

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+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を明らかになった。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
\boxtimes	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 β 2、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 っ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 TGF β 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、TGF β 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 TGF6 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)。TGF β 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 TGF β 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 TGF β 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-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(5x10⁵/ml)を抗 CD3 抗体(10ng/ml)、TGFβ(5ng/ml)、BMDC(1x10⁵/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 (5x10⁴/well)を BMDC (1x10⁴/well)、図中に示す制御性 T 細胞 (5x10⁴/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 1x10⁵ 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 4.0x10⁶ 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) 5x10⁵の MoFlo で精製した CD4⁺CD25⁻CD44^{low}T 細胞を 1x10⁵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) 5x10⁵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、TGF β 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 2.5x10⁵ 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 1x105 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 TGF β 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 autoimmunity. 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.





Number of IL17⁺ CD4⁺ cells (x10⁵)













中川貴之 Fig. 2A



-



中川 貴之 26

中川貴之 Fig. 2B



中川貴之 Fig. 2C









IL-2 concentration (ng/ml) 2000 No Treg No IL-6 IL-2 concentration (ng/ml) 2000 No Treg No IL-6 + L-6 + L-6 + L-6

中川貴之 Fig. 3A





In vitro induced CD4⁺ FoxP3⁺ T cells







In vitro induced CD8⁺ FoxP3⁺ T cells





中川貴之 Fig. 3B









中川貴之 Fig. 4D

中川 貴之

35





37

中川貴之 Fig. 5A







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