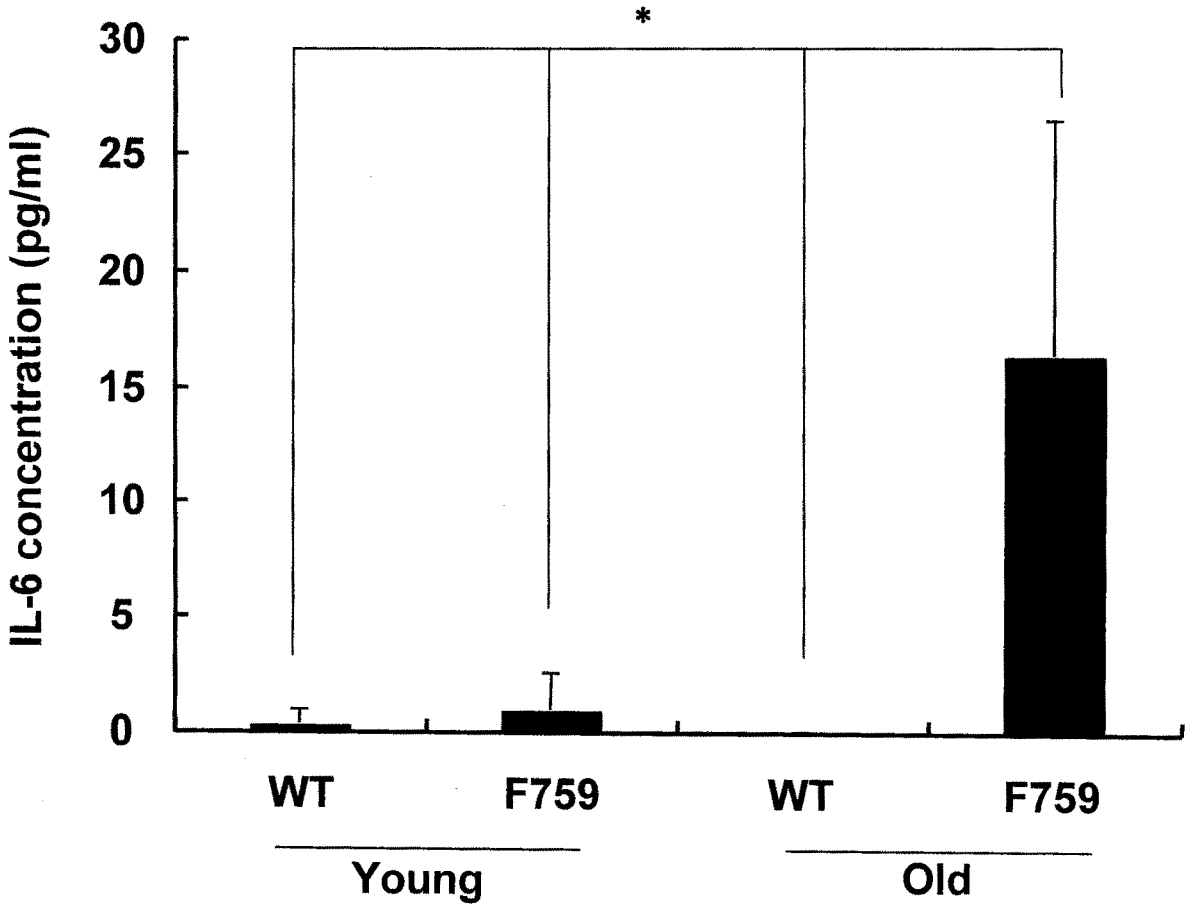
中川貴之 Fig. 3A


No Tregs
In vivo
CD4+ FoxP3+ T cells
In vitro induced
CD4+ FoxP3+ T cells
In vitro induced
CD8+ FoxP3+ T cells

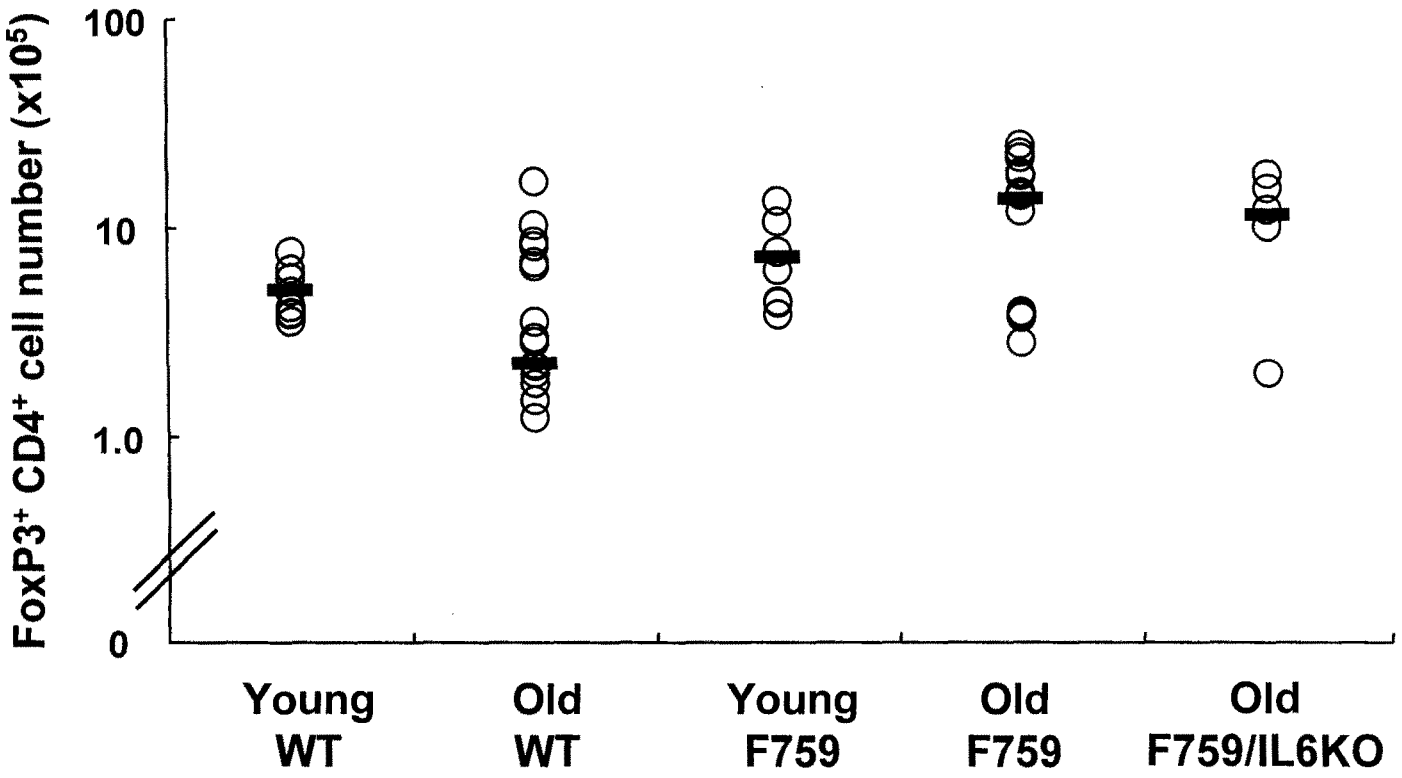
中川貴之 Fig. 3B


No Tregs
In vivo FoxP3+ CD4+ T cells
In vitro induced FoxP3+ CD4+ T cells
In vitro induced FoxP3+ CD8+ T cells
Percentage of initial weight
120
115
110
105
100
95
90
85
0
5
10
15
20
25
30
Days after T cell transfer

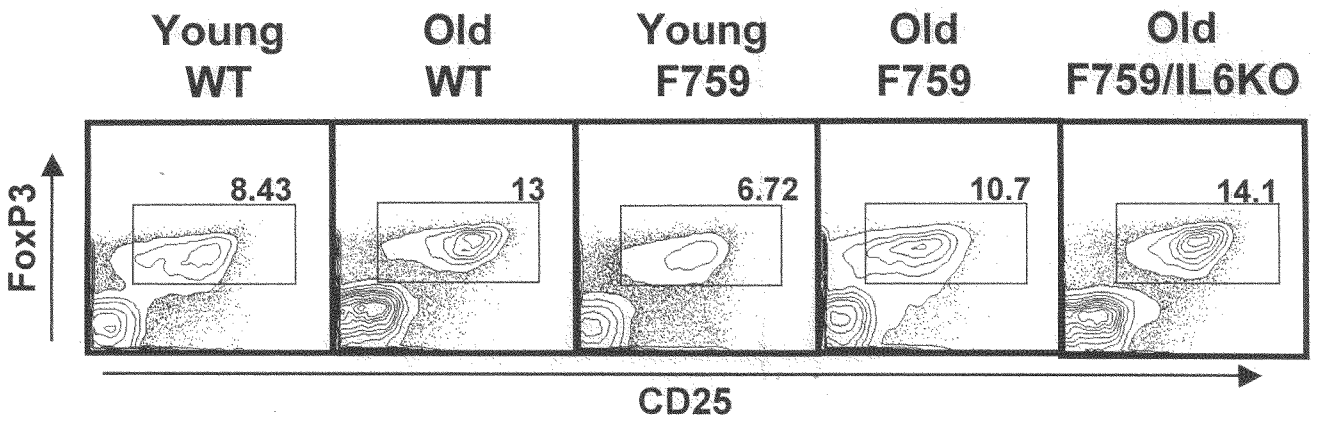
中川貴之 Fig. 4A

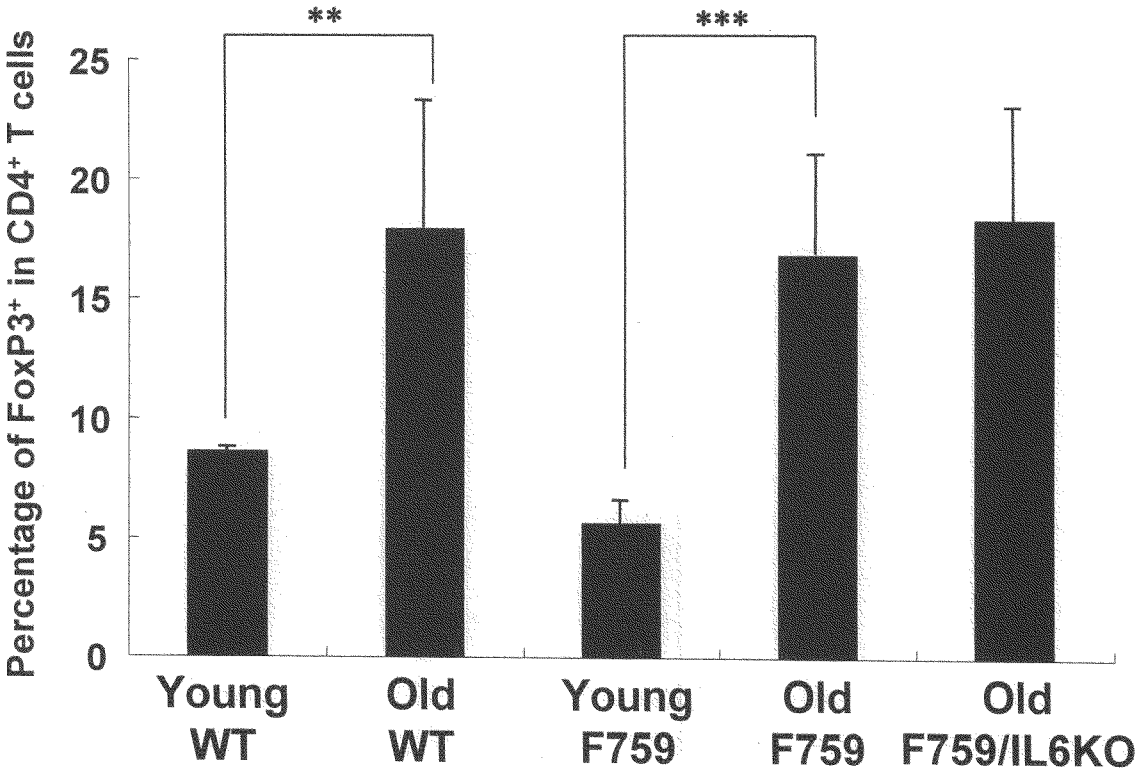

*
30
25
20
15
10
5
0
IL-6 concentration (pg/ml)
WT
F759
WT
F759
Young
Old

中川貴之 Fig. 4B

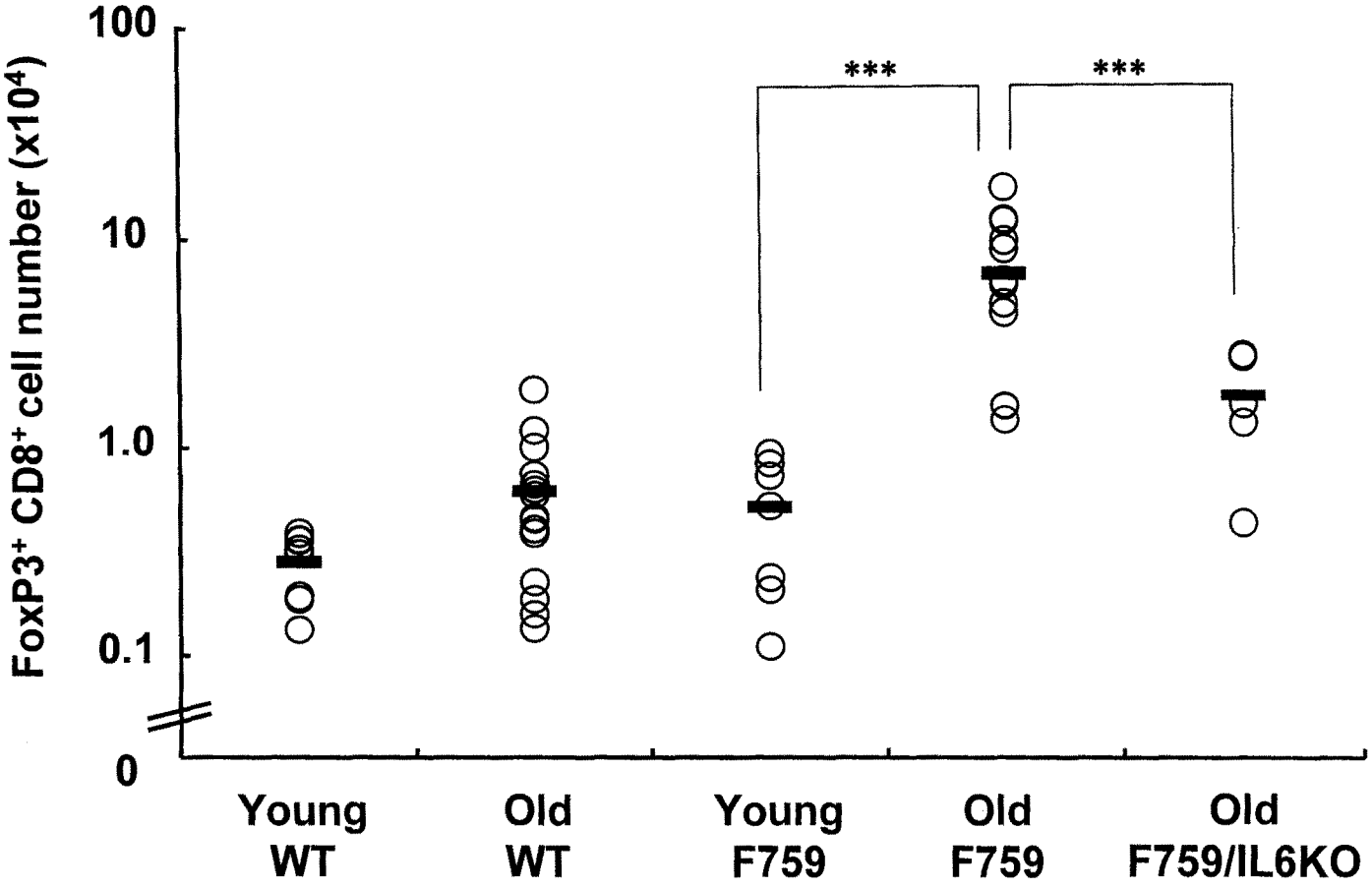

FoxP3+ CD4+ cell number (x10^5)
100
10
1.0
0
Young WT
Old WT
Young F759
Old F759
Old F759/IL6KO

中川貴之 Fig. 4C

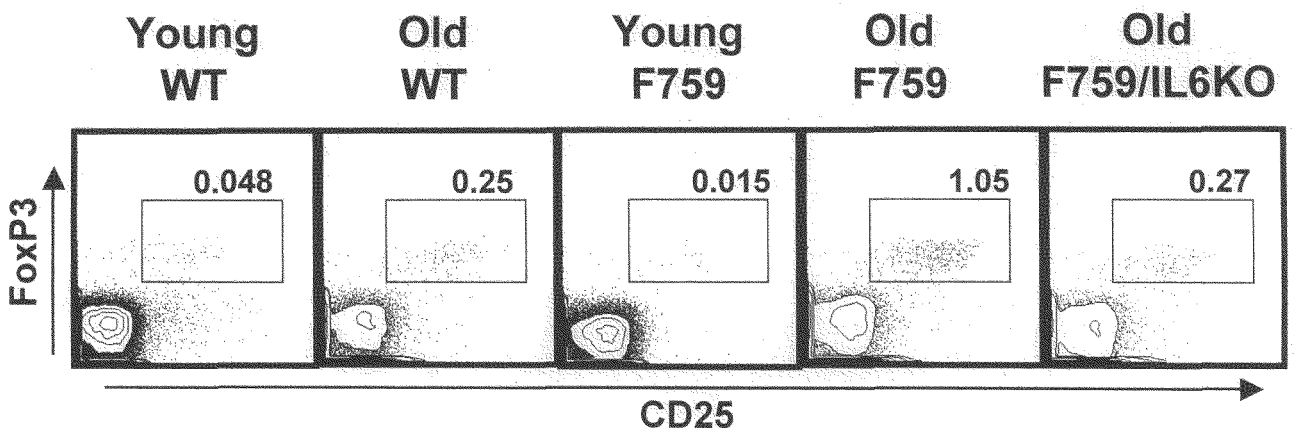

Young WT
Old WT
Young F759
Old F759
Old F759/IL6KO
FoxP3
8.43
13
6.72
10.7
14.1
CD25

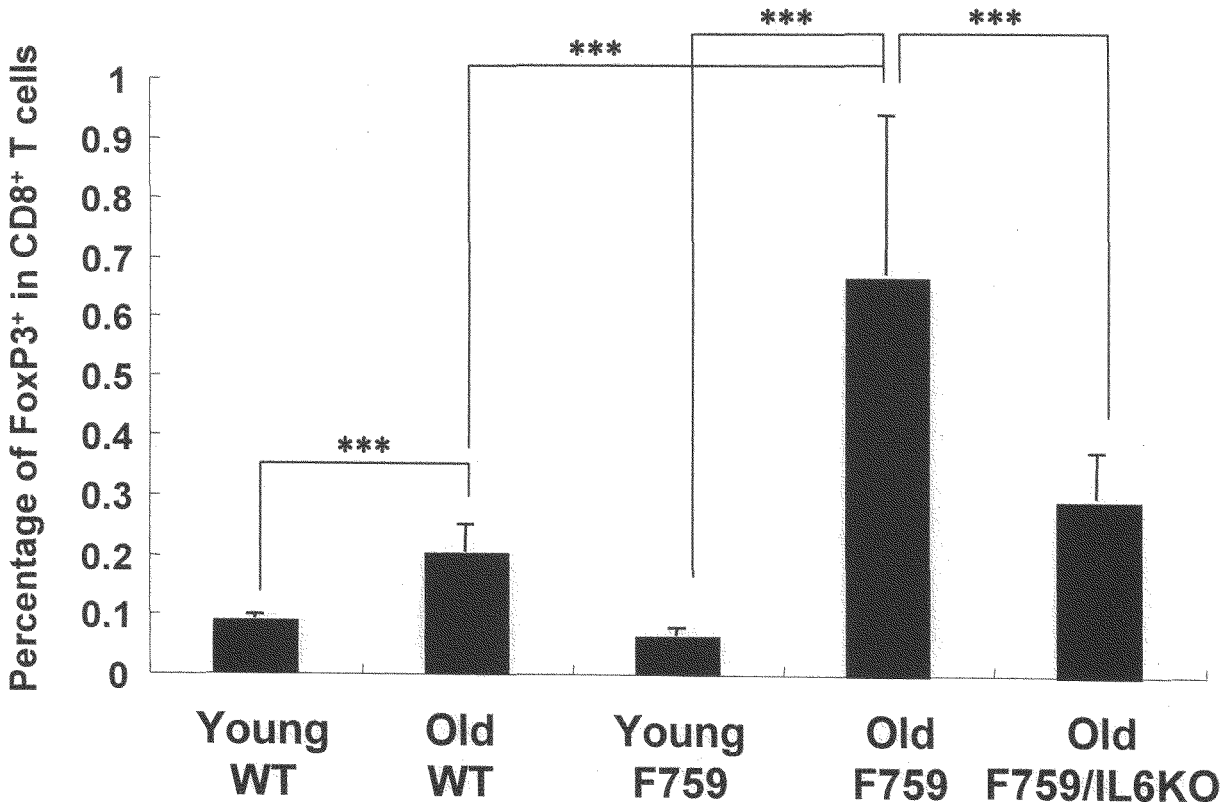

Percentage of FoxP3+ in CD4+ T cells
25
20
15
10
5
0
**
***
Young WT
Old WT
Young F759
Old F759
Old F759/IL6KO

中川貴之 Fig. 4D

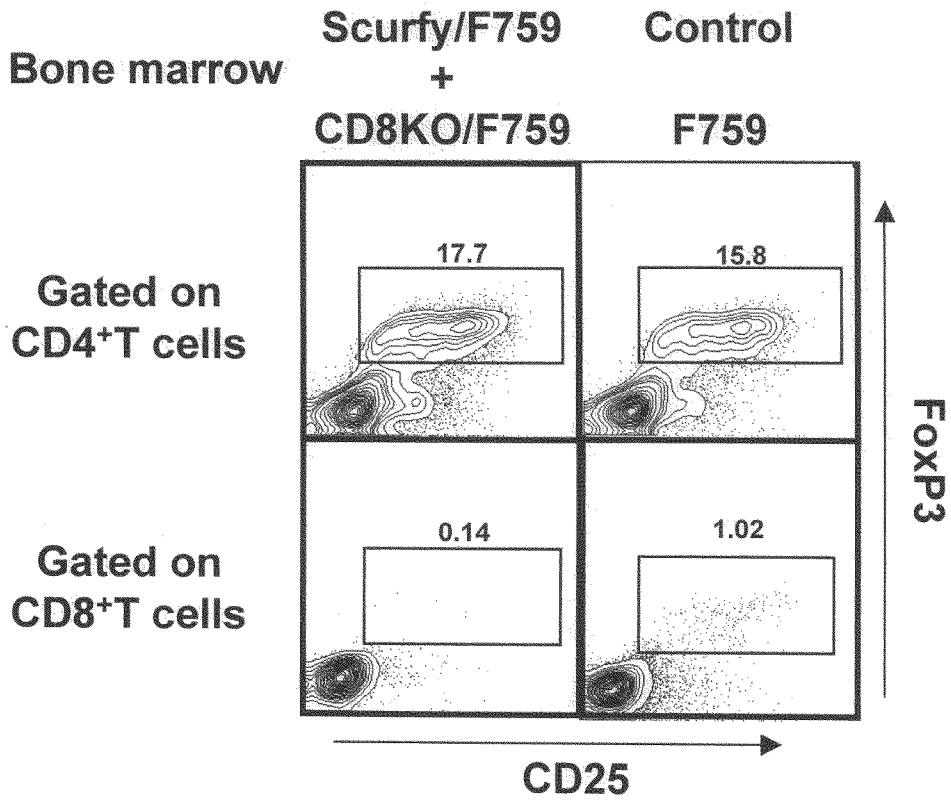

FoxP3+ CD8+ cell number (x10^4)
100
10
1.0
0.1
0
***
***
Young WT
Old WT
Young F759
Old F759
Old F759/IL6KO

中川貴之 Fig. 4E

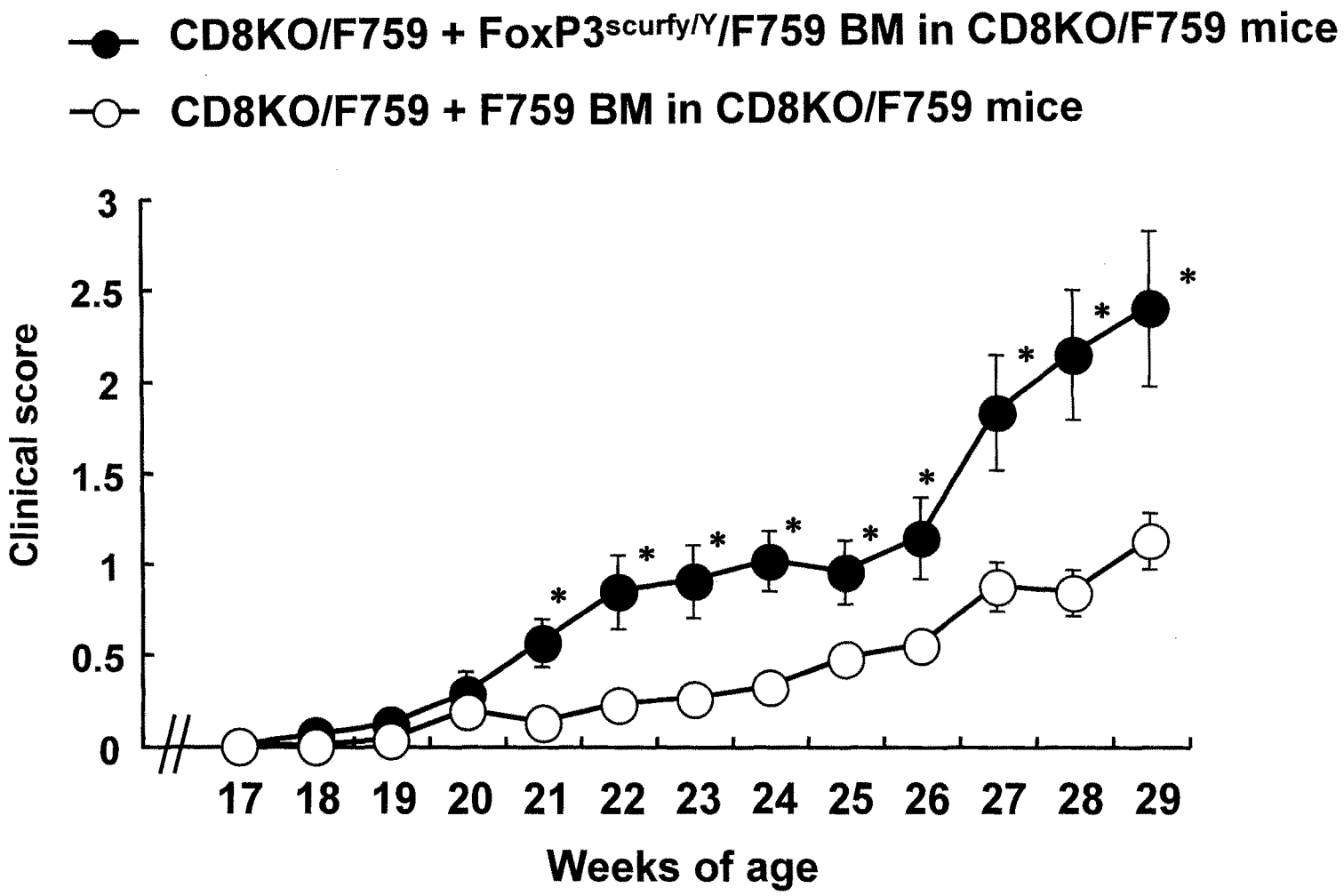

Young WT
Old WT
Young F759
Old F759
Old F759/IL6KO
0.048
0.25
0.015
1.05
0.27
FoxP3
CD25


Percentage of FoxP3+ in CD8+ T cells
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
***
***
***
***
Young WT
Old WT
Young F759
Old F759
Old F759/IL6KO

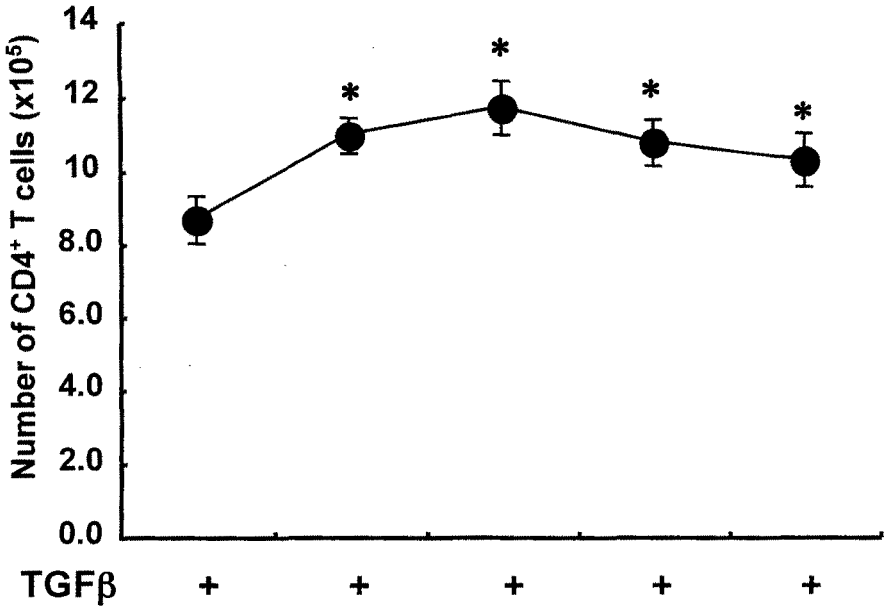
中川貴之 Fig. 5A

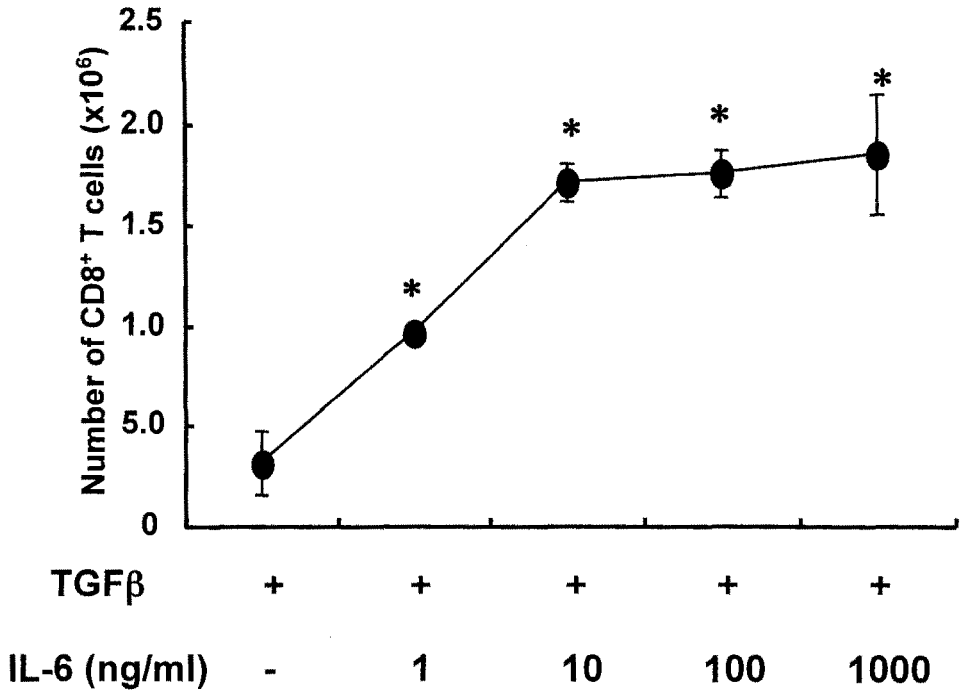

Bone marrow
Scurfy/F759
+
CD8KO/F759
Control
F759
Gated on
CD4+T cells
Gated on
CD8+T cells
17.7
15.8
0.14
1.02
FoxP3
CD25

中川貴之 Fig. 5B

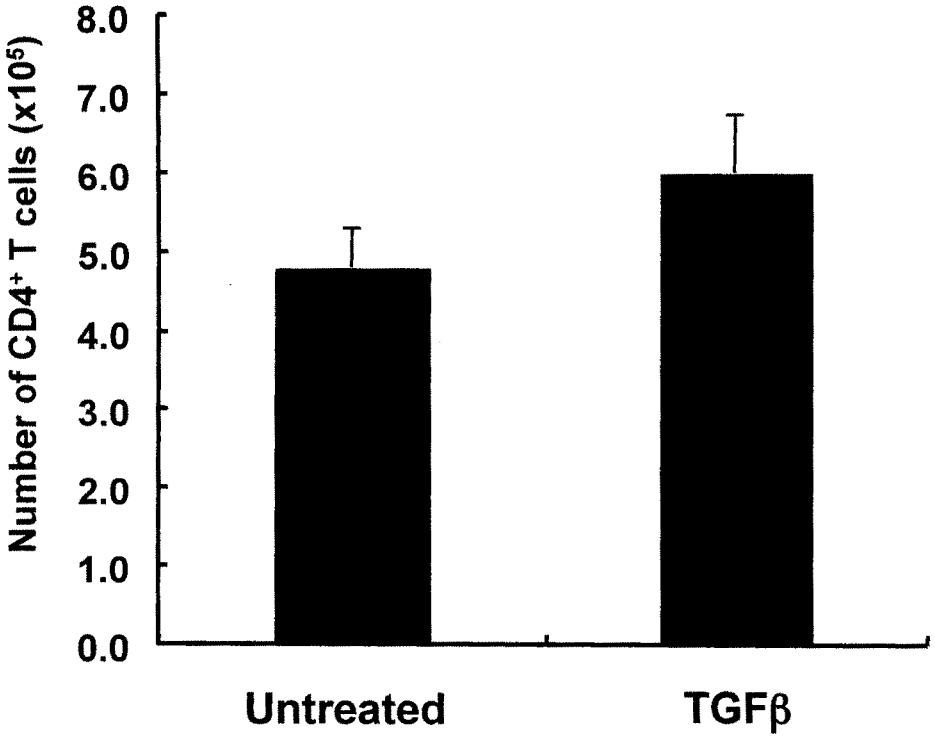

CD8KO/F759 + FoxP3scurfy/Y/F759 BM in CD8KO/F759 mice
CD8KO/F759 + F759 BM in CD8KO/F759 mice
Clinical score
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29
Weeks of age

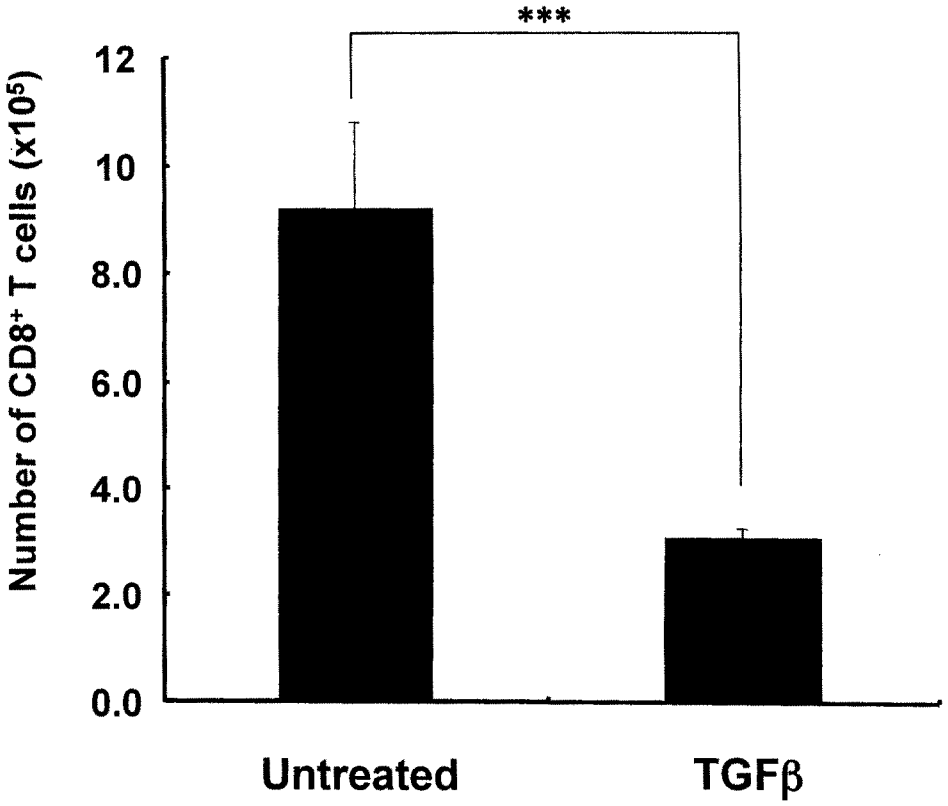
中川貴之 Fig. S1


Number of CD4+ T cells (x10^5)
14
12
10
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
TGFβ + + + + +
IL-6 (ng/ml) - 1 10 100 1000


Number of CD8+ T cells (x10^6)
2.5
2.0
1.5
1.0
5.0
0
TGFβ + + + + +
IL-6 (ng/ml) - 1 10 100 1000

中川貴之 Fig. S2


Number of CD4+ T cells (x10^5)
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
Untreated
TGFβ


***
Number of CD8+ T cells (x10^5)
12
10
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
Untreated
TGFβ

業績

発表論文等

Sung-Joo Park, Takayuki Nakagawa, Hidemitsu Kitamura, Toru Atsumi, Hokuto Kamon, Shin-ichiro Sawa, Daisuke Kamimura, Naoko Ueda, Yoichi ro Iwakura, Katsuhiko Ishihara, Masaaki Murakami, and Toshio Hirano

IL-6 Regulates In Vivo Dendritic Cell Differentiation through STAT3 activation
The Journal of Immunology ; 2004,173: 3844-3854

Daisuke Kamimura, Naoko Ueda, Yukihisa Sawa, Shinji Hachida, Toru At sumi, Takayuki Nakagawa, Shin-ichiro Sawa, Gui-Hua Jin, Haruhiko Suzu ki, Katsuhiko Ishihara, Masaaki Murakami, and Toshio Hirano

Evidence of a Novel IL-2/15Rb-Targeted Cytokine Involved in Homeostatic Proliferation of Memory CD8+ T Cells
The Journal of Immunology ; 2004,173: 6041-6049

Takayuki Nakagawa, Hideki Ogura, Mineko Tsuruoka, Yuko Okuyama, Toshio Hirano, and Masaaki Murakami

FoxP3^{+}CD8^{+} T Cells Developed in an IL-6–Dependent Manner Regulate an Autoimmune Arthritis

投稿中

学会発表等

中川貴之、澤新一郎、熱海徹、上村大輔、石原克彦、村上正晃、平野俊夫

go130信号と臓器特異的自己免疫疾患の関係
日本免疫学会総会・学術集会　　2003年12月10日

中川貴之、澤幸久、八田晋磁、植田尚子、澤新一郎、熱海徹、上村大輔、石原克彦、村上正晃、平野俊夫

IL-6による樹状細胞を介したT細胞の活性の変化
日本免疫学会総会・学術集会　　2004年12月2日

中川貴之、朴星珠、井口めぐみ、佐藤優江、澤幸久、植田尚子、澤新一郎、熱海徹、上村大輔、石原克彦、村上正晃、平野俊夫

T細胞免疫寛容導入時におけるIL-6の役割
日本免疫学会総会・学術集会　　2005年12月14日