The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	制御性T細胞におけるTNFR2の発現とその機能調節に関する研究
Author(s)	安藤, 大介
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/56166
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　安藤大介　）	
論文題名	制御性T細胞におけるTNFR2の発現とその機能調節に関する研究

論文内容の要旨

自己免疫疾患の患者数は年々増加傾向にあり、分子病態の解明と新たな治療法の開発が待望されている。自己免疫疾患の病態は、免疫細胞が自己抗原を異物と認識し、過剰な免疫応答が生じている状態であるが、このような抗原特異的な免疫応答は、主に免疫の司令塔としての機能を持つ$CD4^+$T細胞によって制御されている。昨今、$CD4^+$T細胞の中でも、免疫応答を促進する機能を持つエフェクターT細胞に加え、免疫応答を抑制する機能を持つ制御性T細胞（Treg）の役割が注目されており、自己免疫疾患の病態では、これら細胞によるバランスの破綻が生じているものと考えられるようになってきた。特に最近、Tregの機能が臨床病態に大きく関わっていることが明らかになりつつあり、Tregの機能を人為的にコントロールすることで、自己抗原に対する過剰な免疫応答を制御できれば、従来の治療法に代わる新たな治療法の開発につながるものと期待されている。そのため、Tregの機能制御分子の同定やその機能解明が精力的に進められている。このような背景のもと、最近、腫瘍壊死因子（TNF-α）の受容体であるTNF receptor 2（TNFR2）がTregに高発現することが明らかとなり、Tregの機能制御分子の一つとして注目されている。しかし、Treg におけるTNFR2の発現調節メカニズムや、その機能については、未だ十分に解明されていない。そこで本研究では、Tregの機能を人為的に調節する新たな疾患治療法の開発を念頭に、TregにおけるTNFR2の発現調節メカニズムと、その機能の解明に向けた各種検討を実施した。

最初に、TregにおけるTNFR2の発現レベルを確認するため、マウスの各組織（脾臓、鼠径・腋窩・腸間膜リンパ節）及び血液中におけるTreg（$CD4^+$,$CD25^+$）ならびにTconv（$CD4^+$,$CD25^-$）のTNFR2染色を行い、フローサイトメトリーで解析した。その結果、TNFR2はTregの約40%で高発現していたのに対し、Tconvでは10%以下であった。従って、TNFR2はTconvと比較して、Tregに高頻度かつ高レベルに発現することから、Tregを特徴付ける分子であることが示唆された。そこで、TregにおけるTNFR2の発現調節メカニズムの解明に向け、Tregのマスター転写因子であるFoxp3に着目し検討を行った。ナイーブ$CD4^+$T細胞をTGF-βで刺激し、Foxp3を誘導した際のTNFR2の発現率を解析した結果、TNFR2は$Foxp3^+$細胞の42.0%に発現する一方、$Foxp3^-$細胞では僅か3.6%での発現であった。また、リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析の結果、Foxp3の発現量の増加と相関してTNFR2の発現量も増加傾向にあったことから、Foxp3とTNFR2の発現の量的な相関が示唆された。さらに、TNFR2の発現がFoxp3の転写因子としての機能に依存するかを検討した。雌性のDEREG-Scurfy（$Foxp3^{wt/sf}$）マウスを用いた解析の結果、TNFR2は$Foxp3^{wt}$を発現するTregにおいては42.3%に発現していたが、失活変異体である$Foxp3^{sf}$を発現するTregではほとんど発現は認められなかった。従って、TNFR2はFoxp3の機能に依存して発現上昇することが示唆された。そこで次に、TregにおけるTNFR2の機能を解明するため、細胞増殖性に着目し、リンパ節から調製したTregを、細胞内蛍光プローブであるCFSEで標識し、TNF-αで刺激した際の増殖応答をモニタリングした。その結果、TNF-αの刺激によって、Tregの細胞分裂が亢進したことから、TNFR2シグナルはTregの増殖促進に関与することが示唆された。

以上の検討から、TregにおいてTNFR2が高発現すること、また、TNFR2からのシグナルによって細胞増殖が促進されることが示唆された。しかし、TNF-αは2種類のTNFレセプター（TNFR1/R2）に結合するため、TregにおけるTNFR2単独の機能・影響を詳細に検討出来ていなかった。そこで次に、Treg制御を目的とした新たな治療法の開発も念頭に置いて、マウスTNFR2（mTNFR2）を選択的に活性化し得るTNF変異体（アゴニスト）を創製し、mTNFR2を介したTregの増殖応答について検証を試みた。変異体を作製するため、まず、TNFとTNFレセプターの相互作用に関わる9箇所のアミノ酸残基を20種類のアミノ酸で網羅的に置換したTNF構造変異体を発現するファージライブラリを構築した。mTNFR2に対してパンニング操作を3回繰り返した後、レセプター結合性及びアゴニスト活性を指標としたスクリーニングを行い、mTNFR2結合性クローンを選別した。TNFR1/R2に対する結合性の評価はELISAを用いて、また、アゴニスト活性の評価は、各TNFレセプターを介した細胞内シグナル依存的に細胞死を誘導する2つの細胞株（TNFR1; L-M細胞, TNFR2; mTNFR2/mFas-preadipocyte）による細胞傷害性試験により行った。なお、mTNFR2/mFas-preadipocyteは、mTNFR1およ

びmTNFR2のダブルノックアウトマウス由来の前駆脂肪細胞株に、細胞外と膜貫通ドメインがmTNFR2、細胞内がmouse Fas（mFas）で構成されるmTNFR2/mFasキメラレセプターを安定発現させることで新たに作製した。その結果、mTNFR2選択的に結合性・アゴニスト活性を示すTNF変異体を5種類に絞り込むことができた。そこで、大腸菌発現系を用いて、これら変異体のリコンビナント蛋白質を作製し、それらの特性を詳細に解析した。表面プラズモン共鳴法（BIAcore）および上述の2つの細胞株を用いた細胞傷害性試験の結果、mTNFR2に選択的に結合し、野生型TNFと同等のアゴニスト活性を示す新規TNF変異体を創出することが出来た。そこで、TNFR2シグナルのTregの細胞増殖への関与を精査するため、上述のmTNFR2選択的TNF変異体で刺激した際のTregの増殖応答をCFSEでモニタリングした。その結果、TNFと同様に、TNF変異体による濃度依存的な細胞増殖の亢進が認められ、Tregの細胞増殖応答におけるTNFR2シグナルの関与が明らかとなった。一方、TconvではTNF変異体による細胞増殖の亢進作用は認められなかったことから、TNFR2シグナルによる細胞増殖の促進効果は、$CD4^{+}$細胞の中でもTreg特異的であることが示唆された。

以上、本研究では、TregにおけるFoxp3依存的なTNFR2発現誘導メカニズム、さらに、TNFR2シグナル依存的なTreg増殖能について見出し、TNFR2が関わるTregの機能の一端を解明した。本知見はTregの機能解明に資する有益な情報になるとともに、Tregの機能調節による自己免疫疾患治療の可能性を示唆するものである。今後、本研究によって得られた知見を基に、生体内でTregを増幅させる免疫抑制療法や、*ex vivo*で増幅させたTregを生体内へ再移植する養子免疫療法など、自己免疫疾患の新規治療法の開発に繋がることを期待する。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　安藤　大介　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	角田　慎一
	副 査	教授	中川　晋作
	副 査	教授	辻川　和丈

論文審査の結果の要旨

本博士論文では、制御性T細胞（Treg）の機能を人為的に調節することによる新たな疾患治療法の開発を念頭に、2型TNF受容体（TNFR2）のTregにおける発現特性と機能調節における役割を明らかにすることを目的に研究が実施された。一連の研究により、以下の成果および結論が得られている。

1. TregにおけるTNFR2の発現機構を解析した結果、TregにおいてTNFR2が高発現することを明らかとし、その発現はFoxp3によって制御されることを見出した。

2. mTNFR2/mFasレセプターをTNFR1／TNFR2ダブルノックアウト細胞に安定発現させることにより、TNFR2を介した生物活性の高感度な評価系を構築した。

3. ファージ表面提示法を駆使することで、TNFR2選択的アゴニストとして作用し、マウス野生型TNFと同等の生物活性を有する新規TNF変異体の創製に成功した。

4. マウスTNFR2選択的アゴニストによる刺激によりTregの増殖が亢進したことから、TNFR2およびそのシグナルがTregの細胞増殖に関わることを明らかとした。

現在の自己免疫疾患の治療において、臨床で使用されている薬の多くは、免疫応答の活性化阻害をコンセプトとする免疫抑制薬である。例えば、サイトカインシグナルを阻害して免疫活性化を抑える抗TNF抗体や抗IL-6受容抗体は、関節リウマチなどの自己免疫疾患において良好な治療効果を示している。しかし、これらの治療薬は、炎症反応のエンドポイントを標的としているために、自己免疫疾患の根治に導くことが難しいことや、自己免疫疾患であっても、これらの薬剤が無効な症例が多くあることが知られている。そのため、新しいコンセプトの自己免疫疾患治療法・治療薬の開発が期待されている。それに対して、申請者が想定するTregの免疫抑制能の誘導・促進に基づく免疫制御法は、エフェクターT細胞とTregとのバランスの調整、すなわち従来の治療薬とは異なる作用機序によるものである。本研究によって得られた上記知見は、Tregの機能調節に基づく新たな疾患治療薬の開発に繋がるものと期待される。

以上、本研究は、創薬研究をはじめ、薬学、生命科学等において有意義で興味深いものであり、博士(薬科学)の学位を授与するにふさわしいものと考える。