Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Regulatory CD8+ T cells induced by exposure to all-trans retinoic acid and TGF-β suppress autoimmune diabetes

来住，稔

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2010-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲5032
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005032

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

氏　　名	来住　稔
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学　位　記　番　号	博い第 5032 号
学位授与の　要　件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の　日　付	平成 22 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Regulatory CD8+ T cells induced by exposure to all-trans retinoic acid and TGF-β suppress autoimmune diabetes(オールトランスレチノイン酸と TGF-β を用いた自己免疫糖尿病を抑制する制御性 CD8 陽性 T 細胞の誘導)

審　査　委　員

主　査　　教　授　南　康博

教　授　堀田　博

教　授　錦織　千佳子

背景と研究目的

自己免疫性1型糖尿病は膵β細胞に対する細胞性免疫主体の自己免疫反応が惹起された結果糖尿病発症に至る臓器特異的自己免疫疾患である．末梢に存在する自己反応性T細胞の活性化が1型糖尿病などの自己免疫疾患を引き起こすため，この自己反応性T細胞に対する何らかの抑制性機構が以前より推測されてきた．自己反応を抑制するT細胞の概念は最初に抑制性CD8+T細胞として提唱された．しかしこの抑制性CD8+T細胞は以後あまり報告が見られず，最初に制御性T細胞(Tregs)として同定されたのはCD4+CD25+T細胞である．当初CD25の発現はTregsを同定する表面マーカーとして用いるようになったものの，その後の研究でforkhead/winged helix family(Foxp3)という転写因子がCD4+CD25+ Tregsに特異的とされ，naïve T細胞からTregsへの誘導とそれら制御能の保持への関与が報告された．

このCD4+CD25+ T細胞は胸腺を起源とし末梢でその制御能を発揮する一方，膵β細胞ペプチドで抗原刺激したNODマウス由来樹状細胞とTGF-βにより，膵β細胞反応性CD4+ T細胞クローンのT細胞受容体トランスジェニックマウスであるBDC2.5-NODマウス由来のnaïve CD4+ CD25-T細胞をCD4+CD25+Foxp3+ T細胞へと誘導し，これらが糖尿病移入の系で糖尿病発症抑制作用を示す報告もある．このことはBDC2.5-NODマウスの抗原反応性CD4+CD25- T細胞はCD4+CD25+Foxp3+ T細胞に変換出来うることを示している．さらに，小腸から分離した樹状細胞と腸管内で高発現しているオールトランスレチノイン酸(ATRA)及びTGF-βでより効率的にTregへの変換を行うことができることも報告された．これらはTGF-βとATRAがともに制御性T細胞を誘導する能力があることを示唆する．

最近の報告で制御性T細胞はCD4+T細胞のみならずCD8+T細胞にも認められるとされ，我々は膵β細胞抗原の一つであるislet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein (IGRP)特異的CD8+T細胞クローンのT細胞受容体トランスジェニックマウスである8.3-NODマウス由来のnaïve CD8+T細胞を制御性CD8+ T細胞へと誘導できるとの仮説を立てた．そこで我々は8.3-NODマウス脾細胞よりCD8+T細胞を分離し，樹状細胞，ATRA及びTGF-βで培養することで*in vitro*と*in vivo*で制御性機能を有する制御性CD8+T細胞の誘導を試みた．

方法と結果

【1】7週齢の8.3-NODマウス由来脾細胞にはCD8+T細胞を54.3%認めNODマウスの20.8%と比較し多く認めたものの，CD8+Foxp3+T細胞はNODマウスと同様に1.0%未満しか認めなかった．この8.3-NODマウス由来脾細胞より磁気ビーズを用いてCD8+T細胞を分離しCFSEでラベルした後，0.1μMのIGRP，同マウス由来脾細胞より磁気ビーズを用いて分離したCD11c陽性樹状細胞，2ng/mlのTGF-β，10nMのATRAとともに5日間培養した後FACSで解析した．8.3-NODマウスCD8+脾細胞のFoxp3陽性率はIGRPのみで誘導したCD8+T細胞(I cell)が1.7 ± 0.9%，IGRPと樹状細胞で誘導したCD8+T細胞(ID cell)が3.2 ± 4.5%，IGRP，樹状細胞及びTGF-βで誘導したCD8+T細胞(IDT cell)が8.6 ± 6.7%であったが，IGRP，樹状細胞，TGF-β及びATRAで誘導したCD8+T細胞(IDTA cell)が21.4 ± 4.2%とI cellに比較して有意に陽性率が高かった．特に，IGRP反応性CD8+T細胞中のFoxp3+CD8+T細胞は36.1±10.6%を占め，培養前と比較すると約40倍のFoxp3陽性率を認めた．Foxp3の高発現率を認めたIDT cellとIDTA cellの表面マーカーの解析により，これらのFoxp3+CD8+T細胞はCD25の陽性率は7.42%と低い一方，その90%以上はCD103陽性であった．

【2】【1】で誘導された4群を再び磁気ビーズを用いてCD8+T細胞のみを回収し，CFSEでラベルした8.3-NOD脾細胞由来IGRP反応性CD8+T細胞をIGRPとともに培養し*in vitro*における増殖抑制能について検討した．I cell, ID cell, IDT cellのそれぞれと培養した8.3-NOD脾細胞由来CD8+T細胞に対してはそれぞれ-1.8 ± 7.6 %，2.9 ± 9.0 %，1.0 ± 8.5 %の増殖抑制効果を認めたが，IDTA cellと培養したCD8+T細胞に対しては12.9 ± 8.9 %と有意な増殖抑制効果が認められた．また，IDTA cellの割合を増やすことで抑制能の増強効果を認めた．

【3】IDTA cellには*in vitro*で8.3-NOD脾細胞由来CD8+T細胞に対して増殖抑制能を認めたため，6×10^6のI cellもしくはIDTA cellと1×10^7のNOD催糖尿病性脾細胞をNOD-scidに共移入し*in vivo*における糖尿病発症抑制効果を検討した．NOD催糖尿病性脾細胞単独移入群(n=5)と，I cellとの共移入群(n=6)では全てのマウスが移入後44日までに糖尿病発症を認めたのに対し，IDTA cellとの共移入群(n=5)では全く糖尿病発症を認めず，糖尿病発症抑制効果が確認された．

考察

本研究は，8.3-NODマウスの脾細胞由来CD8+T細胞から制御性CD8+T細胞を誘導できることを示した．このマウスはNODマウスより早期に糖尿病を発症するものの最終的な糖尿病発症率はNODマウスと同様80-90%である．10-20%が糖尿病を発症しないことから，我々はこのマウスにおいても制御性T細胞が何らかの影響をしていると仮定し，この膵自己抗原反応性CD8+T細胞から制御性CD8+T細胞の誘導を試みた．

制御性CD8+T細胞の誘導に関しても最近，Foxp3が重要なマーカーであると

の報告がみられる．本研究でもIGRP，脾細胞由来樹状細胞，TGF-β及びATRAで培養され抑制能を示した制御性 $CD8^+$T 細胞が最も Foxp3 の高発現を示したことから，$CD8^+Foxp3^+$T 細胞が重要であることを示唆する．$CD8^+$T 細胞での Foxp3 の役割は未だ不明であるものの，$CD4^+$T 細胞での Foxp3 の発現は制御性 T 細胞の誘導に関与するとされている．インスリン B 鎖 15-23 ペプチドを認識する $CD8^+$T 細胞クローンに Foxp3 を強制発現させ，これを NOD-scid や幼若期 NOD マウスに移入する系において糖尿病発病を遅延させる報告もあり，$CD8^+$T 細胞でも Foxp3 を発現することにより effector $CD8^+$T 細胞が制御性 $CD8^+$T 細胞へと変換しうることを示している．さらに高純度の $CD8^+Foxp3^+$T 細胞を分離できれば，この糖尿病抑制効果はより増強されると考えられるものの，Foxp3 は細胞表面マーカーではないため直接標識により細胞集団を分離できない．そこで我々はこの $CD8^+Foxp3^+$T 細胞では $CD4^+CD25^+Foxp3^+$T 細胞と異なり CD25 の発現は低く，制御性 $CD8^+$T 細胞のマーカーではない事を確認した．一方この $CD8^+Foxp3^+$T 細胞の 90%以上は CD103 を発現していた．本研究では一部の $CD8^+Foxp3^-$T 細胞もまた CD103 を発現していたため，これは $CD8^+Foxp3^+$T 細胞の特異的マーカーではないものの，CD103 抗体を用いた細胞分離により $CD8^+Foxp3^+$T 細胞をより効率に得られると思われた．

制御性 T 細胞の誘導における ATRA の役割は近年報告されている．消化管樹状細胞を用いた naïve $CD4^+Foxp3^-$T 細胞から $CD4^+Foxp3^+$T 細胞への誘導を報告したが，この誘導は TGF-β と ATRA を必要とした．また、抗原の経口投与での ATRA 依存性 naïve T 細胞から制御性 T 細胞への誘導の報告や，*in vitro* で $CD4^+Foxp3^-$T 細胞を TGF-β，IL-2 及び ATRA で $CD4^+Foxp3^+CD103^+CCR9^+$T 細胞へと変換しそれらの抑制能を増強させたという報告もある．本研究では，$CD8^+$T 細胞においても *ex vivo* で ATRA と TGF-β を用いて抗原特異的に制御性 $CD8^+$T 細胞が誘導できることを見い出し初めて報告した．

結論

自己免疫糖尿病モデルマウスにおいて，ATRA と TGF-β で抗原特異的な制御性 $CD8^+$T 細胞を誘導した．この *ex vivo* で誘導された制御性 $CD8^+$T 細胞を用いることで有益な自己免疫糖尿病の治療を行うことができると考えられる．

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第2115号	氏　名	来住 稔
論文題目 Title of Dissertation	オールトランスレチノイン酸とTGF-βを用いた自己免疫糖尿病を抑制する抑制性CD8陽性T細胞の誘導 Regulatory CD8+ T cells induced by exposure to all-trans retinoic acid and TGF-β suppress autoimmune diabetes		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 菊　康博 副　査 Vice-examiner 堀田 博 副　査 Vice-examiner 錦織 千佳子		

（要旨は1，000字～2，000字程度）

自己免疫性1型糖尿病は、膵β細胞に対する細胞性免疫主体の自己免疫反応が惹起された結果糖尿病発症に至る臓器特異的自己免疫疾患である。末梢に存在する自己反応性T細胞の活性化が1型糖尿病等の自己免疫疾患を引き起こすため，自己反応性 T細胞に対する抑制性機構の存在が推測されていた。最初に制御性T細胞(Treg)として同定されたのはCD4+CD25+T細胞であるが、最近では CD8+CD25+T細胞にも認められることが報告されている。また、小腸から分離した樹状細胞と腸管内で高発現しているオールトランスレチノイン酸(ATRA)及びTGF-βにより効率的にTregへの変換を行うことができることも報告され、 TGF-βとATRAがともに制御性T細胞を誘導する能力があることが示唆されている。私は膵β細胞抗原の一つであるIGRP特異的CD8+T細胞クローンのT細胞受容体トランスジェニックマウスである8.3-NODマウス由来のnaïve CD8+T細胞を制御性CD8+ T細胞へと誘導できるとの仮説を立て、8.3-NODマウス脾細胞より CD8+T細胞を分離し、樹状細胞、ATRA及びTGF-βで培養することで *in vitro* と *in vivo* で制御性機能を有する制御性CD8+T細胞の誘導を試みた。

7週齢の8.3-NODマウス由来脾細胞より磁気ビーズを用いてCD8+T細胞を分離しCFSEでラベル後 IGRPで処理し、同マウス由来脾細胞より磁気ビーズを用いて分離したCD11c陽性樹状細胞、TGF-β、ATRAとともに5日間培養した後FACSで解析した。8.3-NODマウスCD8+脾細胞のFoxp3陽性率はIGRPのみで誘導したCD8+T細胞(I cell)が1.7±0.9%，IGRPと樹状細胞で誘導した CD8+T細胞(ID cell)が3.2±4.5%，IGRP，樹状細胞及びTGF-βで誘導した CD8+T細胞(IDT cell)が8.6±6.7%であったが、IGRP，樹状細胞，TGF-β及び ATRAで誘導したCD8+T細胞(IDTA cell)が21.4±4.2%と他群に比べ有意に陽性率が高かった。 IGRP反応性CD8+T細胞中ではFoxp3陽性細胞は36.1±10.6%を占め、培養前と比較し約40倍のFoxp3陽性率を認めた。前述の4群を再び磁気ビーズを用いCD8+T細胞のみを回収し、CFSEでラベルした8.3-NOD脾細胞由来IGRP反応性CD8+T細胞をIGRPとともに培養し *in vitro* における増殖抑制能について検討した。I cell，ID cell，IDT cellと培養した8.3-NOD脾細胞由来CD8+T細胞では極めて弱い増殖抑制効果を認めたが、IDTA cellと培養したCD8+T細胞

では有意な増殖抑制効果が認められた。IDTA cell では *in vitro* で 8.3-NOD 脾細胞由来CD8+T 細胞に対して増殖抑制能を認めたため、I cell または IDTA cell と NOD 催糖尿病性脾細胞を NOD-scid に共移入し *in vivo* における糖尿病発症抑制効果を検討した。NOD 催糖尿病性脾細胞単独移入群、I cell との共移入群では全てのマウスが移入後 44 日までに糖尿病発症を認めたのに対し、IDTA cell との共移入群では全く糖尿病発症を認めず、糖尿病発症抑制効果が確認された。

本研究は、8.3-NOD マウスの脾細胞由来 CD8+T 細胞から制御性 CD8+T 細胞を誘導できることを示している。このマウスは NOD マウスより早期に糖尿病を発症するものの最終的な糖尿病発症率は NOD マウスと同様であることから、このマウスにおいても制御性 T 細胞が何らかの関与をしていると考え、この膵自己抗原反応性 CD8+T 細胞から制御性 CD8+T 細胞の誘導を試みた。本研究では IGRP, 脾細胞由来樹状細胞, TGF-β及び ATRA で培養され抑制能を示した制御性 CD8+T 細胞が最も Foxp3 の高発現を示したことから、CD8+Foxp3+T 細胞が重要であると考えられる。さらに、本研究では CD8+T 細胞においても *ex vivo* で ATRA と TGF-β を用いて抗原特異的に制御性 CD8+T 細胞が誘導できることを明らかにした。

本研究は、自己免疫糖尿病モデルマウスにおいて抗原特異的制御性 CD8+T 細胞の誘導について研究したものであるが、従来解明されていなかった ATRA と TGF-β により制御性 CD8+T 細胞が誘導されるという重要な知見を得たものとして価値ある業績と認める。よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があるものと認める。