

審査の結果の要旨

氏名 駒井 俊彦

本研究は CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 制御性 T 細胞の抑制性因子として免疫学的恒常性の維持に関わるサイトカインである transforming growth factor- $\beta$ 3 (TGF- $\beta$ 3) および interleukin-10 (IL-10)の液性免疫制御における役割を明らかにするため、Toll 様受容体 (TLR) 刺激により活性化したマウスおよびヒト B 細胞に TGF- $\beta$ 3、IL-10 を添加する系、免疫したマウスやループス様マウスの生体内に Tgfb3、Il10 遺伝子を導入したプラスミドベクターを投与する系を用いて検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. TLR シグナル非依存性の T 細胞依存性抗原による免疫を施行したマウスに各ベクターを投与した結果、TGF- $\beta$ 3 導入プラスミドベクターは抗原特異的抗体産生に対する抑制作用を有した。また、脾細胞のフローサイトメトリー解析により、TGF- $\beta$ 3 導入プラスミドベクターは胚中心 B 細胞分化を抑制することが作用点であることが示唆された。TGF- $\beta$ 1 導入プラスミドベクターは同様の抑制作用を有さず、TGF- $\beta$  のアイソフォームにより異なる免疫抑制作用、TGF- $\beta$ 3 の主として B 細胞の抑制を介した生体内の免疫抑制作用が明らかになった。

2. TLR4 刺激であるリポ多糖 (LPS) で活性化した B 細胞へ TGF- $\beta$ 3、IL-10 を添加した解析では、TGF- $\beta$ 3、IL-10 は単独では B 細胞の活性を抑制できず、TGF- $\beta$ 3 と IL-10 の共存によりはじめて抗体産生、形質細胞分化、形質細胞分化に関わる遺伝子発現が抑制された。また、TLR シグナルを惹起する抗原またはアジュバントを用いた免疫を施行したマウスの抗原特異的抗体産生の抑制には、TGF- $\beta$ 3 導入プラスミドベクターと IL-10 導入プラスミドベクターを共投与することが必要であった。TGF- $\beta$ 3 による TLR シグナルを介する B 細胞活性化および液性免疫の制御には IL-10 が必要であることが示された。

3. IL-10 が生体内で高発現しているループスモデル MRL-Fas<sup>lpr/lpr</sup> (MRL/lpr)

マウスへ TGF- $\beta$ 3 導入プラスミドベクターを投与した解析では、TGF- $\beta$ 3 導入プラスミドベクターはループス様病態への治療効果を有し、TGF- $\beta$ 3 によるループス様病態制御の可能性が示唆された。

4. LPS 刺激 B 細胞に TGF- $\beta$ 3、IL-10 を単独または共添加した検体を用いて RNA-sequencing により遺伝子発現を評価した結果、パスウェイ解析にて mammalian target of rapamycin (mTOR) シグナルの抑制ならびに細胞代謝に関わる遺伝子群の抑制が見出された。ウエスタンブロット法により、LPS 刺激 B 細胞で誘導される mTOR 複合体 1 (mTORC1) 下流シグナルの p70 S6 キナーゼのリン酸化は、TGF- $\beta$ 3 と IL-10 の共添加条件でのみ抑制された。また、TGF- $\beta$ 3 と IL-10 の共添加による LPS 刺激 B 細胞の抗体産生抑制は、mTORC1 活性化刺激となる MHY1485 またはロイシンの添加により阻害されたことより、TGF- $\beta$ 3 と IL-10 は LPS 刺激 B 細胞の mTORC1 シグナルの抑制を介して協調的な免疫抑制作用を發揮する可能性が示唆された。

5. LPS 刺激 B 細胞に TGF- $\beta$ 3、IL-10 を共添加した条件における細胞代謝への影響を MitoTracker 染色および細胞外フラックスアナライザーにて評価した結果、TGF- $\beta$ 3、IL-10 の共添加は酸化的リン酸化、嫌氣的解糖系代謝のいずれも強力に抑制していた。

6. TLR9 アゴニストの CpG oligodeoxynucleotide (CpG-ODN) により刺激されたヒト B 細胞では IL-10 の存在下で TGF- $\beta$ 3 はより効率的に酸化的リン酸化、嫌氣的解糖系代謝を抑制していた。

以上、本論文は TLR シグナルの関与する液性免疫制御機構において、抑制性サイトカインの TGF- $\beta$ 3 は IL-10 と協調的に作用し、その協調的作用は mTORC1 シグナルならびに細胞代謝の抑制を機序としていることを明らかにした。また、TGF- $\beta$ 3 は IL-10 の存在下でループス様病態を含む全身性の液性免疫応答を制御する作用を有することを明らかにした。本研究は制御性 T 細胞が TGF- $\beta$  と IL-10 を共産生する生理的意義を示唆し、抑制性サイトカインによる全身性エリテマトーデスを含む全身性自己免疫疾患の治療法開発の礎となる可能性を内包していることから、学位の授与に値するものと考えられる。