

博士論文

臍帯血 T 細胞免疫寛容の細胞分子学的機序の検討

武藤 浩司

所属：生殖・発達・加齢医学専攻 小児医学講座 小児科学

指導教員：高橋尚人教授 申請者：武藤浩司

目次

I. 要旨	5
II. 序文	6
III. 方法	13
1. 対象症例	13
2. 細胞前処理	14
3. 細胞刺激	16
4. フローサイトメトリー	19
5. 培養上清中のサイトカイン 測定	23
6. RNA シーケンシング	24
IV. 結果	27
1-1. 予備実験「磁気ビーズ分離法の純度評価」	27
1-2. 予備実験「TSST-1 刺激後の Vbeta2+ CD4+ T 細胞回収」	30
2-1. TSST-1 刺激後サンプル培養上清の IL-2 評価	34
2-2. 培養上清中のその他のサイトカイン	36
3-1. フローサイトメトリー①	39
3-2. フローサイトメトリー②	44
4-1. RNA-seq のための細胞回収・RNA 抽出	50

4.2 RNA-seq: サンプルのクラスタリング	52
4.3. RNA-seq: 二群間比較とエンリッチメント解析	55
4-4. RNA-seq: 個々の遺伝子の発現の評価	64
4-5. RNA-seq: GSEA (Gene set enrichment analysis)	67
V. 考察	74
VI. 結論	84
VII.倫理面への配慮	85
VIII. 謝辞	86
IX. 引用文献	87

I. 要旨

新生児免疫寛容の免疫学的機序解明のため、正常新生児臍帯血と成人末梢血の Naïve CD4+ T 細胞に対して、in vitro でスーパー抗原 TSST-1 などの刺激を加える実験を行なった。臍帯血では制御性 T 細胞マスター転写因子の FOXP3 がより発現しやすいこと、再刺激に対して IL-2 産生は低下することが確認された。また Molecular Signature Database 登録の、胎児制御性 T 細胞で発現が多いと報告されている遺伝子群が、刺激によって臍帯血では発現がより増加したことが RNA シーケンシングにて判明した。これらの結果から新生児免疫寛容の機序の一つに制御性 T 細胞が関与していると考えられた。

(300文字)

II. 序文

重症感染症は新生児・乳児の死因の主要な原因の一つである。[1]

一般的に年少の小児、特に新生児は他の年代と比較して重症感染症に罹患しやすく、また罹患した際の進行が早いことから、免疫応答の弱さが推察される。しかしその一方で、トキシックショック症候群 (TSS: toxic shock syndrome) と同じスーパー抗原を産生するブドウ球菌などにより引き起こされる新生児 TSS 様発疹症 (NTED: neonatal TSS like exanthematous disease) や [2-5]、新型コロナウイルス感染症など炎症性サイトカインが関わるある種の感染症では成人より重症化しづらい傾向も知られている [6-9]。正常な妊娠期間中においても、胎児と母体は臍帯を通して、抗原となりうる異物の暴露を互に行い合うが、こういった抗原に対する免疫寛容のシステムにも制御性 T 細胞の関与が指摘されている [10, 11]。また、出生後に新生児は食物抗原や無害な常在菌など多くの抗原に晒されるため、免疫応答よりも免疫寛容傾向に調整されていることは子宮外環境に適応するのに合理的な生体反応と言える [12]。更に、血液腫瘍などに対して行う、臍帯血移植では骨髄移植と比較すると拒絶反応が生じにくいことが知られている [13, 14]。様々な原因が挙げられているが、これについても制御性 T 細胞の関与を示す研究結果もある [15]。このように新生児や胎児は単に免疫応答が弱いのではなく、生理的に免疫寛容の傾向にあることを推察する報告がある [10, 16, 17]。

細菌やウイルスなどの体外からの病原体や体内に発生する悪性腫瘍などの非自己抗原を認識し排除するためには免疫応答があるが、一方でその働きを抑制してコントロールする免疫寛容も体内の恒常性を保つために非常に重要である。免疫寛容については、CD4+T 細胞の一種である制御性 T 細胞(regulatory T cells: Treg)が大きな役割を担っている[18-20]。1995 年に CD25+CD4+T 細胞に免疫応答を抑制する働きを持つこと[18]、2003 年に FOXP3 (forkhead box P3)が Treg のマスター転写因子であることが報告されたことから[20]、Treg の研究は発展した。FOXP3 の機能低下はヒトにおいては、重症の複合自己免疫疾患である IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked)症候群の原因となる[21]。Treg は natural Treg (nTreg)と peripheral Treg (pTreg)の二つの集団から構成されている[22]。nTreg は胸腺で未熟な前駆細胞から分化し、自己抗原に対する寛容性を維持する上で重要な役割を果たしている。pTreg は体内では消化管や呼吸器など体外との境界において樹状細胞やマクロファージなど抗原提示細胞によって Naïve T 細胞から分化する[23]。また in vitro でも IL-2、TGF- β 、レチノイン酸の存在下で Naïve T 細胞に TCR 刺激を加えることで inducible Treg (iTreg)が生成される[24]。Ikaros 転写因子ファミリーメンバーの Helios は nTreg では高発現であるが、pTreg/iTreg では発現していない[25]。Treg に特徴的な細胞マーカーとして、CD25 (IL2 受容体 α 鎖) や FOXP3

のほか、低レベルの CD127 (IL-7 受容体 α 鎖) を発現している [26]。また、Treg が抗原提示細胞による T 細胞の活性化能を下げるために Treg 細胞表面上の CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) が必要である [27]。

今回の研究は、胎児・新生児の免疫寛容の仕組みを探究するため、臍帯血中の CD4+ T 細胞の機能に注目した。T 細胞は白血球の主要分画のリンパ球の一種であり、主に細胞表面に CD4 を発現する CD4+ T 細胞 (ヘルパー T 細胞) と CD8 を発現する CD8+ T 細胞 (キラー T 細胞)、その他 $\gamma\delta$ T 細胞などに分類される。このうち CD4+ T 細胞は抗原提示によって活性化された Effector T 細胞、その後に一部が保存される Memory T 細胞、活性化される前の Naïve T 細胞に分けられる。臍帯血と成人末梢血の CD4+ T 細胞の大きな違いは、この Naïve T 細胞、Effector T 細胞、Memory T 細胞の割合にある [14]。

図 1 は、臍帯血および成人末梢血の単核球中の CD4+ T 細胞をフローサイトメトリーで比較した自検例であるが、臍帯血がほとんど Naïve T 細胞のみであるのに対して、成人末梢血では Naïve T 細胞、Effector T 細胞、Memory T 細胞が混在することがわかる。これは、成人が抗原の暴露により免疫応答を繰り返すことにより Memory T 細胞を蓄積したことによる [28]。

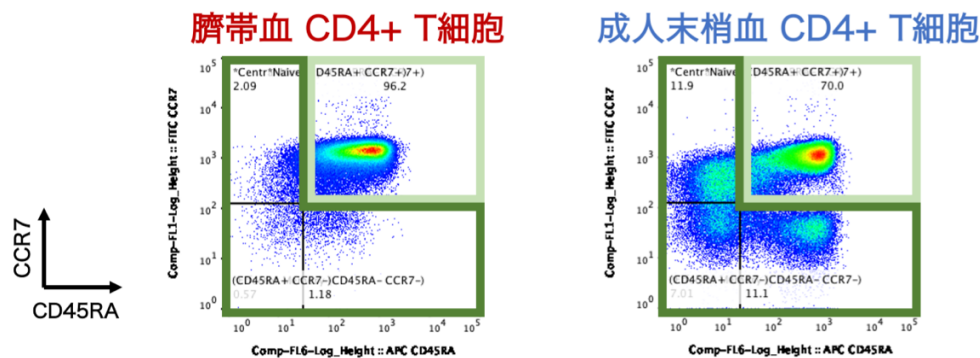


図 1：臍帯血と成人末梢血の CD4+ T 細胞のフローサイトメトリー評価（自検例）

Effector T 細胞はサイトカインの分泌能によって、Th1 細胞(Th1)、Th2 細胞(Th2)、Th17 細胞(Th17)、Tfh 細胞（濾胞性 T 細胞）、制御性 T 細胞(Treg)などに分類される[29,30]。図 2 のように、Th1 は IFN- γ 、Th2 は IL-4、Th17 は IL-17、制御性 T 細胞は IL-10 などのサイトカインを産生するが、Naïve T 細胞(図 2 での Th0)がどの Effector T 細胞に分化するかは、その細胞がおかれるサイトカインの環境に左右される[29, 31, 32]。

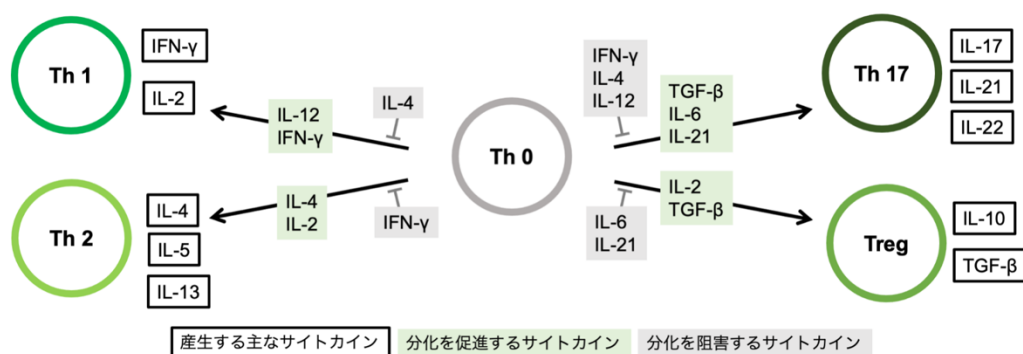


図 2：Naïve T 細胞の分化とサイトカインの関係

Naïve T 細胞 (Th0)の分化はサイトカイン環境に依存している。細胞刺激を受けると、Effector T 細胞・Memory T 細胞が反応しサイトカイン分泌 Naïve T 細胞の分化に影響を与える。

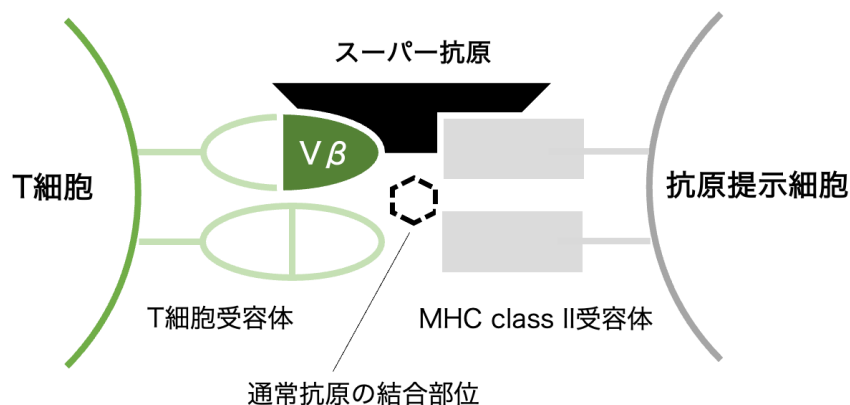


図3：スーパー抗原がT細胞を活性化させるメカニズム

スーパー抗原は、T細胞上の適合するT細胞受容体と抗原提示細胞のMHC class II受容体を架橋してT細胞を活性化させる。

今回の研究で使用するスーパー抗原についても説明を行う。スーパー抗原とは、黄色ブドウ球菌や溶血性連鎖球菌が分泌する外毒素の一種である[33-35]。SEA (staphylococcus enterotoxin A)や SEB (staphylococcus enterotoxin B)、TSST-1 (toxin shock syndrome toxin-1)など複数の種類があるが、図3のようにT細胞上のT細胞受容体(T cell receptor : TCR)と抗原提示細胞などの細胞表面のMHC Class II受容体 (Major Histocompatibility Complex; MHC)を架橋することにより、抗原提示なしでT細胞を活性化させる。スーパー抗原がどのT細胞を活性化するかを選択性は、T細胞のTCRを構成するVβ鎖の種類による。TSST-1の場合はVbeta2である。通常抗原の場合は活性化させるT細胞は全体の100万分の1程度であるが、スーパー抗原では数%から数十%にのぼり、これによりサイトカインストームが引き起こされる[33-35]。

本実験で参考とする先行研究がある[36]。図4に流れを示すが、この実験では

in vitro で臍帯血及び成人末梢血由来の単核球を TSST-1 で刺激して活性化して得られた芽球 (TCR Vbeta2+ CD4+ T 細胞) を IL-2 で拡大培養ののち、再度 TSST-1 で刺激したところ、臍帯血の場合でのみ培養上清中の IL-2 の産生が非常に低く、臍帯血の未熟性のためにアナジー (免疫不応答性) が誘導されたと結論づけられた。この報告がなされたのは制御性 T 細胞など免疫寛容の研究が進む前[19, 20]の 1995 年のことであり、臍帯血の CD4+ T 細胞の反応性の乏しさについては、免疫応答の未熟さと結論づけられた。しかし、臨床疾患として TSST-1 が新生児において NTED の原因であることが判明し[2, 3]、その病態に IL-10 などの抑制性サイトカインが関与していることが分かった[37]。この現象に新生児特有の免疫寛容が関わっている可能性も考えられる[3]。

今回の研究では、この報告にならい、in vitro での TSST-1 に対する臍帯血、成人末梢血の CD4+T 細胞の変化を対象とすることとした。しかし、前述の通り、臍帯血と成人末梢血では CD4+ T 細胞中の分画が大きく異なる。Effector T 細胞、Memory T 細胞は Naïve T 細胞と刺激に対する反応が異なるばかりではなく、それらが産生するサイトカインは Naïve T 細胞の変化に影響を与えると予想される。また、Naïve T 細胞は刺激によって活性化してからは Effector T 細胞、Memory T 細胞との区別は困難である。そのため、今回の実験では主として Naïve T 細胞に注目して、in vitro での TSST-1 刺激に対する臍帯血と成人末梢血の差異を観察

し、免疫寛容に関わる現象の有無について評価を行う方針とした。

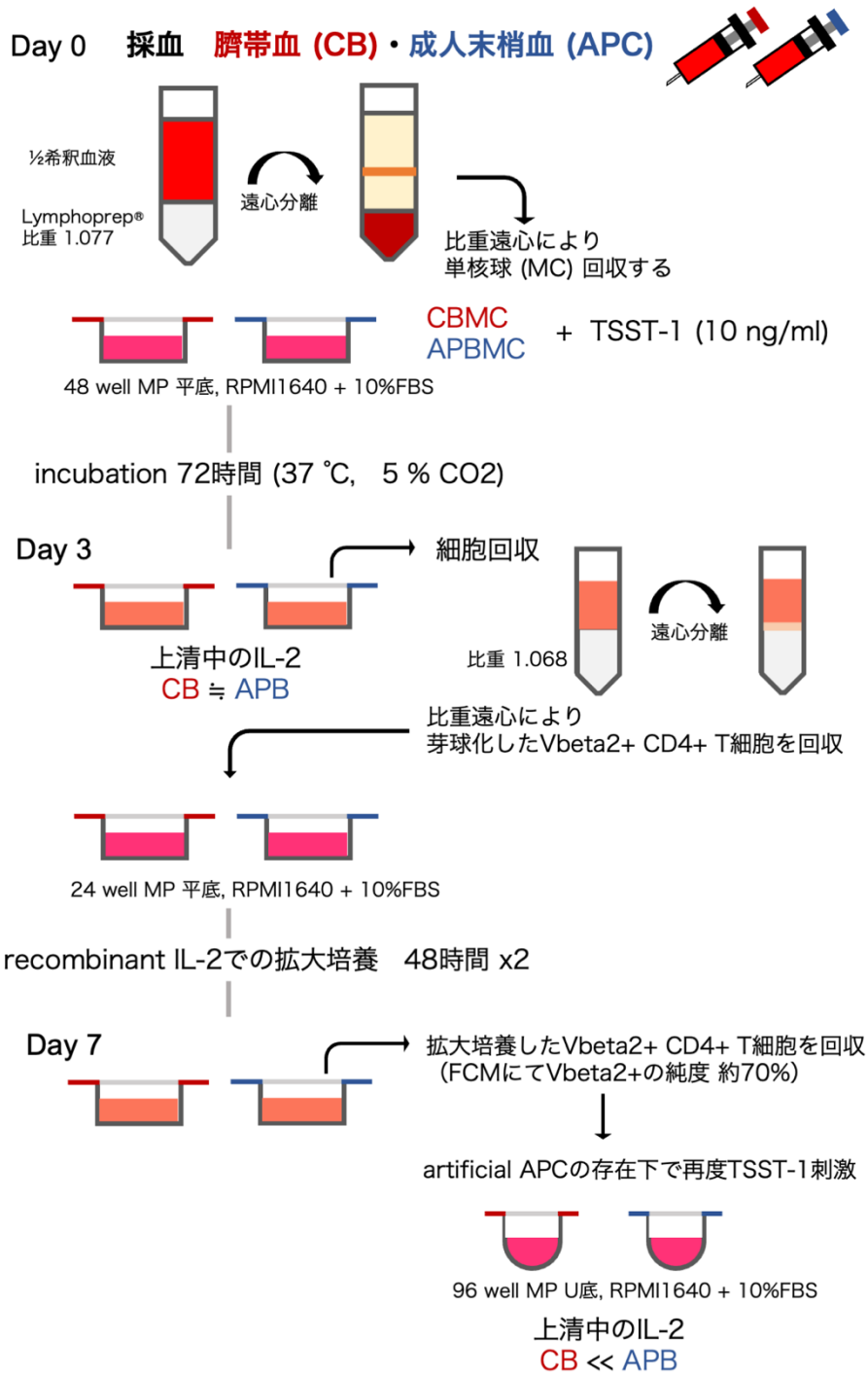


図4：先行研究[36]の実験流れ図（比較として図5も参照）

III. 方法

1. 対象症例

正期産の健常新生児を対象とした。出生方法は経膈分娩、帝王切開を問わないが、実験スケジュールの都合上、大半は既往帝王切開、骨盤位、子宮手術の既往などに伴う選択的帝王切開例であった。入院後の出産前までに、全例ベッドサイドで母（もしくは両親）に説明を行い、同意書を取得した。

健康成人例をコントロールとし、基本的に可能な限り臍帯血と成人末梢血は同時に行った。成人は自己免疫疾患などの免疫異常などの基礎疾患がないこと（花粉症などの軽微なものは許容）、少なくとも直近3週間以内に感冒を含めた感染症に罹患していないこと、直近3週間以内にワクチンの接種を受けていないことを条件とし、東大病院小児科有志より協力を得た。

除外基準は、内臓奇形・染色体異常合併例、Small for date もしくは Heavy for date 児、母体及び胎児の免疫機能に影響を与えることが懸念される例（子宮内感染合併及び疑い例、母体自己免疫疾患合併例、母体免疫抑制剤内服例、妊娠高血圧症候群合併例、妊娠糖尿病合併例）、一絨毛膜二羊膜双胎児、一絨毛膜一羊膜双胎児である。

2. 細胞前処理

2-1. 採血

臍帯血の採血は全例実験担当者（小児科 新生児専門医）が行った。臍帯及び胎盤娩出後すぐに、臍帯静脈より臍帯血を採取し、ヘパリン入り真空採血管（テルモ ベノジェクト II）に概ね 20 ml 程度分注した。成人末梢血については、臍帯血採取の前後に協力者より採取し、同種の真空採血管に分注した。採血後、可能な限り速やかに（概ね 3 時間以内）実験を開始した。

2-2. 単核球分離

Lymphoprep (Abbott Diagnostics Technologies AS) 15 ml を充填した SepMate-50 (STEMCELL Technologies) に 2 % 非動化 FBS (fetal bovine serum) 入り PBS (STEMCELL Technologies) にて 2 倍希釈した血液（元の血液量で 10-17 ml）を液面が乱れないように重層し、(1200 G / 20 分 / 室温 / brake on) の条件で遠心分離を行った。その後、単核球が豊富な buffy coat を含む上清を 50 ml コニカルチューブに回収、(300 G / 10 分 / 室温 / brake off) の条件で遠心し、ペレットを回収した。15 ml コニカルチューブに移し、Easy Sep buffer (STEMCELL Technologies, 2 % 非動化 FBS および 1 mM EDTA 入りの PBS) で Lymphoprep および血小板を除去する目的で、(120 G / 10 分 / 室温 / brake off) の条件で 3 回洗浄を行った。

最後の洗浄の前に適宜希釈した細胞懸濁液中の白血球濃度を、自動血球検査装置 (Microsemi LC-660, HORIBA) を用いて測定し、磁気ビーズ分離のための適切な細胞濃度に調整した。

2-3. 磁気ビーズによる目的細胞分離

EasySep Human CD14 Positive Selection Kit II と EasySep Human Naive CD4+ T Cell Isolation kit II (いずれも STEMCELL Technologies) を用いた。単核球分離で得られた細胞懸濁液を公式プロトコルの方法に従って、単球 (CD14+) と Naïve T 細胞を得た。具体的には細胞懸濁液に抗体カクテルを添加し、5 分間室温で静置。その後、磁気ビーズ (RapidSphere) を加えて、磁石に設置した。ポジティブセレクションである単球 (CD14+ monocytes) の場合は、目的細胞に磁気ビーズが付着しているため、上清を除去して、再度バッファーを加えて、洗浄を行うことを 6 回繰り返した。ネガティブセレクションである Naïve T 細胞の場合は、上清中に目的細胞が含まれているので、磁石に付着した細胞を取り除き、目的細胞が含まれる上清から細胞を回収した。細胞カウントののちに、細胞培養用の細胞培養液を用いて、一定の細胞濃度に調整した。磁気ビーズ分離後で得られた細胞の一部を蛍光標識抗体で染色し、フローサイトメトリーで磁気ビーズ分離後の細胞の純度の測定を行った。

3. 細胞刺激

3-1. TSST-1 による細胞刺激（一次刺激もしくは 1st stimulus）

L-グルタミン、フェノールレッド含有の RPMI1640 に、非動化した FBS（最終濃度 10%）、硫酸ストレプトマイシン明治（明治製薬 最終濃度 0.1 mg/ml）、注射用ペニシリン G カリウム明治（明治製薬 最終濃度 100 単位/ml）を混合したものを培養液として用いる（以降、単に培養液と称する）。96 well マイクロプレート U 底（Falcon）を用い、1 well あたりの培養液の液量は 200 μ L とした。TSST-1 は東京女子医科大学の微生物免疫学教室で購入・凍結保管のものを提供いただいた。

TSST-1 と T 細胞の反応のためには MHC Class II を発現した細胞が必要であるので、同一検体より磁気ビーズ分離で得られた単球を用いた。磁気ビーズ分離で得られた Naive T 細胞と単球を 3:1 で混合し、細胞濃度を 1×10^6 cells/ml に培養液で調整し、最終的に TSST-1 を 10 ng/ml になるように混合した。37°C, CO₂ 濃度は 5% とし CO₂ インキュベーター内で培養を開始した。

なお、実験によっては陰性コントロールとして、TSST-1 を含まないものを用意した。いくつかの実験ではコントロールとして、磁気ビーズ分離を行う前の単核球全体に TSST-1 刺激を行った。最終的な白血球濃度を 1×10^6 cells/ml に調整し、他は同条件で培養を行った。

3-2. recombinant IL-2 (rIL-2) による拡大培養

TSST-1 刺激を 3 日間 (72 時間) 行い、ソーティングで回収した TCR Vbeta2+ CD4+ T cells を recombinant IL-2 (R&D systems, 以下 rIL-2) で増殖させた。96 well マイクロプレート平底を用い培養液中に rIL-2 を 100 IU/ml で混合して $1-2 \times 10^5$ cells/ml、200 μ L/well で 2 日間を 2 サイクルの計 4 日間行った。

3-3. anti CD3/CD28 beads による芽球刺激 (二次刺激もしくは 2nd stimulus)

計 4 日間 rIL-2 で拡大培養した細胞を 1 回遠心 (900 rpm/3 分 ※死細胞除去のため低速遠心) した。 5×10^4 cells/well, 200 μ L/well、anti-CD3/CD28 beads を cells : beads, 1 : 1、rIL-2 10 U/ml でインキュベーションを行なった。陰性コントロールとして、beads なしの状態の細胞を用意した。刺激開始後一定時間で培養上清を回収したほか、刺激前後で細胞を RNA シーケンシング (RNA-seq) 解析用に Buffer RLT+ に回収した。

以上、本実験の流れを図 5 に示す。

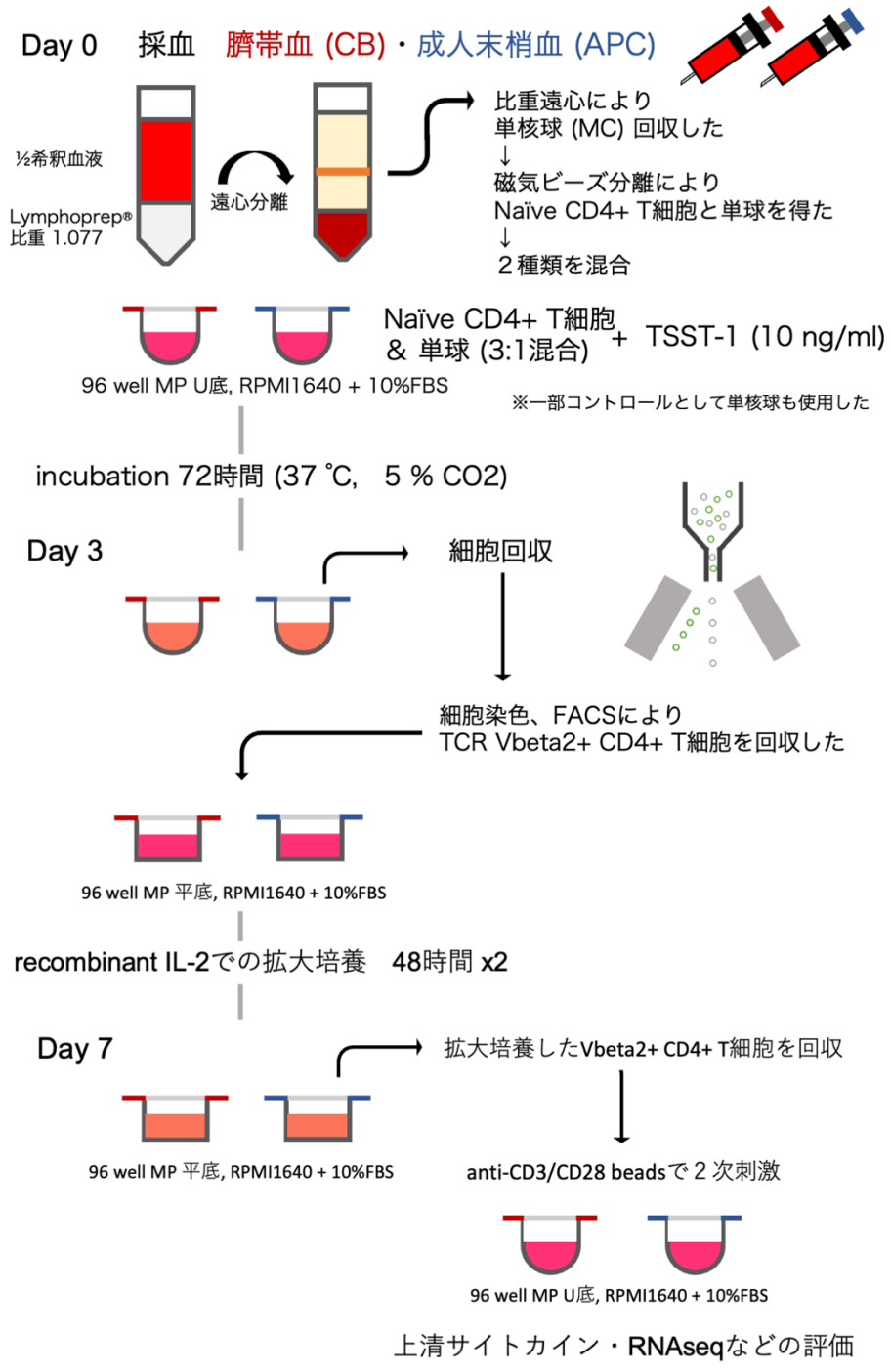


図5：本実験の流れ（序文 図4も参照）

4. フローサイトメトリー

フローサイトメトリーは、青・赤・紫の3種レーザーを有する Moflo XDP (Beckman Coulter)を用いた。毎回本検査の前に、検体の一部を使用してコンペーションを施行した。

4-1. 細胞表面染色

フローサイトメトリーの細胞表面染色の際には、以下のプロトコルで染色を行った。

- ① 使用する蛍光標識抗体を予め混合。
- ② 染色対象の細胞を回収する。
- ③ 細胞懸濁液を wash buffer (1% FBS および 5mM EDTA 入りの PBS) 50 μ L、細胞数は約 1.0×10^6 cells に調整した。抗体ミックスを加えてピペッティング、その後氷上に20分間静置。
- ④ wash buffer 900 μ L を加えて、洗浄 (1300rpm 5min 遠心)。
- ⑤ 7AAD による死細胞染色 (室温暗所 10分、その後同様に洗浄)。フローサイトメトリーによる解析・ソーティングを行う。

4-2. CellTrace Violet による細胞増殖評価

細胞増殖を評価する場合は、CellTrace Violet (Invitrogen)を用い、磁気ビーズ分離後で CD14+Monocytes と混合を行う前の段階で、Naive CD4+ T cells のみに染

色を行った。具体的には以下のプロトコルを用いた。

- ① 5 mM で凍結保存している CellTrace Violet を PBS で 500 倍希釈し同じく PBS で 2×10^7 cells に調整した細胞液と 1:1 で混合する（概ね $200 \mu\text{L}$ ずつ。これにより最終濃度は 5 nM となる）。
- ② アルミホイルで遮光の上で、 37°C に温めたヒートブロックで 10 分間インキュベートする。
- ③ 1 ml の培養液を加えて、3 回洗浄する（300G 5 分間）。最終的に、前述の濃度に調整し、単球と混合して TSST-1 での刺激を開始する。

4-3. 細胞膜透過・固定処理

FOXP3 の細胞内染色を行う場合は、eBioscience Foxp3 / Transcription Factor Staining buffer set (eBioscience) を用い、以下のプロトコルで染色を行った。

- ① 染色対象の細胞を回収する。
- ② 細胞懸濁液を PBS で $100 \mu\text{L}$ 、細胞数は約 3×10^5 cells に調整する。
- ③ Zombie NIR $1 \mu\text{L}$ を加えて死細胞染色を行う。wash buffer $900 \mu\text{L}$ を加えて、洗浄（1300rpm 5min 遠心）。
- ④ $50 \mu\text{L}$ に調整して上記の手法で細胞表面染色を行う。
- ⑤ 細胞表面染色を行った後に、遠心して上清を除去して細胞ペレットのみとしたのち、Fixtation/Permeabilization working solution (concentration と diluent を

1:3 で混合)を 100 μ L 加え、氷上に 30 分静置

- ⑥ 400 μ L の Permeabilization buffer を加え洗浄する (1300 rpm 10 分遠心)。同 buffer で 100 μ L に調整
- ⑦ 予め調整した Foxp3 と TCR Vbeta2 の蛍光標識抗体ミックスを加え、30 分氷上静置する。
- ⑧ 同 buffer 1000 μ L を用いて洗浄し (1300 rpm 10 分遠心)、wash buffer で調整してフローサイトメトリーを行う。

4-4. ソーティング (FACS: fluorescence-activated cell sorting)

アナライズと同じく Moflo XDP®を用いた。回収する細胞はほとんどの場合は TSST-1 刺激を加えた TCR Vbeta2+ CD4+ T 細胞もしくは刺激前・非刺激の同細胞であった。具体的なソーティング方法については、結果の欄で予備実験・検証結果も含めて記す。実際にソーティングを行う際には回収用の buffer として、RNA-seq を行う際には RNeasy Plus Micro Kit (QIAGEN)の Buffer RLT+をマイクロチューブに入れて直接細胞を回収し、30 秒以上ボルテックスを加えて細胞をライセートして-80°Cで保存した。その後に rIL-2 で増殖させる場合には rIL-2 100 U/ml 入りの細胞培養液をチューブに入れて回収、1000 rpm, 3 分間遠心分離を行い、シース液が混入した培養液を除去して新たな rIL-2 100 U/ml 入りの細胞培養液を加えて、 $1-2 \times 10^5$ cells/ml に調整した。

4-5. データの解析

FlowJo v10 (BD Biosciences)を用いてフローサイトメトリーデータの解析を行った。主要な解析項目については、上記のアイソタイプコントロールを用いて、陰性・陽性境界を決定し、陽性割合を主要な評価項目とした。臍帯血と成人末梢血のデータについて R を用いてウェルチの t 検定を行った。有意水準は 0.05 とした。

4-6. 使用した蛍光標識抗体

アナライズおよびソーティングに使用した蛍光標識抗体の情報を表 1 および表 2 に示す。

	クローン	メーカー		クローン	メーカー
FITC CD14	M5E2	BL	BV421 CD25	BC96	BL
APC/Cy7 CD14	M5E2	BL	PE CD25	BC96	BL
PE/Cy7 CD3	UCHT1	BL	APC CD45RA	HI100	BL
V500 CD4	RPA-T4	BD	BV421 CD45RO	UCHL1	BL
APC CD4	RPA-T4	BL	FITC CCR7	G043H7	BL
PerCP CD4	SK7	BL	APC CTLA-4	L3D10	BL
PE TCR Vbeta2	MPB2D5	BC	APC PD-1	EH12.2H7	BL
FITC TCR Vbeta2	MPB2D5	BC	FITC CD28	CD28.2	BL
PE FOXP3	PCH101	eBio	BV421 CD28	CD28.2	BL

BC : Beckman Coulter, eBio : eBioscience, BL : Biolegend, BD : BD bio medical

表 1 : 使用した蛍光標識抗体

	対象	クローン	メーカー
FITC Mouse IgG2a, κ Isotype Control	FITC CCR7, CD28	MOPC-173	BL
PE Rat IgG2a, κ Isotype Control	PE FOXP3	R35-95	BD
PE Mouse IgG1, κ Isotype Control	PE CD25	MOPC-21	BL
APC Mouse IgG1 κ Isotype Control	APC CTLA-4, PD-1	MOPC-21	BL
APC Mouse IgG2b, κ Isotype Control	APC CD45RA	MPC-11	BL
BV421 Mouse IgG1 κ Isotype Control	BV421 CD25	MOPC-21	BL

BL : Biolegend, BD : BD bio medical

表 2 : 使用したアイソタイプコントロール

5. 培養上清中のサイトカイン測定

5-1. 検体回収

一次刺激及び二次刺激を行なった細胞および陰性コントロールに対して、一次刺激の場合は、8 時間、24 時間、48 時間、72 時間に、二次刺激の場合は、4 時間、8 時間、24 時間、72 時間で培養上清を回収し、 -80°C で冷凍保存した。

5-2. サイトカイン測定

サイトカインの測定は Bio-plex 200 を用いた。対象のサイトカインは IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17A, IFN- γ , GM-CSF, TGF β 1 であり、各種サイトカインの抗体ビーズ、検出抗体を混注するなどして測定を行った。

TGF- β 1 については測定前に上清の 1/5 量の 1N 塩酸を加えて 10 分間で活性化

し、その後に同量の 1.2 N NaOH + HEPES で中和処理を行った。予備実験の結果に基づき IL-2 および GM-CSF は 10 倍希釈、IFN- γ については培養上清を 80 倍希釈、TGF- β 1 は活性化及び中和処理のために、1.4 倍希釈、それ以外については希釈なしで測定した。全ての検体は凍結融解後に遠心（5000 rpm / 5 分 / 室温）して沈殿物を取り除き上清で測定を行った。

5-3. サイトカインデータの解析

Bio-plex 200 の解析により得られたデータについては、R (Ver 4.02) を使用し臍帯血と成人末梢血の二群間比較についてウェルチの t 検定を行った。いずれのサイトカインについても相乗平均の評価を行った。

6. RNA シーケンシング

6-1. RNA の抽出

ソーティングで回収した細胞は同キットの Buffer RLT+ に直接回収したのちに、ボルテックスを 30 秒以上かけて細胞をライセートし、-80°C で保存した。

二次刺激の刺激前後の細胞を回収する際は PBS で細胞懸濁液を 96 well マイクロプレートのウェルから回収（刺激後の場合は anti CD3/CD28 beads を専用のマグネットで除去）、1 回遠心（300 G / 5 分 / 4°C）して、上清を可能な限り除去、その後は同様に Buffer RLT+ で溶解して、ボルテックスで細胞をライセートし、

-80°Cで保存した。凍結保存した細胞ライセートは溶解してから RNeasy Plus Micro Kit を用いて RNA を RNA free water に抽出した。抽出した RNA は 3 μ L 分を測定用に、残りを RNA シーケンシング用とし、-80°Cで保存した。

6-2. RNA の濃度及び純度の測定

Agilent 2100 バイオアナライザと Agilent RNA6000 ピコキットを用い、RNA の濃度及び純度の測定を行った。

6-3. RNA シーケンシング (RNA-seq)

抽出して RNA 濃度・純度を測定した検体をタカラバイオ社に発送し、SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing、Nextera XT DNA Sample Preparation Kit を用いてライブラリを作成し、150 bp, pair end の条件で NovaSeq 6000 によって次世代シーケンシングを行った。

6-4. RNA-seq データの解析

タカラバイオ社より納品された fastq ファイルは、研究室内の PC (MacOS 10.15) に新たに構築した RNA-seq の解析パイプラインにより処理され、最終的に各転写物のカウントデータを得た。fastq ファイルは fastqc によりリードの quality check が行われ、trim galore!により Nextera 由来の配列を除去した。再度 fastqc により不要配列が適切に除去されたことを確認したのちに、STAR にて hg38 上へ annotation を行い、その後 featurecount でカウントデータを取得した。

カウントデータは R (Ver 4.02)及び GSEA software (Ver 4.10)で二次解析を行った。発現変動遺伝子 (DEG : differential expressed genes) の解析には R の edgeR パッケージを、エンリッチメント解析と GSEA (gene set enrichment analysis)には R の clusterProfiler パッケージを使用した。

IV. 結果

結果 1-1. 予備実験「磁気ビーズ分離法の純度評価」

<まとめ> 高純度の Naïve T 細胞と単球が磁気ビーズ分離により得られた。

臍帯血及び成人末梢血から比重遠心法で分離した単核球のプロファイルと、磁気ビーズ分離後に得られた細胞のプロファイルを以下のフローサイトメトリーのパネルを用いて解析した（表 3）。

FL1	FL2	FL4	FL5	FL6	FL7	FL8	FL9
FITC	PE	7AAD	PE-Cy7	APC	APC/Fire750	BV421	BV510
CD14	TCR Vbeta2		CD3	CD8	CD45RA	CD45RO	CD4

表 3：予備実験 1 使用パネル

臍帯血の代表的な磁気ビーズ分離前後のフローサイトメトリー解析の流れを図 6 に示す。各細胞の定義については表 4 を参照。また、各 10 例の解析結果は図 7 のようになった。

細胞	フローサイトメトリー上の定義
CD14+ monocytes	(CD45RO+ or CD45RA+) 7AAD- CD14+
T cells	(CD45RO+ or CD45RA+) 7AAD- CD14- lymphocytes+ doublet- CD3+
CD4+ T cells	CD4+ CD8- T cells
CD8+ T cells	CD4- CD8+ T cells
CD4- CD8- T cells	CD4- CD8- T cells
Other white blood cells	(CD45RO+ or CD45RA+) 7AAD- CD14- CD3-
Naïve CD4+ T cells	CD45RO- CD4+ T cells
E/M CD4+ T cells	CD45RO+ CD4+ T cells
TCR Vbeta2+ CD4+ T cells	TCR Vbeta2+ CD4+ T cells

表 4：図 6 における各細胞のフローサイトメトリー解析の際の定義

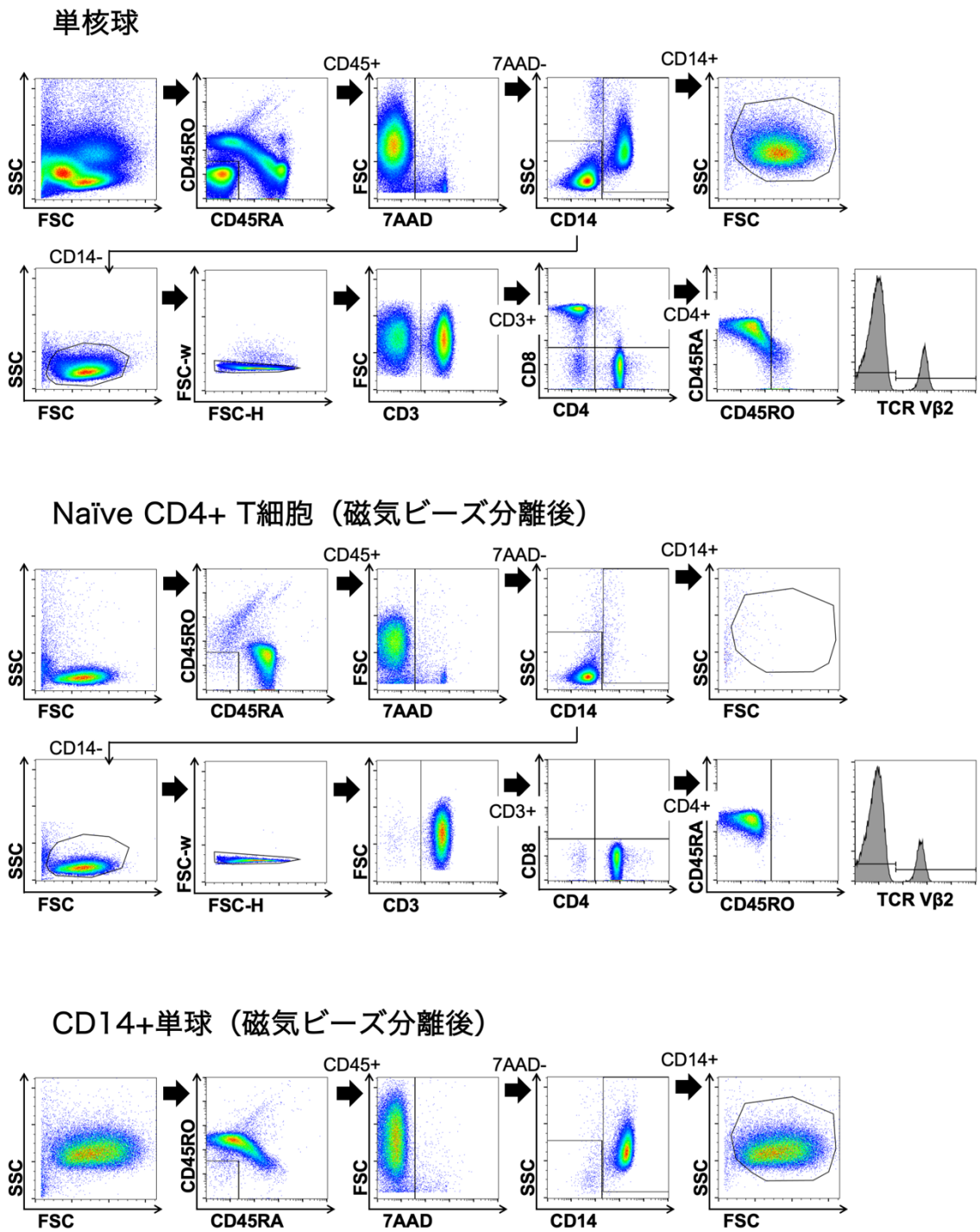


図 6：臍帯血単核球 磁気ビーズ分離前後のフローサイトメトリー解析の評価代表例

Naïve CD4+ T cells は EasySep Human Naïve CD4+ T Cell Isolation kit II、CD14+ monocytes は EasySep Human CD14 Positive Selection Kit II とでそれぞれ単核球より回収した。いずれも高純度で目的細胞が分離されていることがわかる

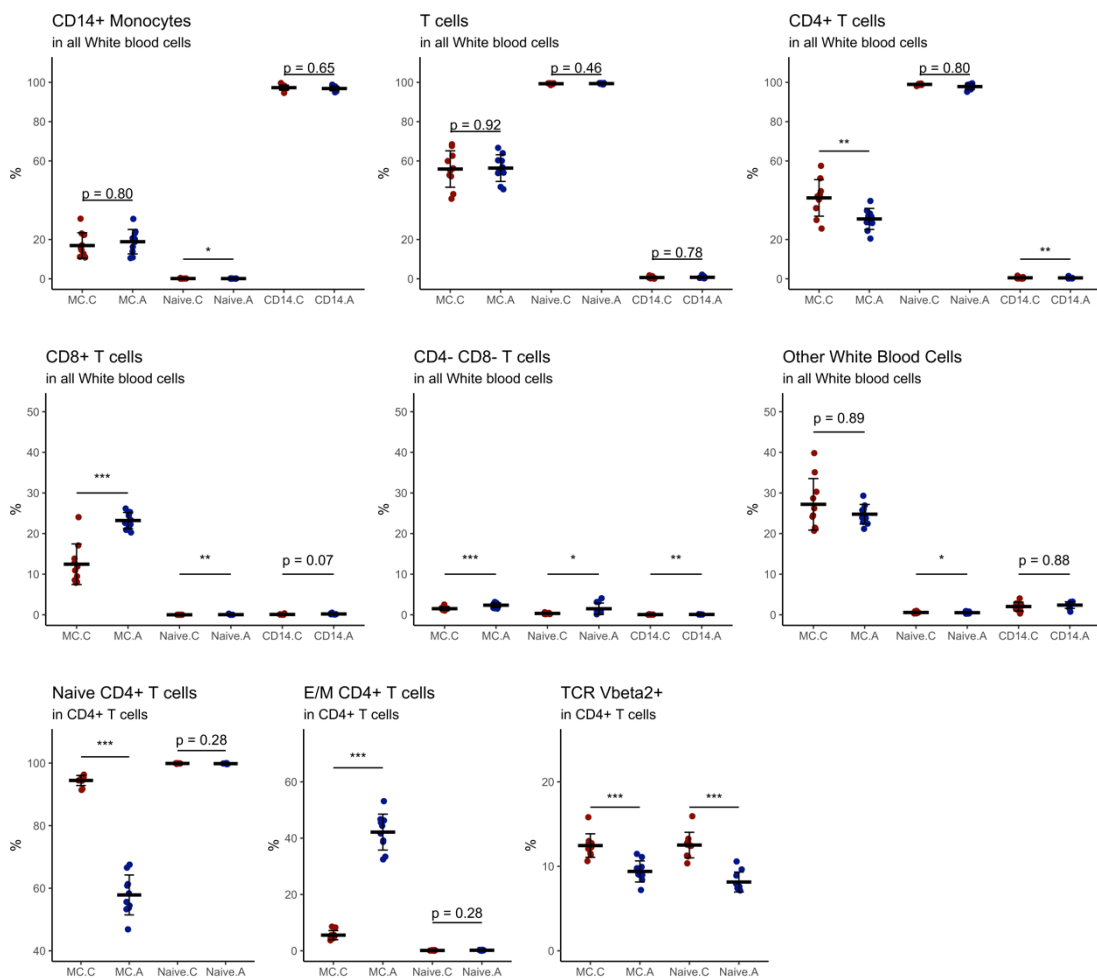


図7：臍帯血及び成人末梢血単核球 磁気ビーズ分離前後のフローサイトメトリー解析まとめ
 中央のバーは平均値。エラーバーは標準偏差。p 値 * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001 注釈なければ
 以下同様。MC: 単核球、Naïve: Naïve CD4+ T 細胞磁気ビーズ分離後、CD14: CD14+monocytes 磁
 気ビーズ分離後 C は臍帯血、A は成人末梢血。

臍帯血・成人末梢血共に、Naïve ではほとんどが、Naïve CD4+ T 細胞となっていることが、CD14
 ではほとんどが CD14+Monocytes となっていることがわかる。わずかながら混入している細胞は
 CD4-CD8-T 細胞 (γ δ T 細胞) の割合が多い。

磁気ビーズ分離後は純度 95%以上と十分に高濃度の検体が得られた。また、磁
 気ビーズ分離後は CD8+ T cells は非常に少なかったため、以降の本実験では磁
 気ビーズ分離後の純度評価で CD8 の染色は行わず、より厳密な Naive CD4+ T
 cells の定義となるように CCR7 をパネルに組み入れた。

結果 1-2. 予備実験「TSST-1 刺激後の Vbeta2+ CD4+ T 細胞回収」

<まとめ> 新しく開発した手法により、刺激後の TCR Vbeta2+ CD4+ T 細胞は高純度で回収可能である。

スーパー抗原刺激を受けた T 細胞では、細胞表面上の CD3 と TCR が複合体を作り細胞内部に移行する[38, 39]。図 8 のように TSST-1 刺激数時間で TCR の発現は弱くなり、12 時間で大多数の細胞で陰性化する。図 9 のように 72 時間の時点では一部の細胞が再度陽性化しているが、大多数は依然陰性のままである。

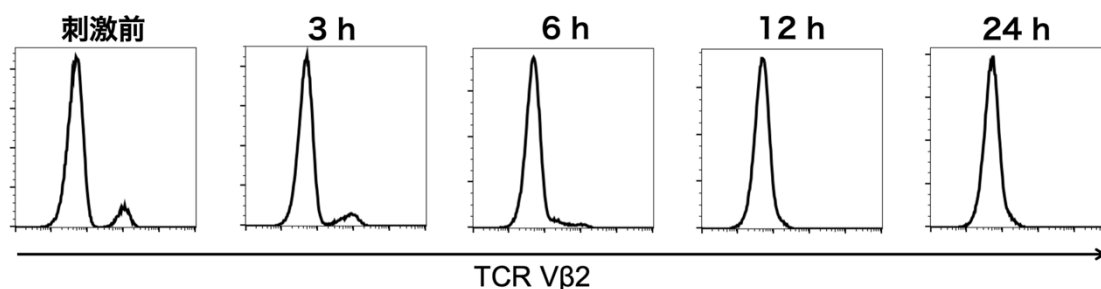


図 8：成人単核球に TSST-1 刺激を行い記載の時間で回収・細胞透過及び固定処理を行わずに染色を行った自検例。CD4+T 細胞の Vbeta2 染色。図 11 と同一例である。

そのため、スーパー抗原を用いる実験で刺激を加えた細胞のみを評価するには、特定の TCR Vbeta 鎖の蛍光標識抗体が細胞内に移行するように染色前に図 9 のようにホルムアルデヒドなどで細胞膜の固定・透過処理を行う必要がある[40]。

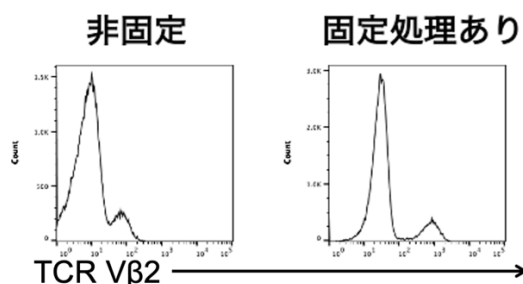


図 9：成人単核球 TSST-1 刺激後 72 時間 自検例 CD4+T 細胞の Vbeta2 染色。

しかし、CD3 は TCR と複合体を形成して細胞表面から内部に移行するので[38, 39]、図 11 で示す様に十分に分離可能な蛍光強度の標識抗体を用いれば、CD4 陽性細胞を CD3 と TCR Vbeta2 で展開することで、「本来の TCR Vbeta2 陽性 CD4+ T 細胞」を単離することは可能である。

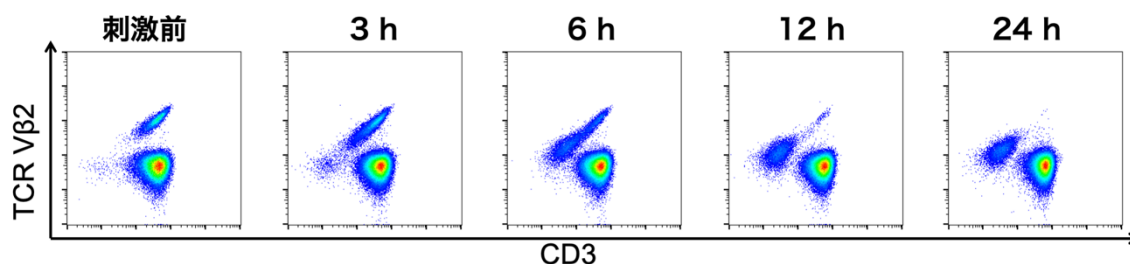


図 10：図 8 と同一例。TSST-1 刺激後の CD4+T 細胞を CD3-Vbeta2 で展開した。

これを利用して、本実験では図 11・12 のようなプロトコルを用いて、細胞のソーティングや非固定での TCR Vbeta2 陽性 CD4+ T 細胞の同定を行なっている。

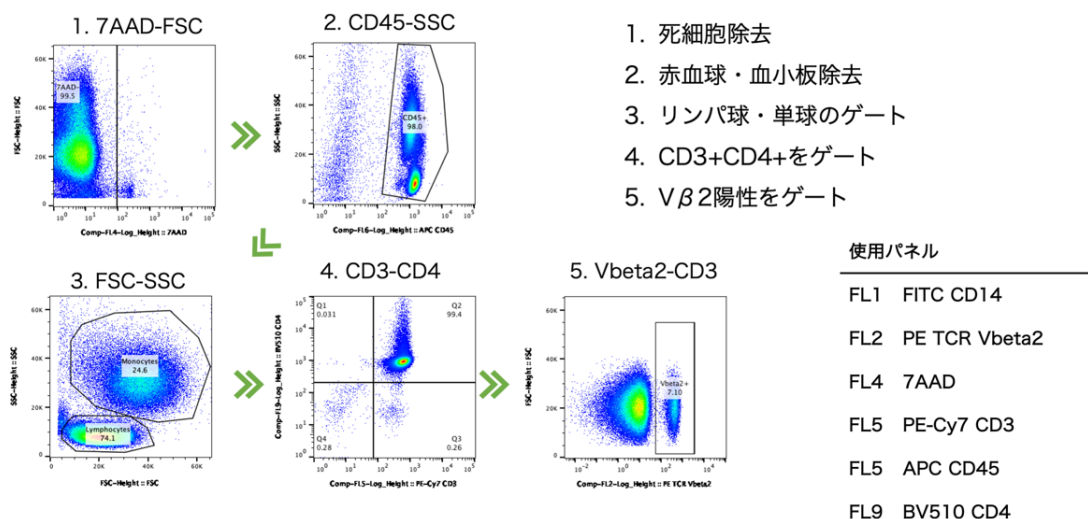


図 11：TSST-1 刺激前の段階での TCR Vbeta2+ CD4+ T 細胞の回収のソーティング手法。TCR および CD3 は細胞表面に存在するので通常の定義で回収可能である。

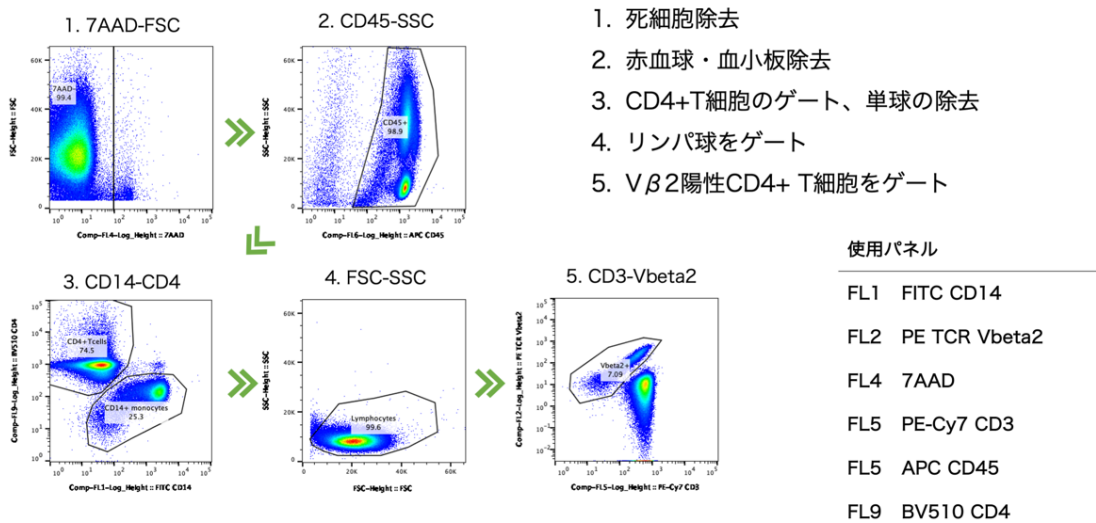


図 12：TSST-1 刺激後の TCR Vbeta2+ CD4+ T 細胞を回収するためのソート手法。

CD4+T 細胞のうち、CD3 と Vbeta2 が陰転化しつつある細胞集団を回収した。単球も CD4 が弱陽性であるので、CD14 で除外した。

この手法は原理的に正しいと思われるが、調べた範囲で同様の実験手法は報告されていない。そのため、実際にこの手法が適切なことを2つの方法で示す。

1つ目は、フローサイトメトリーを用いる方法である。先述のように TSST-1 刺激 72 時間の時点ではまだ TCR および CD3 は細胞表面に完全には再発現していないが、その時点でソーティングして IL-2 存在下で計 4 日間拡大培養を行うと細胞表面に TCR/CD3 は再発現する。その時点で細胞を回収して再度 CD3/Vbeta2 で染色を行った。なお、ソーティング時点で使用した抗体は4日間の拡大培養ののちには完全に陰性化することは確認している。図 13 のように臍帯血、成人末梢血由来の細胞ともに、いずれも 99%前後とかなりの高純度で TCR Vbeta2 陽性 CD4+ T 細胞であることがわかる。

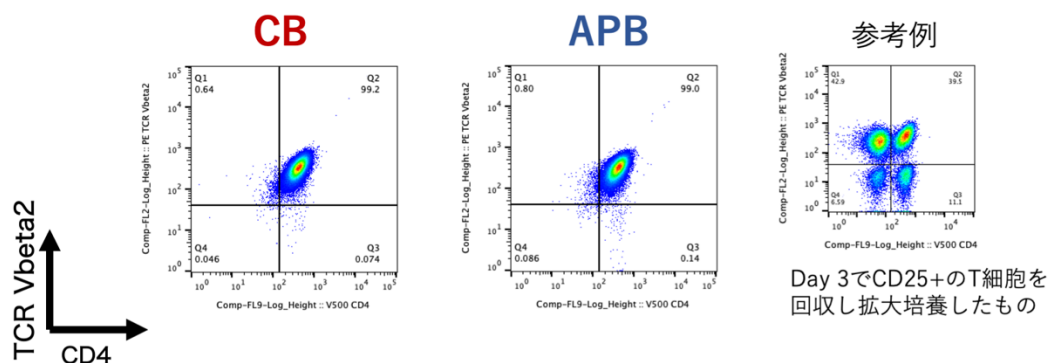


図 13:死細胞除去、CD3 陽性細胞を CD4-Vbeta2 で展開。新手法では 99%前後 TCR Vbeta2+ CD4+T 細胞であった。参考例では Vbeta2-や CD4- (CD8+)の T 細胞が確認される。

2 つ目は、RNA-seq の結果を用いた TCR Vbeta 鎖レパトア解析である。TRBV20-1 (TCR Vbeta2 の遺伝子名)と、その他の TRBV のリード数 (リード長で補正後) を比較して TRBV20-1 が TRBV 全体に占める割合を計算した。

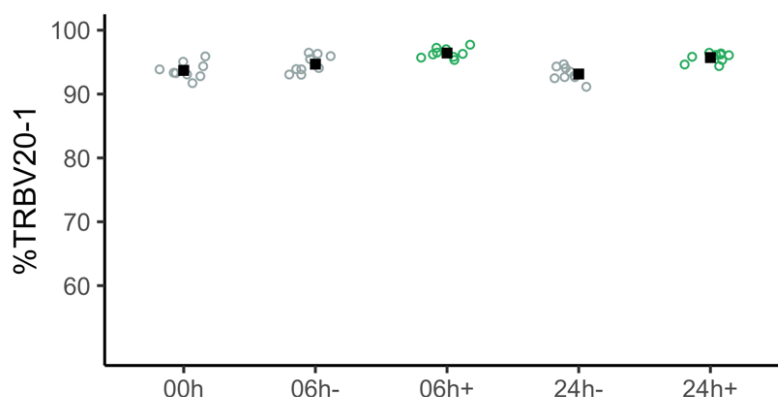


図 14 : RNA-seq を基にした TCR Vbeta 鎖レパトア解析

対象は各時点で臍帯血 5 検体、成人末梢血 4 検体の 9 検体ずつ。黒ドットが平均値。新手法 (06h+: 6 時間刺激及び 24h+: 24 時間刺激、緑) は、従来の方法 (00h:刺激前、06h-: 6 時間非刺激、24h-: 24 時間非刺激、灰色白) と遜色ない純度が得られている。

この手法はあくまで CD4+T 細胞中の Vbeta2+の割合を推定するものだが、図 14 のように刺激前および非刺激のプロトコルと比較しても刺激後の%TRBV20-1 の割合は遜色ない結果であった。

これらの予備実験の結果を踏まえて、実際の解析の結果を示していく。

結果 2-1. TSST-1 刺激後サンプル培養上清の IL-2 評価

<まとめ> Naïve CD4+ T 細胞に対する anti-CD3/CD28 ビーズによる二次刺激でも CB の上清 IL-2 低下が先行研究と同様に再現された。

先行研究[36]と同様に臍帯血および成人末梢血由来の単核球に TSST-1 を加えて incubation した。図 15 に培養上清中の IL-2 の経時変化の結果を示す。

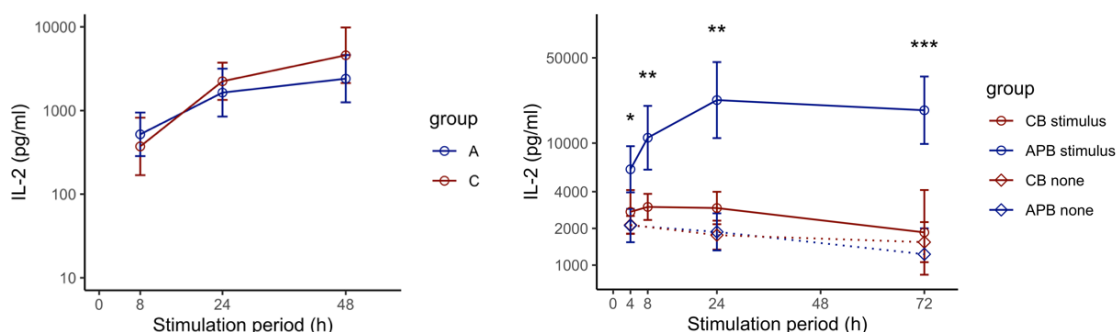


図 15：一次刺激（左）および二次刺激（右）に対する臍帯血／成人末梢血由来単核球の培養上清中の IL-2 時系列変化。一次刺激は N=5 ずつ。二次刺激については、臍帯血が N=6、成人末梢血は N=5 である。縦軸は対数軸であり、○は相乗平均。エラーバーは標準偏差。

一次刺激では TSST-1 なしの陰性コントロールの測定を行ったが、いずれの場合も IL-2 は測定感度未満であったため、グラフ上には記載していない。二次刺激では刺激群と陰性コントロールは共に IL-2 を 10 U/μL (おおよそ 2000 pg/ml) 培養液に加えている。

先行研究[36]とは同じ単核球の比較でも一次刺激後の TCR Vbeta2+ CD4+ T 細胞の回収方法と二次刺激の方法が異なる (TSST-1 と anti-CD3/CD28 beads) が、本実験でも同様に二次刺激後に成人末梢血単核球由来の細胞では IL-2 が非常に高値になるのに対して臍帯血由来の細胞で IL-2 の産生低下が見られた。測定を行ったすべてのタイミングで、有意な差を認めた。

続いて、単核球から磁気ビーズ分離で得られた Naïve CD4+ T 細胞を同様に分

離した CD14+ monocytes の存在下で TSST-1 の刺激を行った結果を図 16 に示す

(以降、このような場合を単に Naïve T 細胞と記載するが、CD14+ monocytes も混注している)。

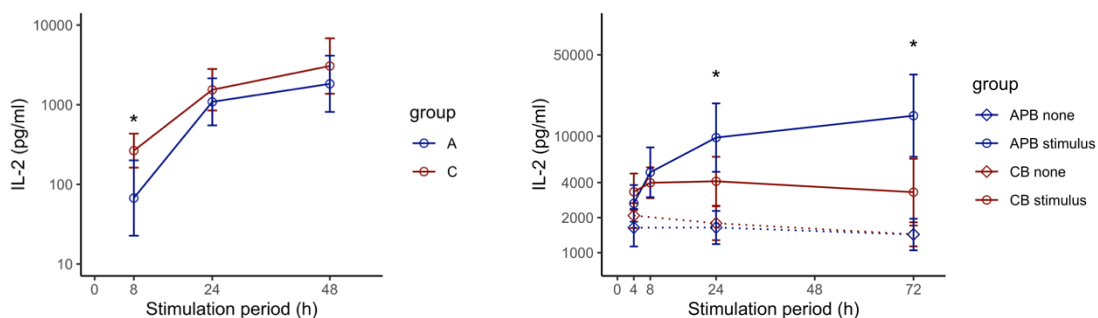


図 16：一次刺激（左）および二次刺激（右）に対する臍帯血／成人末梢血由来 Naïve T 細胞の培養上清中の IL-2 時系列変化。一次刺激は N = 5 ずつ。二次刺激については、臍帯血が N = 6、成人末梢血は N = 5 である。縦軸は対数軸であり、○は相乗平均。エラーバーは標準偏差。

p < 0.05 の有意差が見られるのは 24 時間以降だが（8 時間の時点では p = 0.07）、

単核球に TSST-1 刺激を加えた場合と同様に、成人末梢血由来の細胞では IL-2 の急激な上昇が見られるのに対して、臍帯血での上昇は高くはなかった。

先行研究[36]でみられた二次刺激での臍帯血単核球の IL-2 産生能の低下という

現象は、二次刺激を TSST-1 から anti-CD3/CD28 beads に変更しても、また刺激

を受ける対象を単核球から Naïve T 細胞のみに変更しても、同様に再現された。

Naïve T 細胞自体がこの現象の原因となる臍帯血独自の性質を有しているものと

考えられる。

結果 2-2. 培養上清中のその他のサイトカイン

<まとめ> 抑制性サイトカインである IL-10 や TGF- β 1 は、刺激後の臍帯血と成人末梢血の間で有意差は見られなかった。

測定のサンプルの対象は IL-2 の時系列変化と同じく、Naïve T cells 由来の細胞と単核球由来の細胞である。「方法」であげた TGF- β 1 以外のサイトカインは一次刺激の 72 時間後、二次刺激の 24 時間後、二次刺激の 72 時間後に培養上清の回収を行い、サイトカイン濃度の測定を行った。培養液中にウシ血清由来と思われる 4565 pg/ml (duplicated の測定)と比較的高濃度の TGF- β 1 が元より混入していたため、TGF- β 1 の結果には培養液の TGF- β 1 濃度もグラフ上に記載して、時系列変化を非刺激サンプルとともに示している (次ページ図 17、18)。

TGF- β 1 は元の培養液中に含まれることに加えて、一次刺激・二次刺激ともに非刺激サンプルも培養液のベースよりも高値で、かつ時系列で増加傾向にあることから、TSST-1 の刺激がなしで分泌すると推測される。Naïve CD4+ T cells と単核球のサンプルは一次刺激では白血球濃度が等しい (T 細胞は単核球の方が少ない) が、単核球の方が高い傾向にある。測定バッチが異なるので確定はできないが、Naïve T 細胞以外の細胞もベースで分泌しているものと推測される。

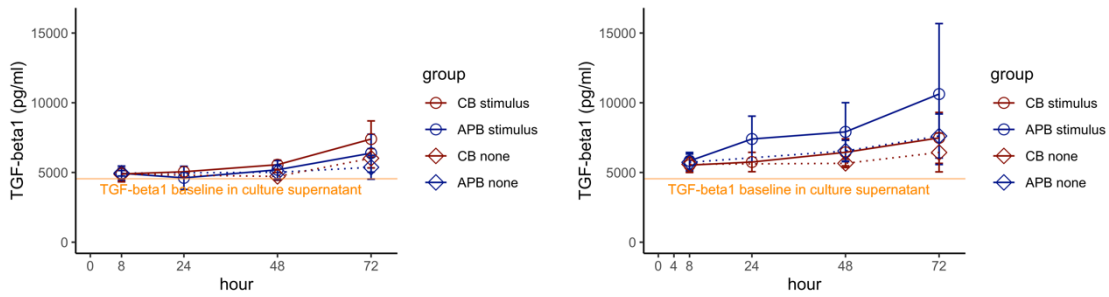


図 17：一次刺激での培養上清中の TGF-beta1 の時系列変化（左：Naïve T 細胞、右：単核球）サンプル数は一次刺激については臍帯血 6、成人末梢血由来 5 である。縦軸は対数軸であり、○は相乗平均。エラーバーは標準偏差。

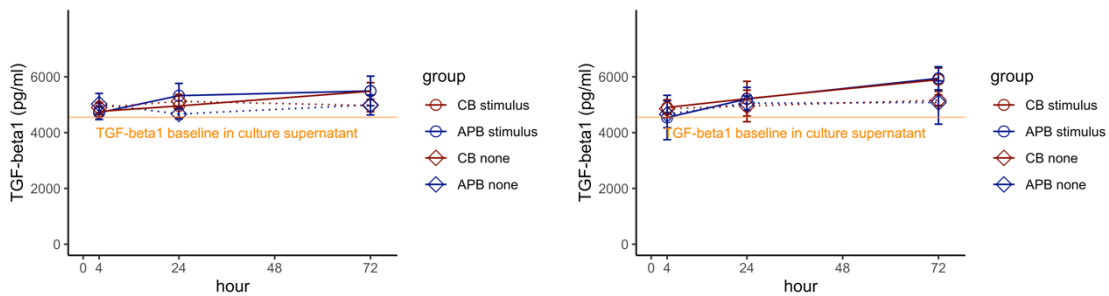


図 18：二次刺激での培養上清中の TGF-beta1 の時系列変化（左：Naïve T 細胞、右：単核球）サンプル数は二次刺激については臍帯血 7、成人末梢血由来 6 である。縦軸は対数軸であり、○は相乗平均。エラーバーは標準偏差。

TGF- β 1 以外のサイトカインでは、予備実験において非刺激サンプルの培養上清および培養液中には測定下限以上の濃度のサイトカインは検出されなかった。そのため、TSST-1 の刺激を加えたサンプルの結果（1st 72h, 2nd 24h, 2nd 72h）のみ図 19 に示す。二次刺激後の Naïve T 細胞同士の比較で CB/APB で有意な差が見られたものは IL-2 以外にほぼなかった (IL-17A, IL-6 などは有意差あるが濃度自体非常に低い)。抑制性サイトカインの IL-10 についても有意差は見られなかった。一方で、一次刺激後は IFN- γ 、IL-10、GM-CSF などは CB が高かった。単核球と Naïve T 細胞を比較すると、IL-17A や IL-10 は成人単核球でいずれも高

い傾向にあり、Effector T細胞やMemory T細胞がサイトカインを産生し、そのサイトカインがNaïve T細胞の分化に影響を与えたことが考えられる。

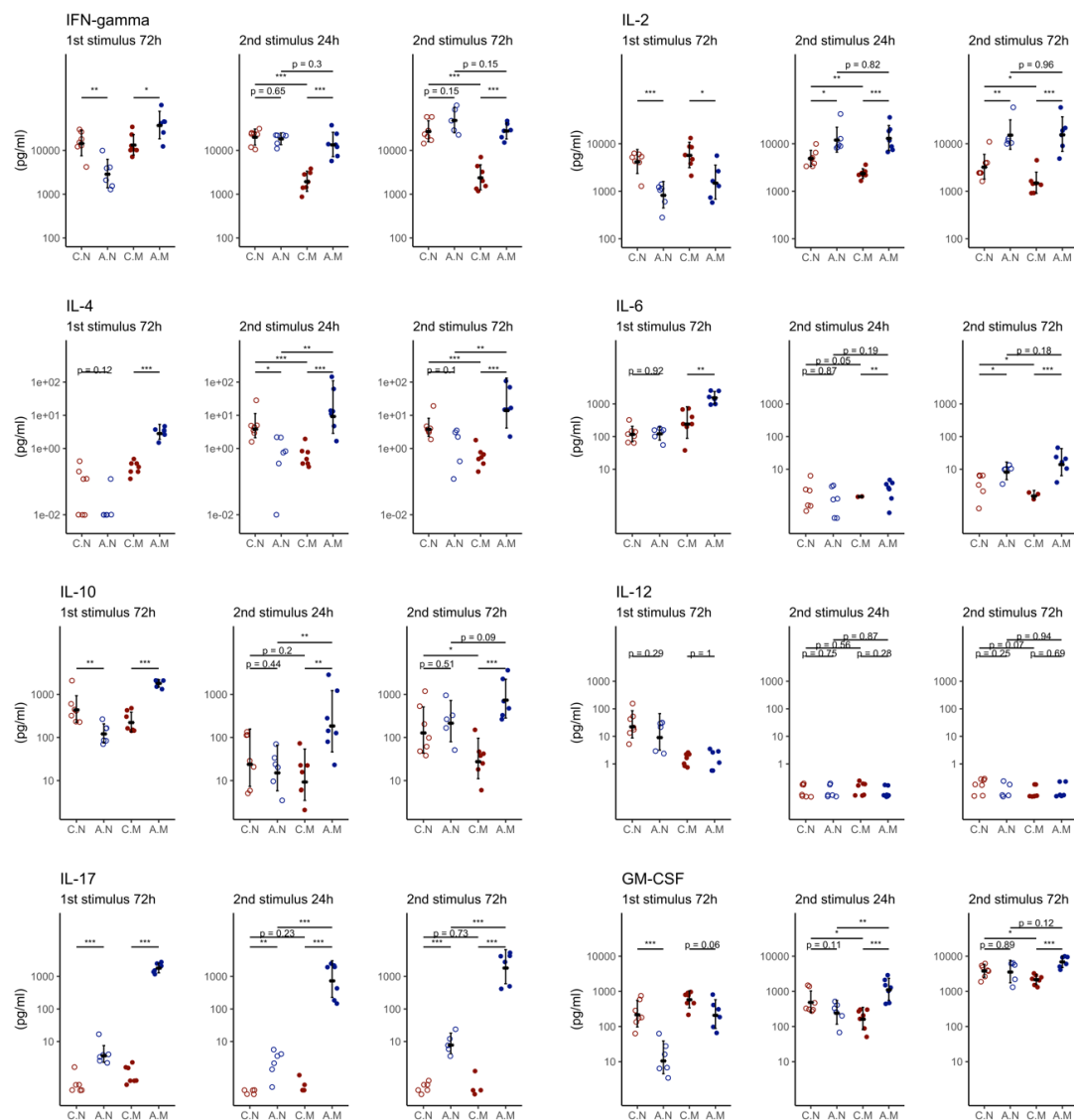


図 19: 一次刺激 7 2 時間・二次刺激 2 4 時間・二次刺激 7 2 時間における各種サイトカイン (IFN-gamma, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17A, GM-CSF) の培養上清濃度。

C.N: 臍帯血由来の Naïve CD4+T 細胞(N = 7) 赤の白抜き○、A.N: 成人末梢血由来の Naïve CD4+T 細胞 (N = 6) 青の白抜き○、C.M: 臍帯血由来の単核球(N = 7) 赤の塗りつぶし●、A.M: 成人末梢血由来の単核球 (N = 7) 、青の塗りつぶし●

縦軸は対数軸であり、中央バーは相乗平均 (算出不可は省略)。エラーバーは標準偏差。

結果 3-1. フローサイトメトリー①

＜まとめ＞臍帯血では一次刺激後に制御性 T 細胞のマスター転写因子である FOXP3 の発現亢進が見られる。また一次刺激後は臍帯血の方が増殖傾向にある。

「方法」に記載したように、TSST-1 刺激前に細胞増殖評価を目的に、Naïve CD4+ T cells を Cell Trace Violet で染色を行ったのちに、TSST-1 刺激を行った（コントロールとしての単核球の評価はしていない）。使用したパネルは以下の通り。

FL1	FL2	FL5	FL6	FL7	FL8
FITC	PE	PerCP	APC	Zombie NIR	(CellTrace Violet)
TCR Vbeta2	FOXP3	CD4	CD25 / CTLA-4		

表 6：図 20、21 の解析に用いたフローサイトメトリーのパネル

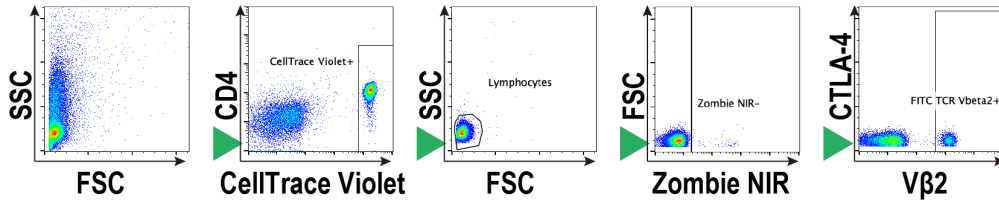
TSST-1 刺激前 (day 0) および、刺激後 16 時間 (day 1)、刺激後 40 時間 (day 2)、刺激後 64 時間 (day 3) のタイミングで細胞を回収し、固定処理と蛍光標識抗体の染色（方法に記載のように、TCR Vbeta2 および FOXP3 については、固定処理・細胞膜透過処理後に染色を行った）し、フローサイトメトリーでの解析を行った。

FOXP3、CD25、CTLA-4 については、それぞれの条件（TSST-1 刺激の有無、採取時間）での TCR Vbeta2+ CD4+ T 細胞においての、蛍光標識抗体の同一アイソタイプのコントロールを用いて、陰性／陽性境界を決定している。そのため、条件によって陰性／陽性境界が異なる場合がある（例えば、図 20 で示すように刺激前と刺激 72 時間後の FOXP3）。条件が同じであれば臍帯血および成人末梢血

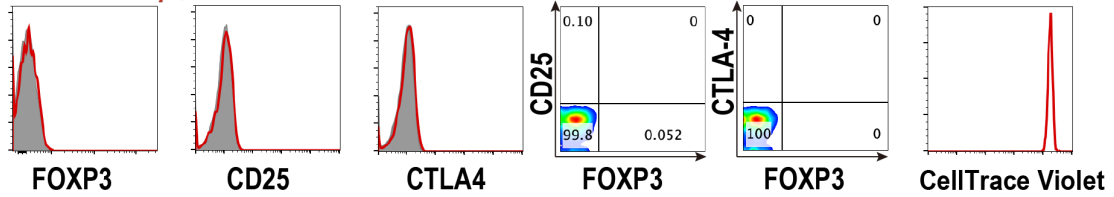
では、アイソタイプコントロールで規定される陰性／陽性境界は同一であることを確認し、同一条件では同じ陰性／陽性境界で定義している。

以下に、代表例を用いて、TSST-1 刺激前と刺激後の TCR Vbeta2+ CD4+ T 細胞の展開までのフローサイトメトリーの流れ（図 20）と、臍帯血および成人末梢血由来の TCR Vbeta2+ CD4+ T 細胞のプロファイルの結果を示す。サンプル数はそれぞれ 5 ずつである（図 21、22）。

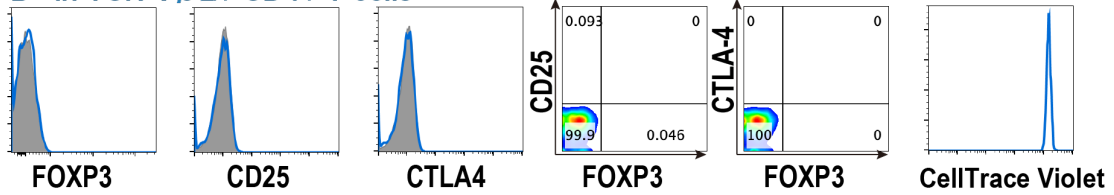
一次刺激前



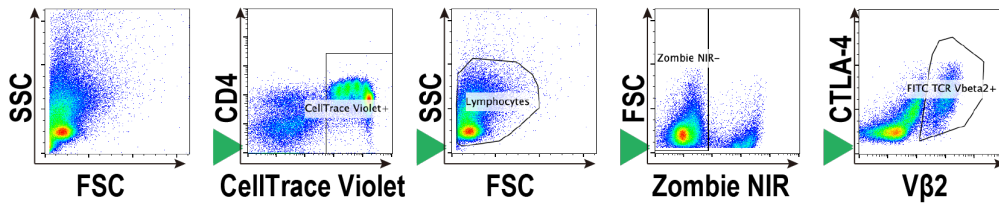
CB in TCR-Vβ2+ CD4+ T cells



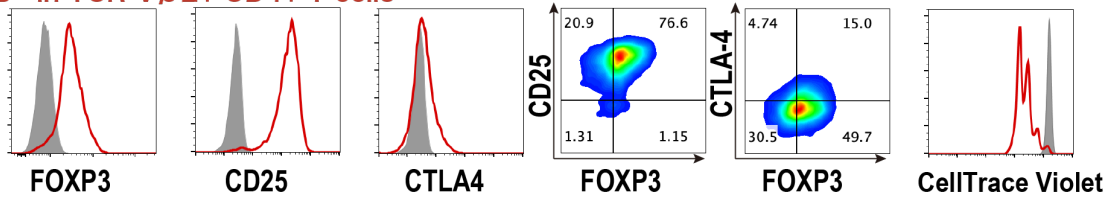
APB in TCR-Vβ2+ CD4+ T cells



一次刺激 64 時間後



CB in TCR-Vβ2+ CD4+ T cells



APB in TCR-Vβ2+ CD4+ T cells

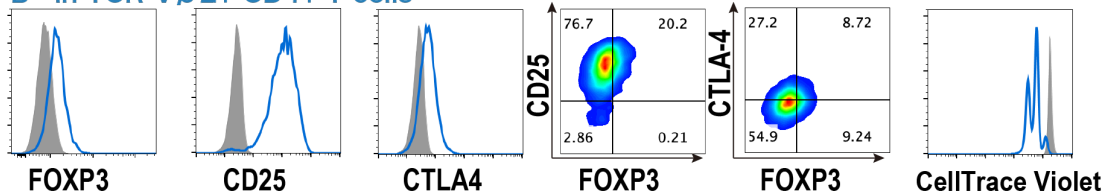


図 20：刺激前と刺激後 64 時間それぞれの代表例とフローサイトメトリーの解析の流れ
灰色はアイソタイプコントロールを示す

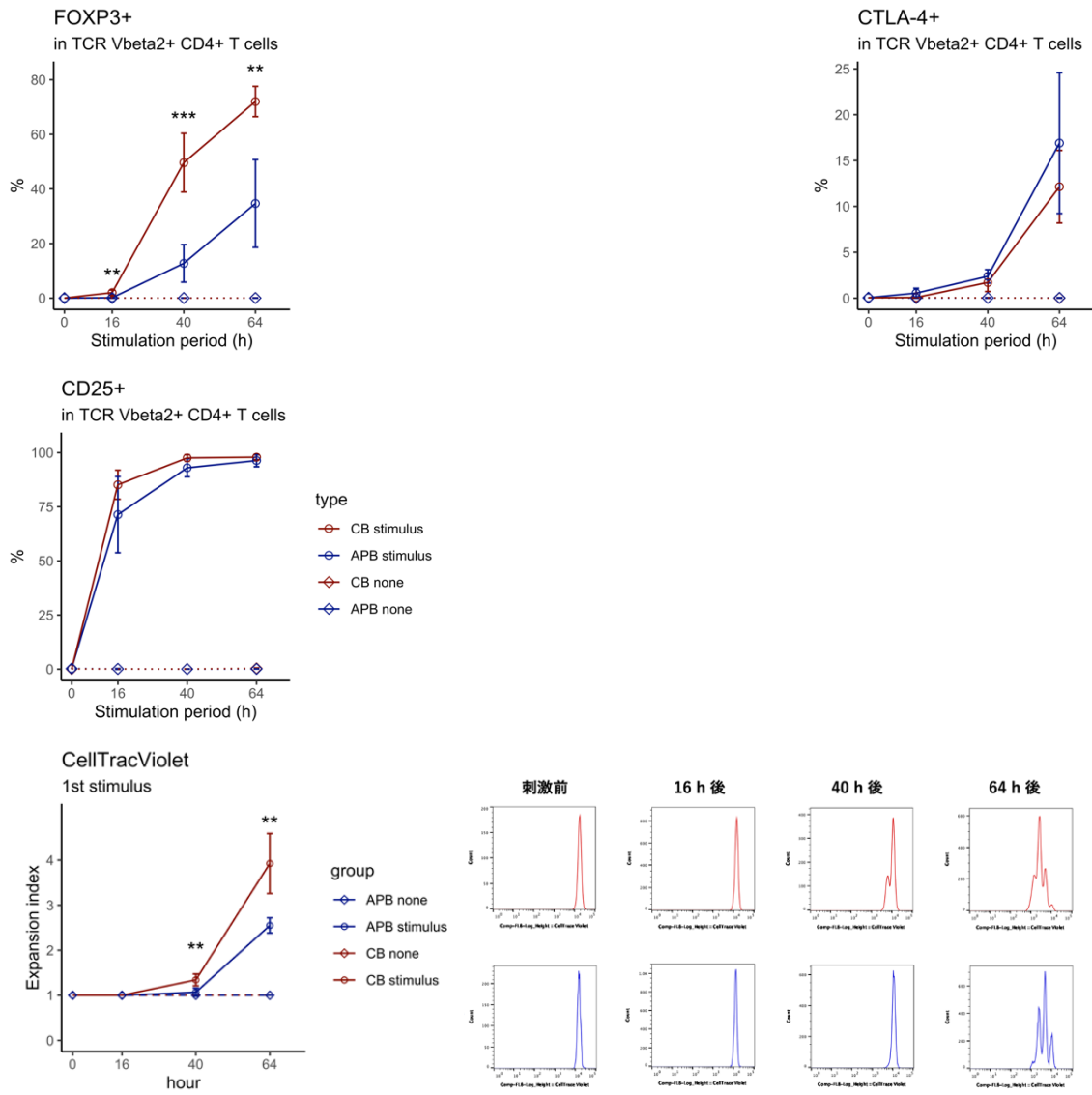


図 21：フローサイトメトリーの解析結果①

TCR Vbeta2+ CD4+ T 細胞上の表面抗原・FOXP3 の発現の時系列的フォロー

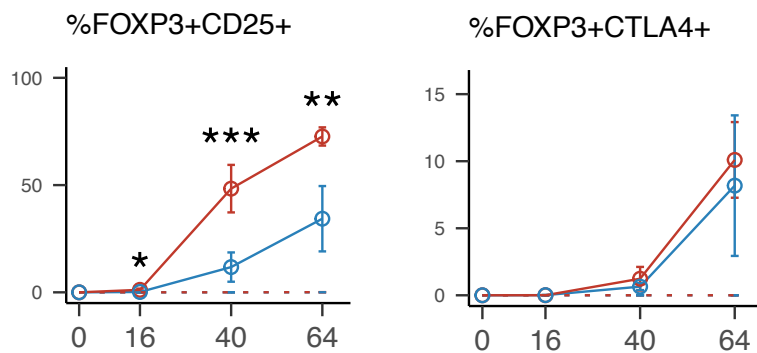


図 22：フローサイトメトリーの解析結果②

TCR Vbeta2+ CD4+ T 細胞上の表面抗原・FOXP3 の発現の時系列的フォロー

刺激後の FOXP3 の発現は臍帯血由来の Naïve CD4+ T 細胞で有意に高かった。

また、CD25 は臍帯血で早期に高くなる傾向はあった（16 時間、40 時間でそれ

ぞれ $p = 0.13, 0.0504$ ）。CTLA-4 の発現は成人末梢血で高い傾向があったものの

有意差は見られなかった（16 時間では $p=0.07$, 40 および 64 時間では $p=0.25$ ）。

また、細胞分裂の評価では、臍帯血由来の方が成人血よりも細胞分裂の開始が早

く、64 時間の時点まで細胞分裂の回数も多いことがわかった。

なお、二次刺激前後も同様の評価を試みたが、CellTrace Violet および細胞固定処理による細胞へのダメージが強く、評価はできなかった。

結果 3-2. フローサイトメトリー②

<まとめ>表面染色では臍帯血の免疫寛容を示唆する結果は得られなかった。

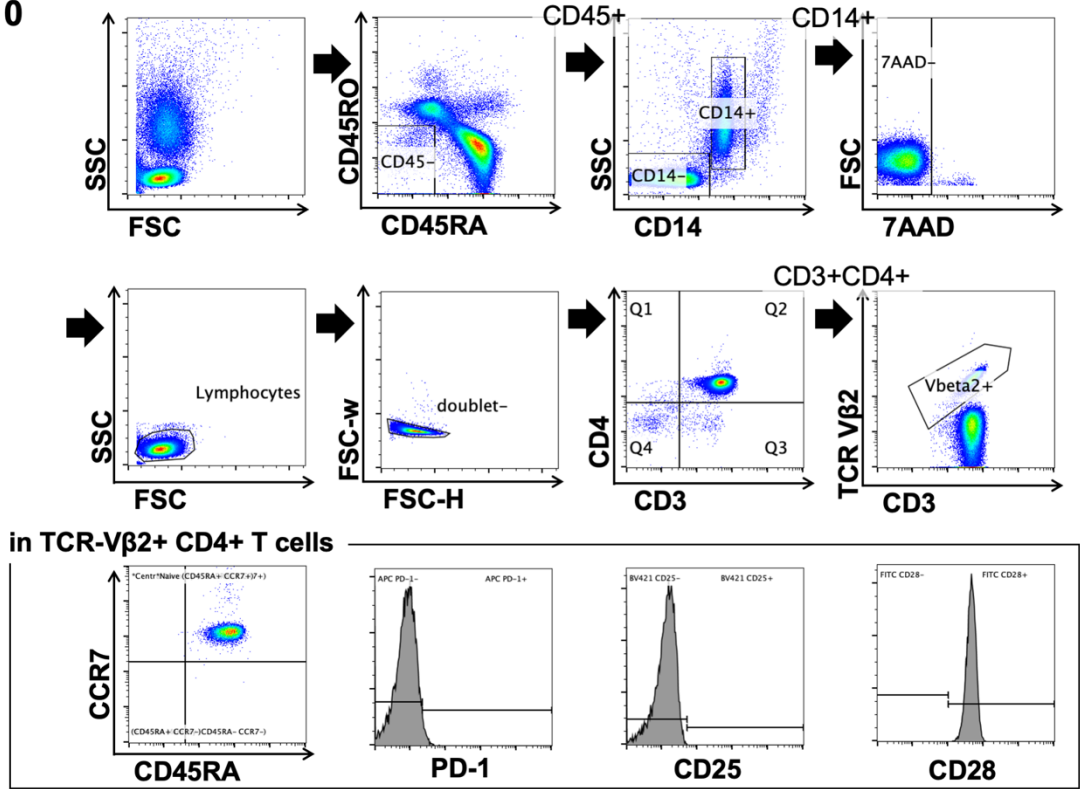
表 5 に示す抗体パネルを用いて、TSST-1 刺激前後の TCR Vbeta2+ CD4+ T 細胞の評価を行なった。対象は Naïve CD4+ T 細胞と単核球であり、刺激前と刺激 72 時間後、非刺激の 72 時間後のサンプルを回収し解析した。

FL1	FL2	FL4	FL5	FL6	FL7	FL8	FL9
FITC	PE	7AAD	PE/Cy7	APC	APC/Cy-7	BV421	V500
CCR7	TCR Vbeta2		CD3	CD45RA	CD14	CD45RO	CD4
FL1	FL2	FL4	FL5	FL6	FL7	FL8	FL9
FITC	PE	7AAD	PE/Cy7	APC	APC/Cy-7	BV421	V500
CD28	TCR Vbeta2		CD3	PD-1	CD14	CD25	CD4

表 5 : 図 23 の解析に用いたフローサイトメトリーのパネル

以下に、刺激前(非刺激も同様)と刺激後 72 時間の代表例を用いて、TCR Vbeta2+ CD4+ T 細胞の展開までのフローサイトメトリーの流れを示す。

Day 0



Day 3

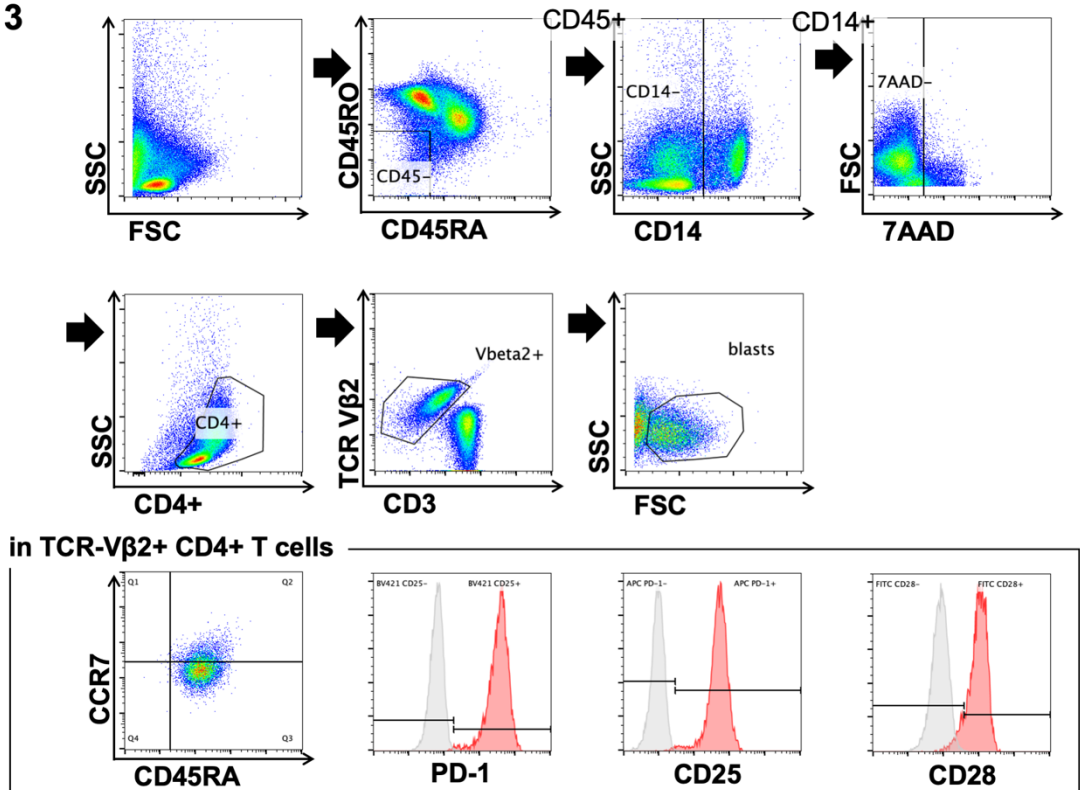
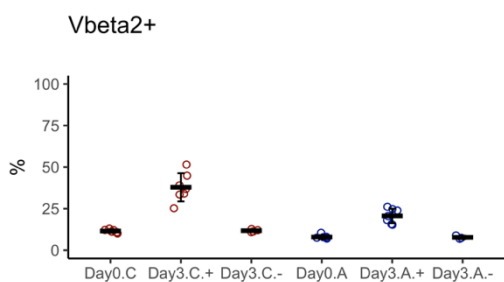


図 23 : 刺激前(Day 0)と刺激後 72 時間(Day 3)のフローサイトメトリー解析例 (CB)

以下、解析の結果を示す。各グラフで Day0.C、Day3.C.+、Day3.C.-はそれぞれ CB 由来の刺激前・刺激後 72 時間・非刺激 72 時間である。Day0.A、Day3.A.+、Day3.A.- は同様に APB 由来である。各点が 1 サンプルの結果を示している。

Naïve CD4+



Mononuclear cells

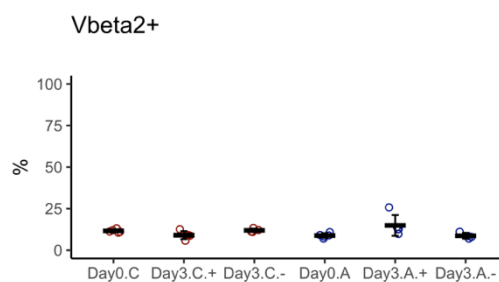
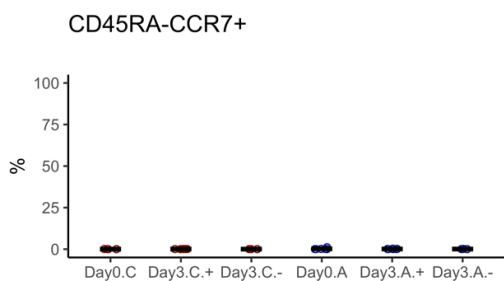


図 24 : CD4+ T 細胞中の%TCR Vbeta2+の割合

横軸の C は臍帯血由来、A は成人末梢血由来であることを示す。Day0:刺激前、Day3 の+:刺激後 72 時間、Day3 の-:非刺激 72 時間。中央バーは平均値、エラーバーは標準偏差。

Naïve CD4+



Mononuclear cells

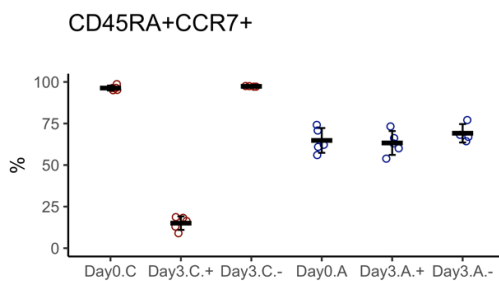
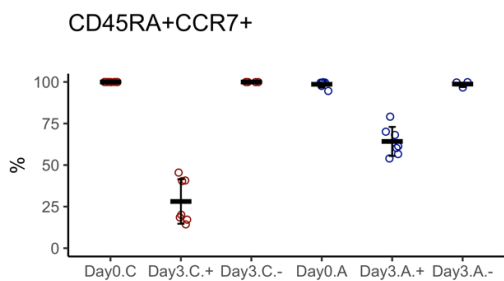
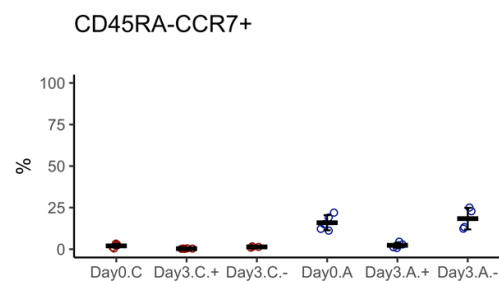
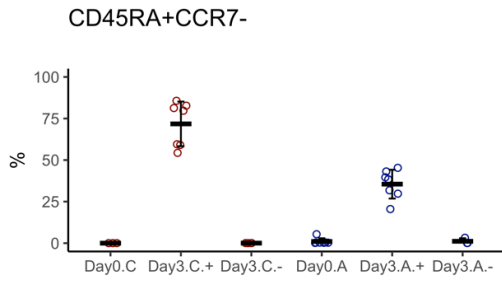


図 25 : TCR Vbeta2+ CD4+ T 細胞中の各細胞が占める割合

図 22 と同様に横軸の C は臍帯血由来、A は成人末梢血由来。Day0:刺激前、Day3 の+:刺激後 72 時間、Day3 の-:非刺激 72 時間。中央バーは平均値、エラーバーは標準偏差。

Naïve CD4+



Mononuclear cells

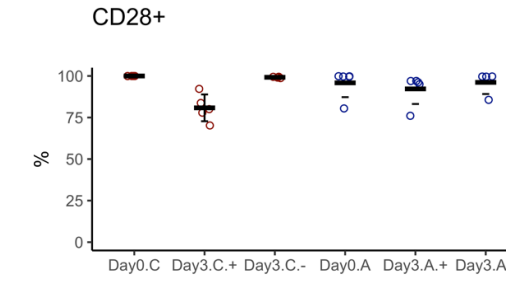
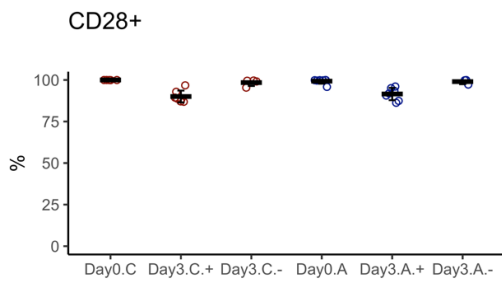
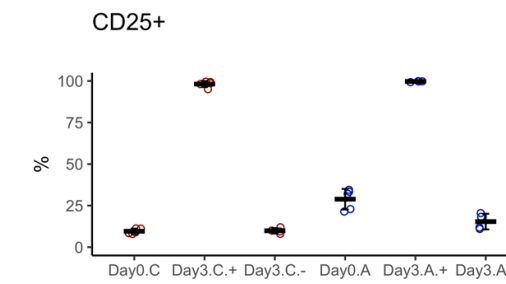
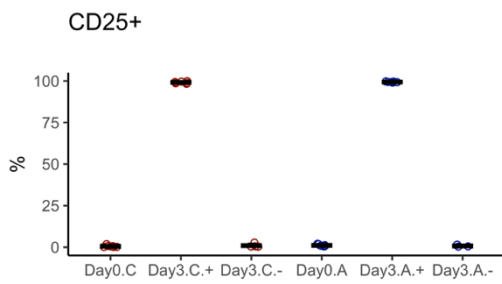
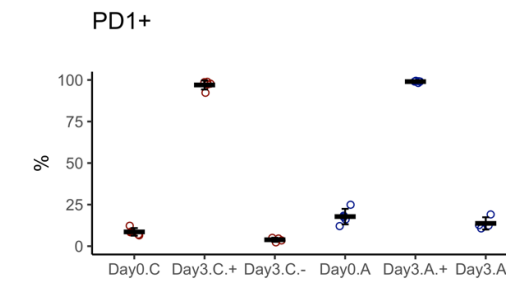
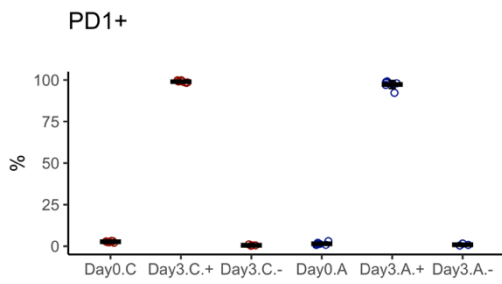
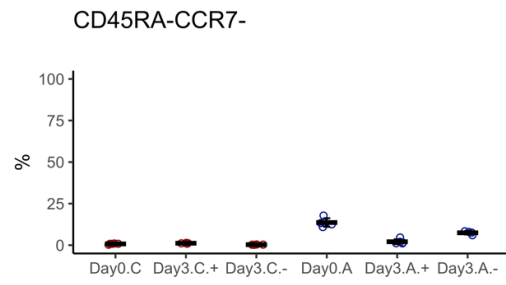
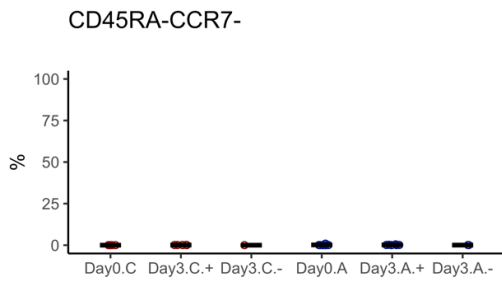
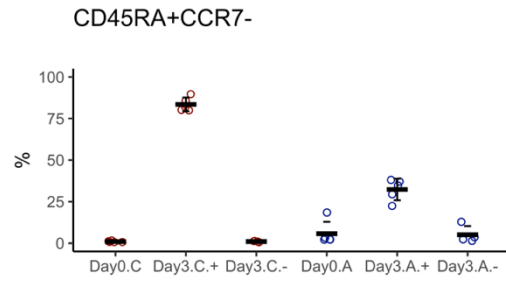


図 25 続き

これらの結果から、臍帯血由来の細胞がより免疫寛容に関わる傾向を示すようなこと（例えば、制御性 CD4+T 細胞のマーカーである CD25 や PD-1 の発現が高いなど）は示されなかった。一方で Vbeta2+ CD4+ T 細胞の表面抗原発現の評価を縦覧すると、Day 0 の臍帯血 Naïve CD4+T 細胞、成人末梢血 Naïve CD4+T 細胞および臍帯血単核球は、どの表面抗原でもほぼ同じような値であることがわかる。Day 3 (TSST-1 刺激後)の結果を見ると、臍帯血・成人末梢血の Naïve CD4+ T 細胞の表面抗原の発現は異なっており、成人末梢血の Naïve CD4+ T 細胞と単核球は同様の傾向にあるように見える。つまり、「成人末梢血由来の Naïve CD4+ T 細胞は刺激前には臍帯血と同じような表面抗原の発現パターンであるが、TSST-1 刺激後には成人末梢血単核球と同様のパターンとなる」ことが疑われる。この妥当性を示すために、表面抗原の発現パターンをもとにした各時点でのクラスター解析の結果を示す。

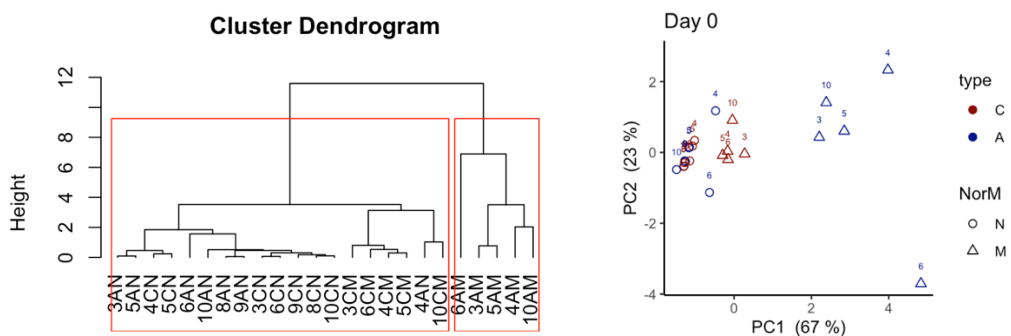


図 26：Day 0 でのクラスター解析（デンドログラムと主成分分析）
 主成分分析の軸の%はそれぞれ第一成分、第二成分の寄与度を示す
 C：臍帯血由来、A：成人末梢血由来、N：Naïve T 細胞、M：単核球（図 27 も同様）

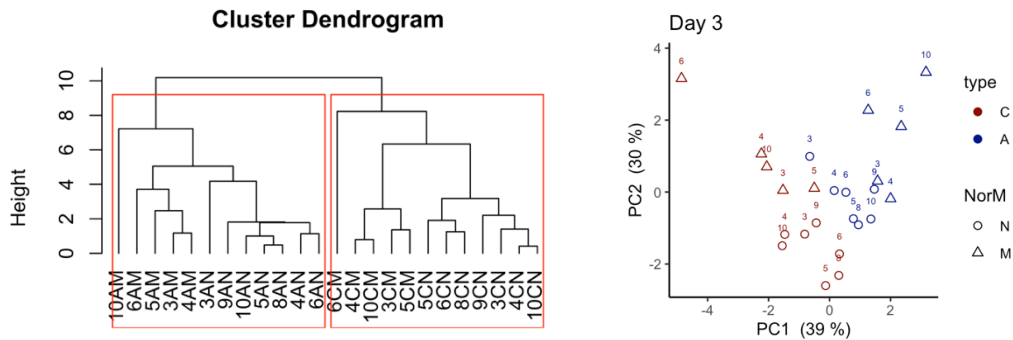


図 27：Day 3 での刺激サンプルのクラスタリング解析（デンドログラムと主成分分析）

Day 0 および Day 3 で 2 つのクラスターに分けることの妥当性について、R のパッケージの clusterboot を用いて Jaccard 係数を算出した。Jaccard 係数はクラスターの類似性を評価する指標であり、類似度が高いほど 1.0 に近づくが、Day 0 および Day 3 をそれぞれ 2 つのクラスターに分けた場合の Jaccard 係数はそれぞれ 0.0, 0.21 となり、Day 0 については 2 つのクラスター（成人末梢血由来の単核球とそれ以外）に分けることについて非常に高い妥当性があり、Day 3 についても 2 つのクラスター（臍帯血と成人末梢血それぞれ）に分けることに比較的高い妥当性があることが示された。

あくまで今回評価した表面抗原の結果のみであるが、TSST-1 刺激による細胞の変化はサンプルの由来（臍帯血か成人末梢血か）よりも、種類（Naïve T 細胞か単核球か）による、と言える。

結果 4-1. RNA-seq のための細胞回収・RNA 抽出

<まとめ> RNA-seq は 2 回に分けて行い、全ての RNA サンプルはシーケンシングを行うにあたり十分に高純度であった。

RNA-seq の解析は 2 回に分けて行った。1 回目（2020 年施行 図 28）は Naïve T 細胞の一次刺激に対する早期の反応を観察する目的で、刺激前及び TSST-1 刺激後 6 時間、刺激後 24 時間でフローサイトメトリーにより細胞回収を行った（図 28）。非刺激（培養液に TSST-1 を加えない陰性コントロール）についても同じタイミングで回収を行った。パネルとソート手法については予備実験の項に記載の通りである。回収した細胞はいずれも TCR Vbeta2+ CD4+ T 細胞である。臍帯血 5 人分と成人末梢血 4 人分、合計 45 サンプルの解析を行った。



図 28：2020 年施行の RNA-seq のサンプル（合計 45）

2 回目（2021 年施行 図 29）は一次刺激後の Naïve CD4+ T 細胞の分化と、二次刺激に対する反応を観察する目的で、一次刺激後 72 時間でフローサイトメトリーにより細胞回収したものと、rIL-2 で 4 日間拡大培養ののち、二次刺激前と刺激後 24 時間で細胞回収を行った。臍帯血・成人末梢血ともに一次刺激 72 時間

後は3人分、二次刺激前後は4人分ずつ合計22サンプルの解析を行った。2020年施行のものとはサンプルは同一人物由来のものではなく測定バッチも異なるので、直接の比較は行わない。

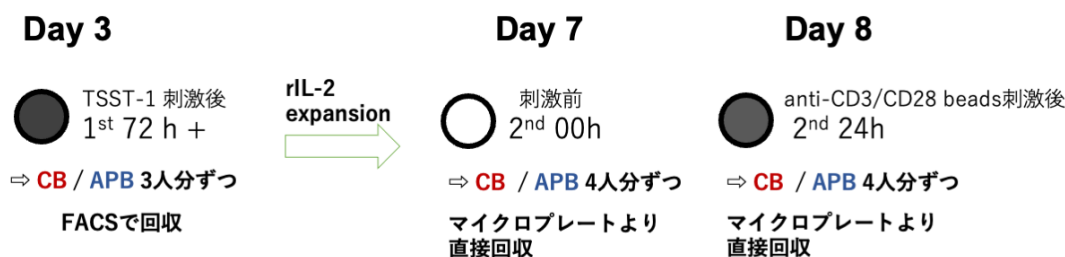


図 29：2021 年施行の RNA-seq のサンプル (合計 22)

いずれも細胞融解を行って一度-80°Cで凍結保存した。融解後に RNA 抽出を行い、再度凍結保存した。一部の検体を用いて Bio-Analyzer Agilent2100 システムで濃度及び純度の測定を行った(図 30)。純度(RIN 値)は、2020 年分は平均値 9.34 (最小 7.9, 最大 10.0)、2021 年分は平均値 9.48 (最小 8.6, 最大 10.0) であり、いずれも RNA-seq の解析を行うにあたり十分に高純度であった。

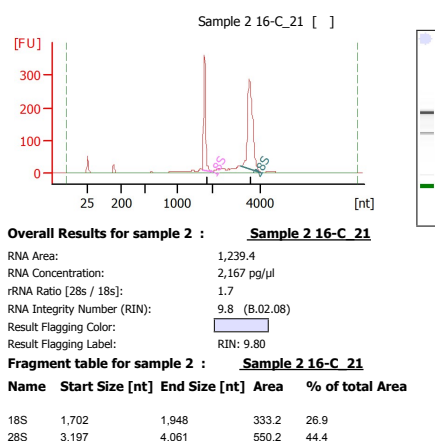


図 30：Bio-Analyzer Agilent2100 での RNA 純度及び濃度の評価の代表例

結果 4-2. RNA-seq: サンプルのクラスタリング

<まとめ> 2020 年施行分については、CB か APB というサンプルの種類と、TSST-1 刺激条件によって比較的明確にクラスタリングがなされている。2021 年施行分については、1 サンプルは明確に外れ値で以降除外する。

方法に記載の通りに RNA-seq のカウントデータ を取得した。その後の解析について以降記載する。まずはクラスタリング解析を 2020 年分、2021 年分それぞれで行った。カウント数が非常に少ない転写物を除去したのち、RPKM 補正（リード数及びリード長での補正）を行った。その後、ウォード法を用いて、階層化クラスタリングを行った。以降、臍帯血由来は CB、成人末梢血由来は APB と記載する。

まずは 2020 年施行の結果について図 31 に示す。

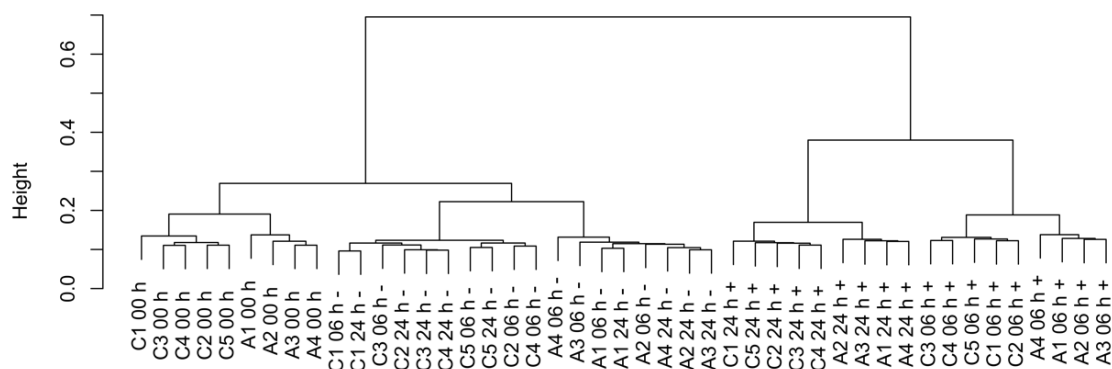


図 31：2020 年施行の RNA-seq 全サンプルのクラスタリング解析(ダイアグラム)

サンプル名については、一文字目の C が CB、A は APB であることを示す。次の数字がサンプルの通し番号である。続いての”数字 h”は刺激の時間を、最後の +/- は TSST-1 の刺激を加えたか、刺激を行わなかったかを示す。0 h については、刺激前なので最後の +/- はついていない。

刺激を行ったグループ（6 時間及び 24 時間）と刺激を行っていないグループ（刺激前及び非刺激）の 2 つに最初に分けられる。それ以下の階層をみると、刺激を行ったグループでは刺激の経過時間、続いてサンプルの由来（CB か APB）で明確に分けられる。一方、刺激を行っていないグループではまずは刺激前(0h)と非刺激（6h および 24h）に分けられ、その後はサンプルの由来（CB か APB）によって分けられる。

続いて、同じく 2020 年施行分のサンプルの主成分分析(PCA: principle component analysis)を行った（図 32）。同じく RPKM 補正を行った。

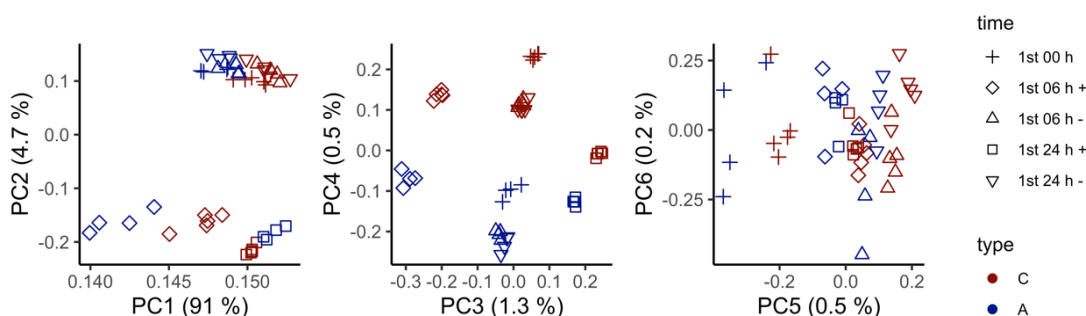


図 32：2020 年施行の RNA-seq 全サンプルの主成分分析

各軸はそれぞれ第 1 成分から第 6 成分であり、パーセンテージはそれぞれの成分の寄与率である。注釈で示すように、マークの色がサンプルの由来（赤が CB、青が APB）を示し、マークの形が TSST-1 刺激の有無及び経過時間を示している。

第 1 成分は全体の 91%と非常に大きな寄与率がある。概ね 24 時間 TSST-1 刺激を行ったサンプルとそれ以外(6 時間刺激、刺激前および非刺激)を分けており、次に大きな 4.1%の寄与率の第 2 成分は、刺激群（6 時間および 24 時間）とそれ以外（刺激前と非刺激）を分けている。第 3 成分（1.3%）により刺激時間、第 4 成分（0.5%）によりサンプルの由来（CB か APB）に分けられる。

続いて、2021 年施行分でも同様の解析を行った（図 33 と図 34）。

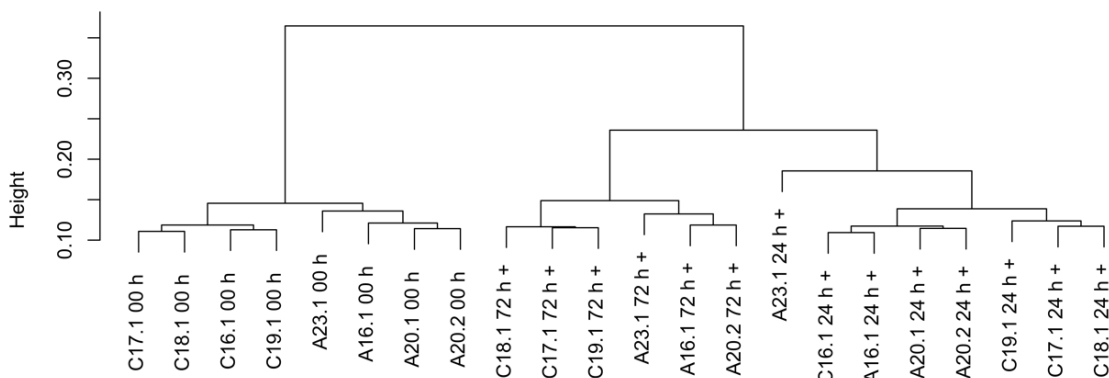


図 33：2021 年施行の RNA-seq 全サンプルのクラスタリング解析(ダイアグラム)
 サンプル名については、図 31 を参照。

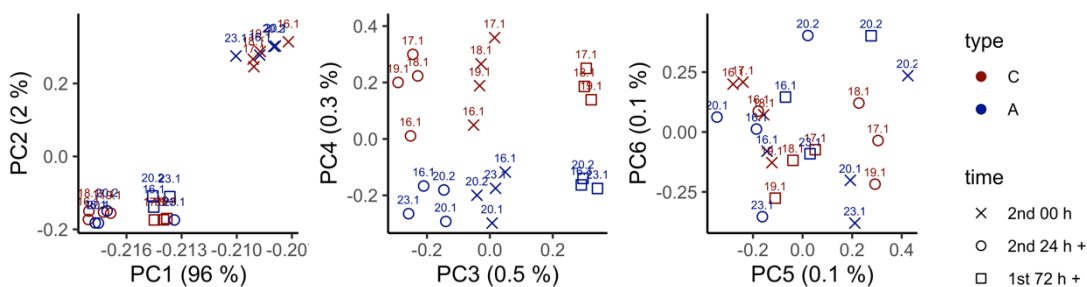


図 34：2021 年施行の RNA-seq 全サンプルの主成分分析
 軸、マークについては図 32 を参照

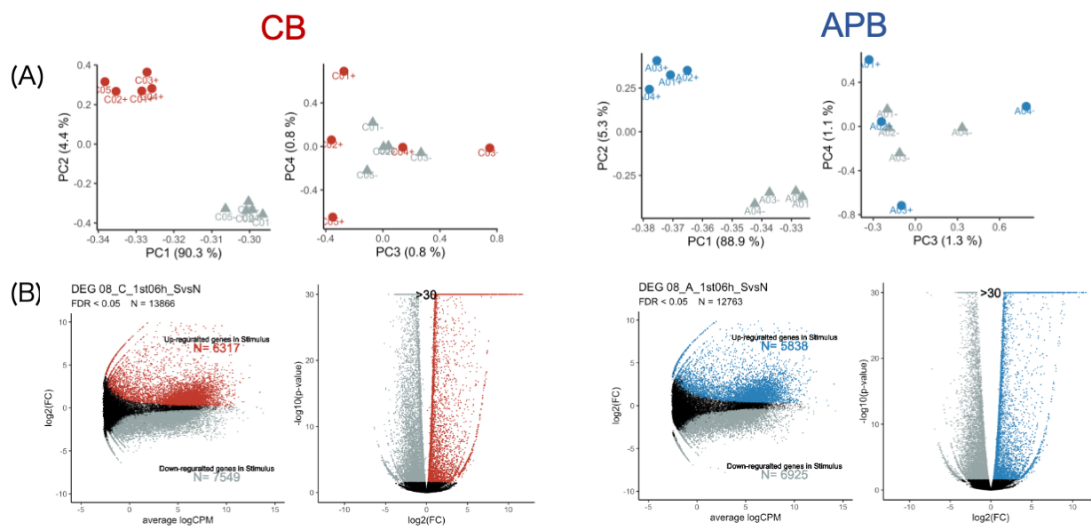
こちらにも概ね条件ごとに分けられたが、デンドログラムをみると、サンプル名 A23-1 24h+と C16-1 24h+については、条件と異なる分類となっている。C16-1 24h+は PCA で見ると他の CB の同条件サンプルに近いが、A23-1 24h+については大きく同条件サンプルと外れているので、刺激前の A23-1 00h とともに以降の解析では除外する。

結果 4-3. RNA-seq: 二群間比較とエンリッチメント解析

<まとめ> 一次刺激・二次刺激ともに刺激前後の遺伝子発現の大きな変化は臍帯血・成人末梢血で共通であり、刺激前後の発現変動遺伝子(DEG)は細胞増殖に関わるものが多かった。一方で、同タイミングでの臍帯血・成人末梢血の DEG は免疫応答に関わるものが多かった。

続いて一次刺激および二次刺激での変化を見るために、一次刺激での TSST-1 の刺激群と非刺激群の二群間比較 (6 時間および 24 時間)、および二次刺激での刺激前後の二群間比較を CB,APB それぞれで行った (図 35~37)。

発現変動遺伝子(DEG : differentially expressed genes)の定義は、FDR (false discovery ratio)が 0.05 未満とした。Folding change (FC)については、刺激群で高い場合に 1 より大きく、非刺激群で高い場合に 1 未満となるように設定した ($\log_2(\text{FC})$ では基準が 0 となる)。主成分分析 (A)、M-Aplot と、Volcano plot の結果 (B)、(C) GO エンリッチメント解析の結果を示す[41]。また、CB と APB の DEG のうち発現量が増加した遺伝子($\log_2(\text{FC})>0$) と、発現量が低下した遺伝子($\log_2(\text{FC})<0$)の重複を見るために、ベン図で評価 (D) を行った。なお、どの解析においても、GO エンリッチメント解析ではほとんどの GO term のカテゴリーは Biological process であった。



(C) GO enrichment analysis

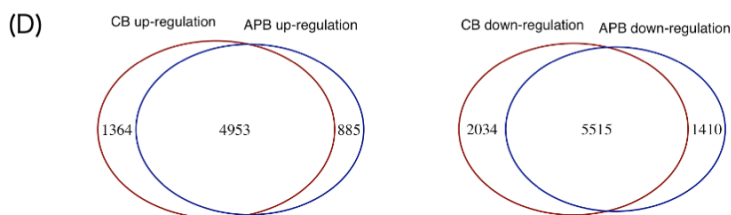
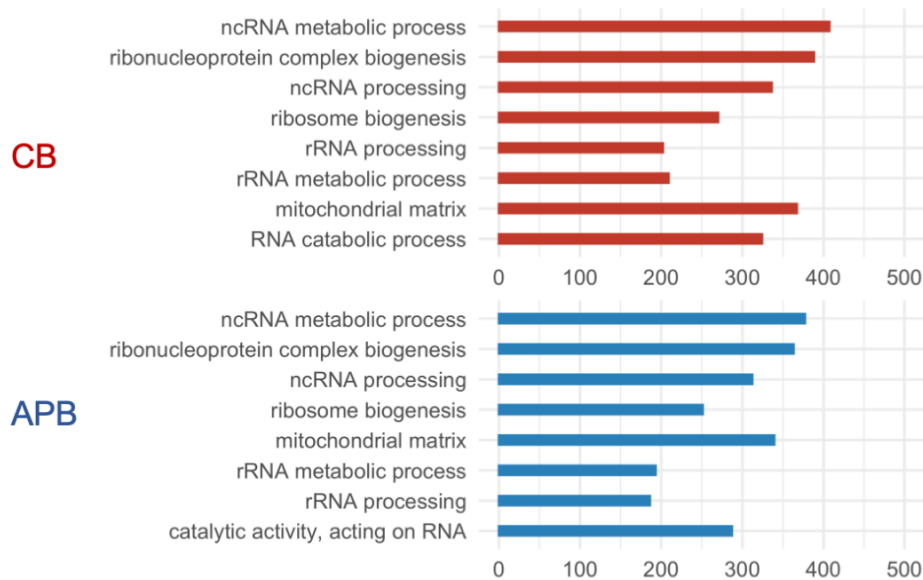


図 35 : CB/APB 各々での一次刺激 6 時間と非刺激 6 時間の二群間比較

- (A) 主成分分析 赤色もしくは青色●が刺激あり、灰色▲が非刺激サンプルを示す
- (B) MA plot 及び Volcano plot 赤(CB)もしくは青(APB)は刺激ありで上昇を認めた DEG、灰色は刺激ありで低下を認めた DEG を示す
- (C) GO エンリッチメント解析 adjusted p-value が少ない項目上位を示す。横軸はエンリッチされた遺伝子数である。
- (D) CB と APB の DEG の比較

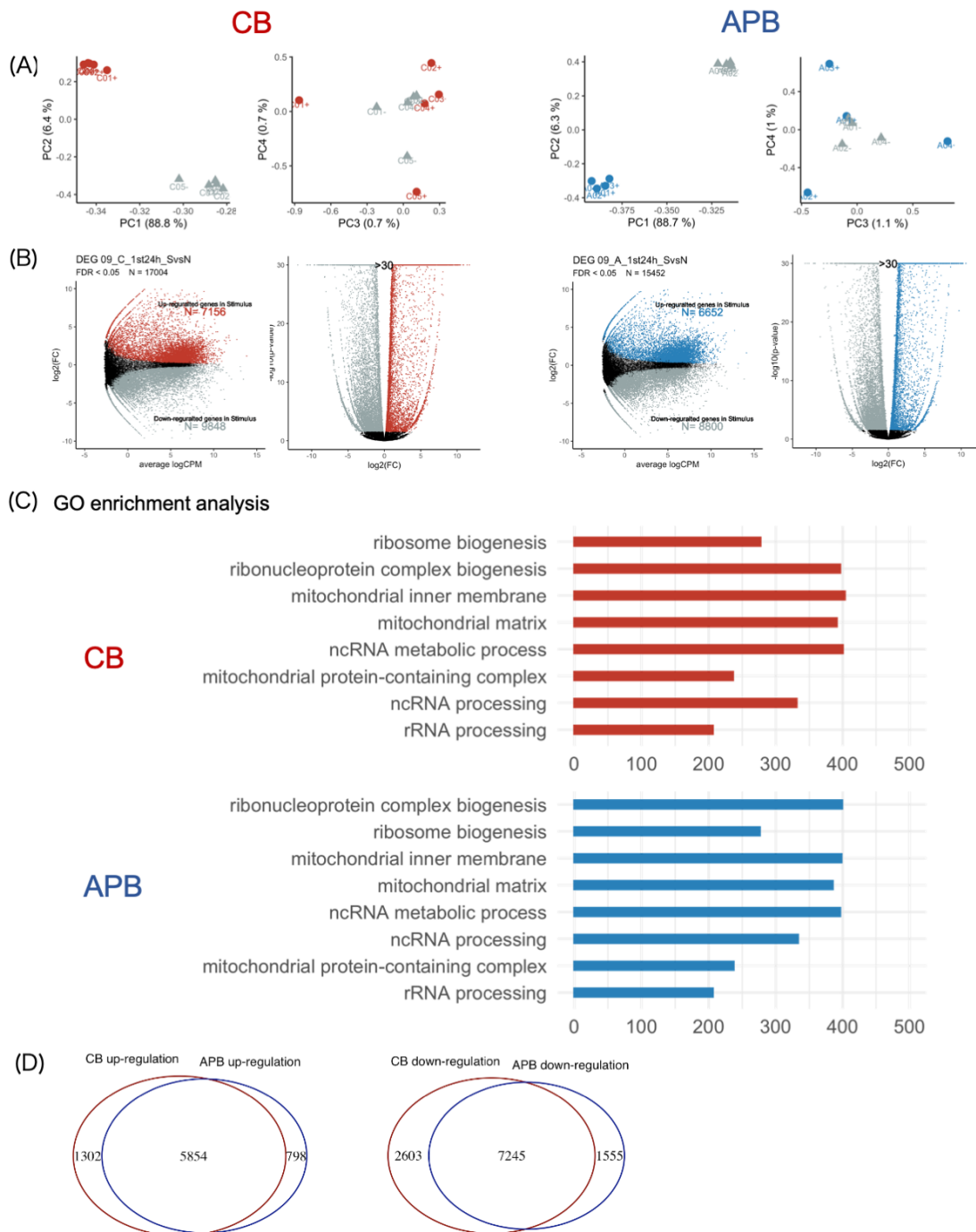


図 36 : CB/APB 各々での一次刺激 24 時間と非刺激 24 時間の二群間比較

- (A) 主成分分析 赤色もしくは青色●が刺激あり、灰色▲が非刺激サンプルを示す
- (B) MA plot 及び Volcano plot 赤(CB)もしくは青(APB)は刺激ありで上昇を認めた DEG、灰色は刺激ありで低下を認めた DEG を示す
- (C) GO エンリッチメント解析 adjusted p-value が少ない項目上位を示す。横軸はエンリッチされた遺伝子数である。
- (D) CB と APB の DEG の比較

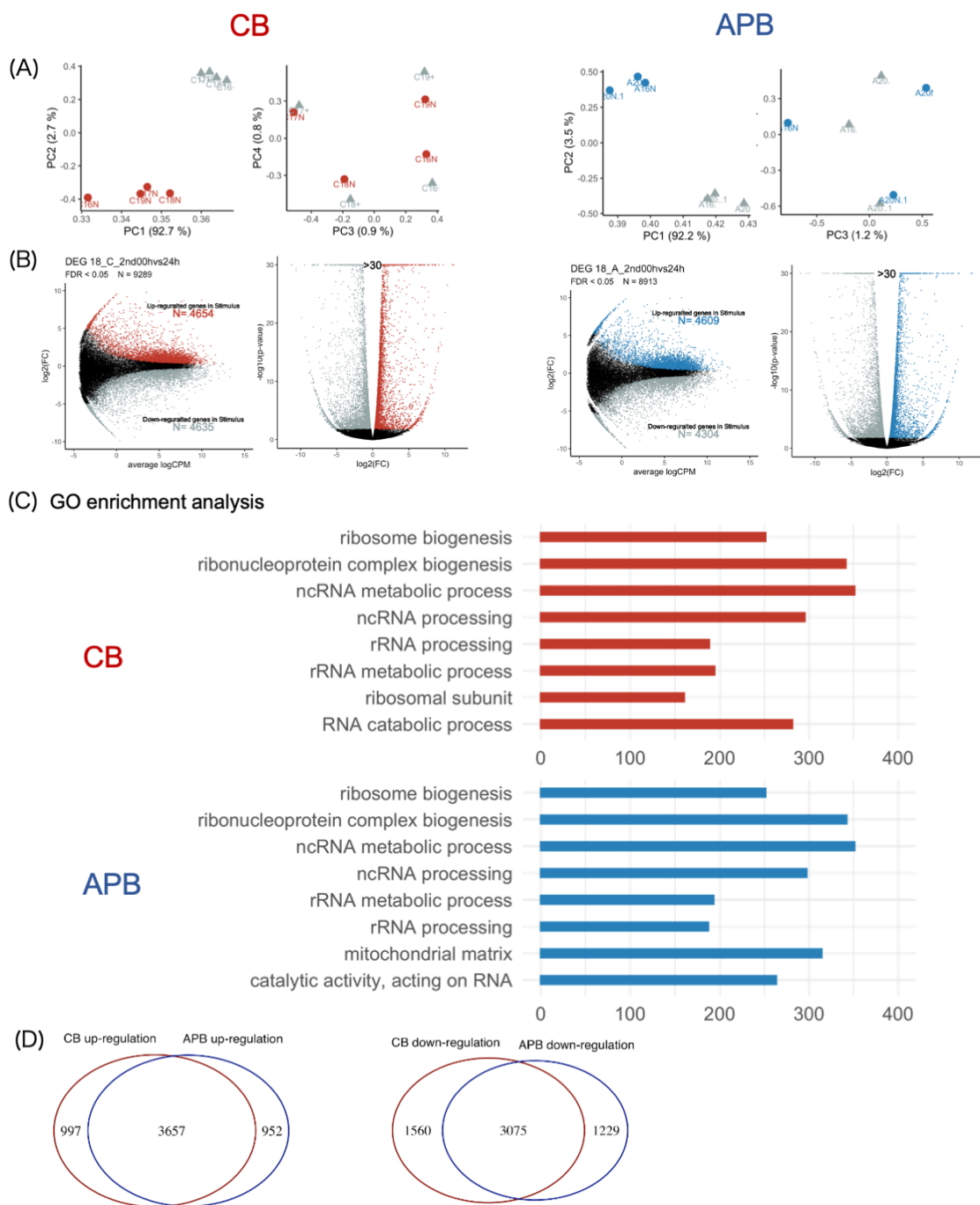


図 37 : CB/APB 各々での二次刺激 24 時間と刺激前の二群間比較

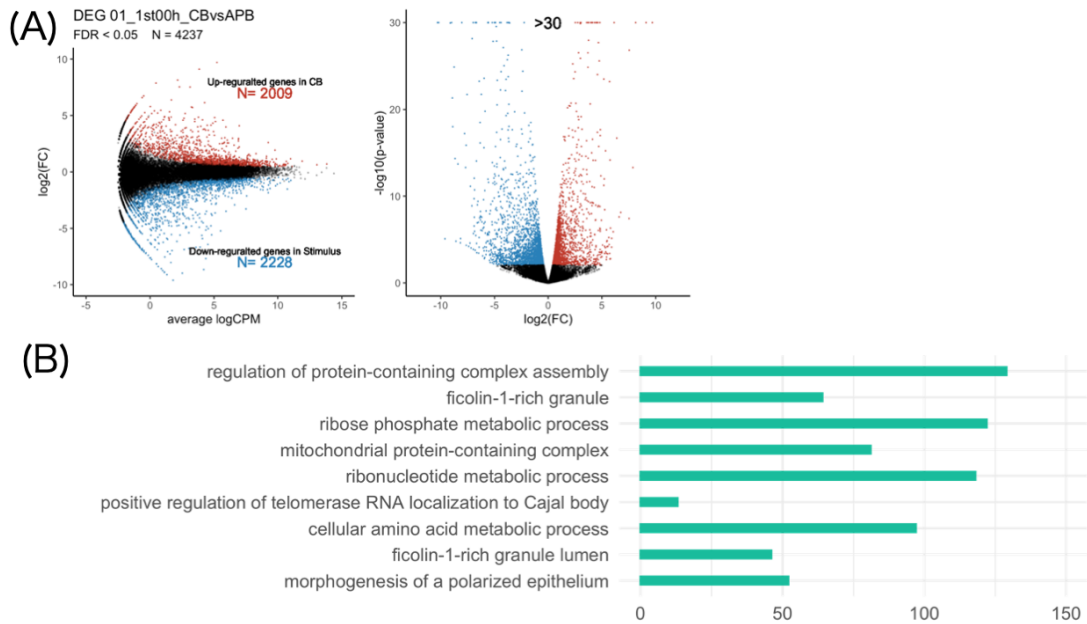
- (A) 主成分分析 赤色もしくは青色●が刺激あり、灰色▲が非刺激サンプルを示す
- (B) MA plot 及び Volcano plot 赤(CB)もしくは青(APB)は刺激ありで上昇を認めた DEG、灰色は刺激ありで低下を認めた DEG を示す
- (C) GO エンリッチメント解析 adjusted p-value が少ない項目上位を示す。横軸はエンリッチされた遺伝子数である。
- (D) CB と APB の DEG の比較

一次刺激 6 時間、一次刺激 24 時間、二次刺激 24 時間後時点において刺激群と非刺激群 (or 刺激前) の二群間比較で、CB と APB それぞれ DEG の評価を行った。いずれの場合においても以下の現象が見られている。

- ・主成分分析では大きな外れ値はなし
- ・非常に多くの発現変動遺伝子がある
- ・GO、KEGG、Reactome のいずれのエンリッチメント解析でも CB と APB の上位にランクされる項目は共通したものが多い。
- ・エンリッチメント解析で上位にランクされる項目は DNA、RNA、Cell Cycle など細胞増殖に関わるものが多く、免疫機能関連も一部見られている。
- ・発現が上昇の DEG、低下の DEG の大半は CB と APB で共通である。

CB と APB では、各々のポイントで TSST-1 や anti-CD3/CD28 beads に対する反応は似ている点が多いと結論づけられる。

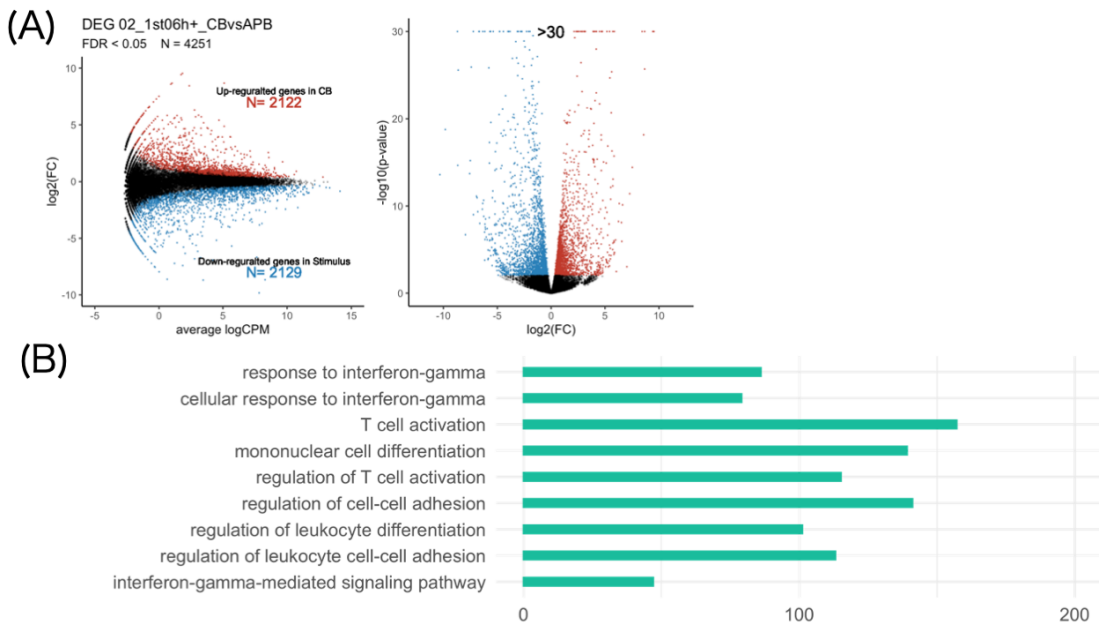
続いて、各タイミング (1st 0h, 1st 6h, 1st 24h, 1st 72h, 2nd 0h, 2nd 24h) での CB と APB の二群間比較を行った (図 38~43)。DEG の定義は 2020 年施行分では $FDR < 0.05$, 2021 年施行分では $FDR < 0.3$ とした。また、CB で発現が高い場合に $\log FC > 0$ となるように設定した。



いずれのenrichment analysisもadjusted p-valueが低いトップ項目を上から示しており、横軸は遺伝子のカウント数

図 38：一次刺激前 CB と APB の二群間比較 (2020 年施行分)

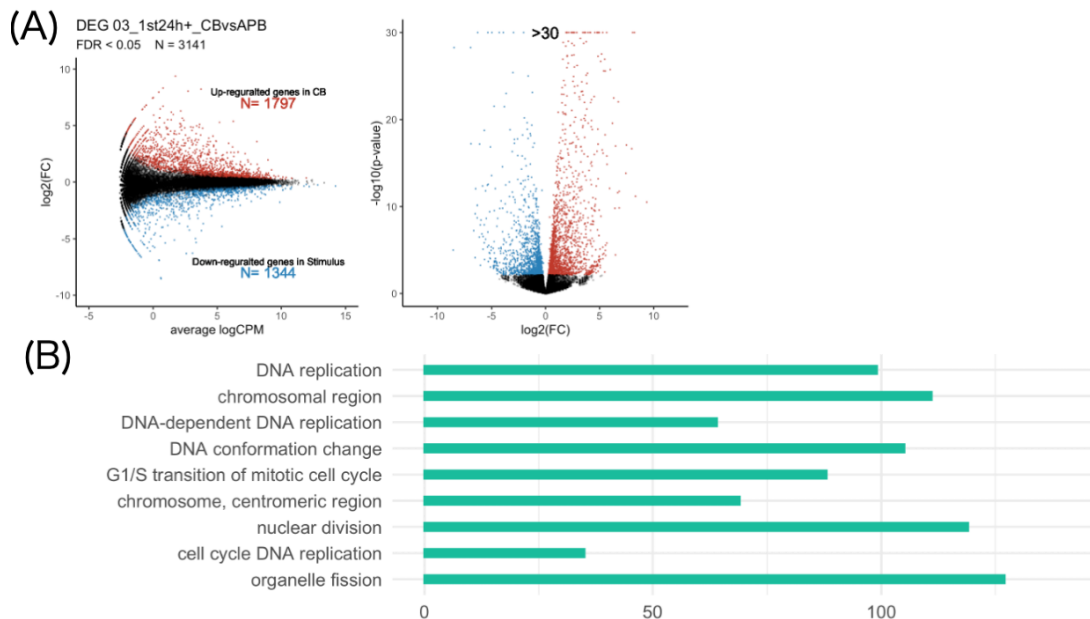
(A)DEG の MA plot, Volcano plot (B)GO エンリッチメント解析



いずれのenrichment analysisもadjusted p-valueが低いトップ項目を上から示しており、横軸は遺伝子のカウント数

図 39：一次刺激 6 時間 CB と APB の二群間比較 (2020 年施行分)

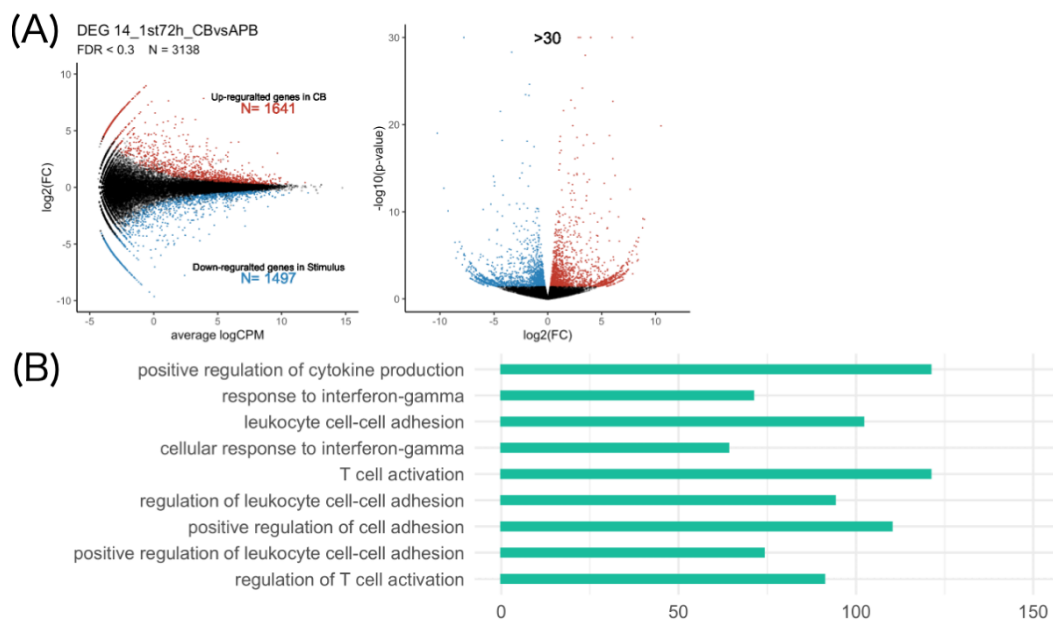
(A)DEG の MA plot, Volcano plot (B)GO エンリッチメント解析



いずれのenrichment analysisもadjusted p-valueが低いトップ項目を上から示しており、横軸は遺伝子のカウント数

図 40：一次刺激 2 4 時間 CB と APB の二群間比較 (2020 年施行分)

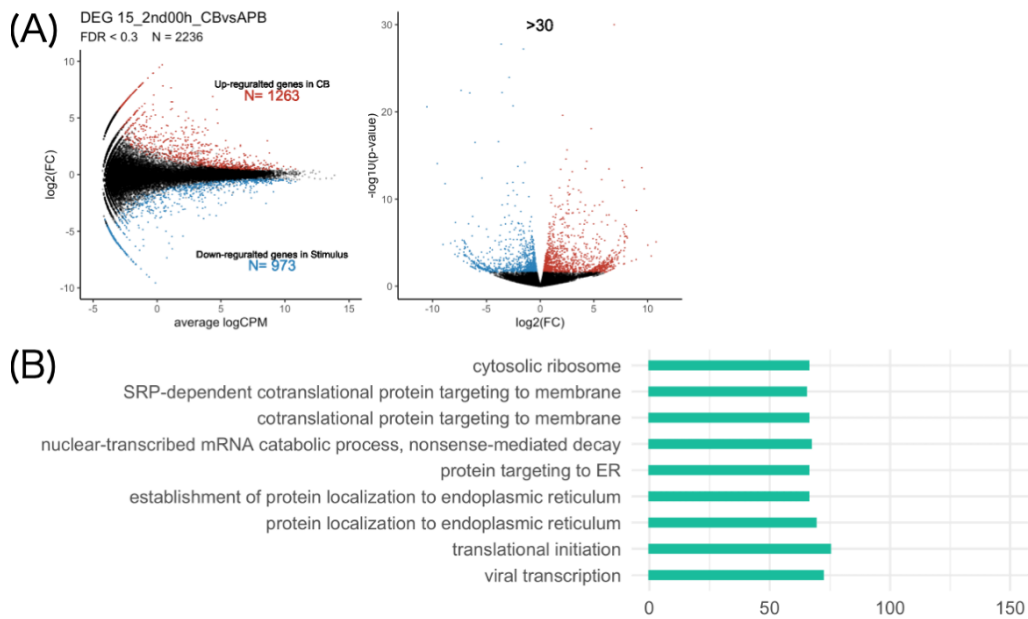
(A)DEG の MA plot, Volcano plot (B)GO エンリッチメント解析



いずれのenrichment analysisもadjusted p-valueが低いトップ項目を上から示しており、横軸は遺伝子のカウント数

図 41：一次刺激 7 2 時間 CB と APB の二群間比較 (2021 年施行分)

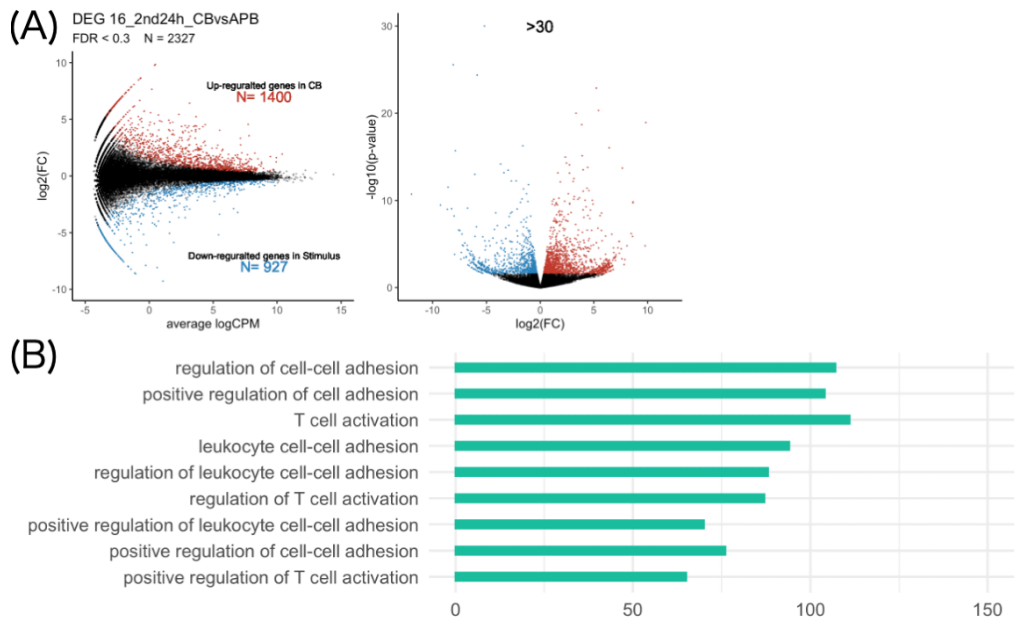
(A)DEG の MA plot, Volcano plot (B)GO エンリッチメント解析



いずれのenrichment analysisもadjusted p-valueが低いトップ項目を上から示しており、横軸は遺伝子のカウント数

図 42：二次刺激前 CB と APB の二群間比較 (2021 年施行分)

(A)DEG の MA plot, Volcano plot (B)GO エンリッチメント解析



いずれのenrichment analysisもadjusted p-valueが低いトップ項目を上から示しており、横軸は遺伝子のカウント数

図 43：二次刺激 2 4 時間 CB と APB の二群間比較 (2021 年施行分)

(A)DEG の MA plot, Volcano plot (B)GO エンリッチメント解析

エンリッチされた項目のトップを見てみると、刺激／非刺激の二群間比較に対して、同一条件での CB/APB の二群間比較は刺激後の場合(1st 6h, 1st 24h, 1st 72h, 2nd 24h)には T 細胞の活性化、分化、サイトカインの分泌やシグナリングなど免疫に関わる項目が非常に増えているのがわかる。一方で、刺激／非刺激の二群間比較で上位を占めていた細胞増殖に関わる項目は上位には来ていない。

免疫機能の違いは CB/APB の刺激に対する反応の差の主な要因であろうと予想される。これを踏まえて、免疫機能を重点に RNA-seq の解析を進めていく。

結果 4-4. RNA-seq: 個々の遺伝子の発現の評価

<まとめ> *IL2* は二次刺激後に臍帯血で発現が非常に低下している。*FOXP3*をはじめ Treg 関連の遺伝子は刺激後に臍帯血で発現亢進が見られる。*IKZF2* (*Helios*)は Naïve T 細胞の時点から刺激後まで通して臍帯血で高発現である。

図 38 から図 43 で示した、各タイミング(1st 00h, 1st 06h, 1st 24h, 1st 72h, 2nd 00h, 2nd 24h)での CB と APB の二群間比較の MA-plot の図上に主として Treg やその他の CD4+ T 細胞が産生する主なサイトカイン (図 44)、転写因子と細胞表面抗原 (図 45) などの遺伝子の結果を表示する。

サイトカインの発現変動を評価した図 44 と、上清サイトカインの結果は概ね一致している。特に、一次刺激中は CB と APB で大きな差がなかった IL-2 が二次刺激 24 時間後には CB での発現が大きく低下しており、二次刺激後の上清 IL-2 の低値は細胞による消費のみならず、産生低下が大きな原因であること

が分かる。図 45 では転写因子などを評価したが、*FOXP3*、*IL2RA* (*CD25*)、*STAT5A*、*IKZF2* (*Helios*)、*IKZF4* (*Eos*)など制御性 T 細胞に発現が多い転写因子などは CB に多く発現しており、特に一次刺激前後の評価はフローサイトメトリーの結果と一致する点である。特に、*IKZF2*は一次刺激前

(Naïve T 細胞) の段階から CB では高発現であり、一次・二次刺激以降も引き続き高いことが分かる。一方で、Treg のマーカーの一つであり、フローサイ

トメトリーの評価では有意差は出なかったものの刺激後に APB で発現が高かった *CTLA4* は RNA-seq でも APB に高発現であった。

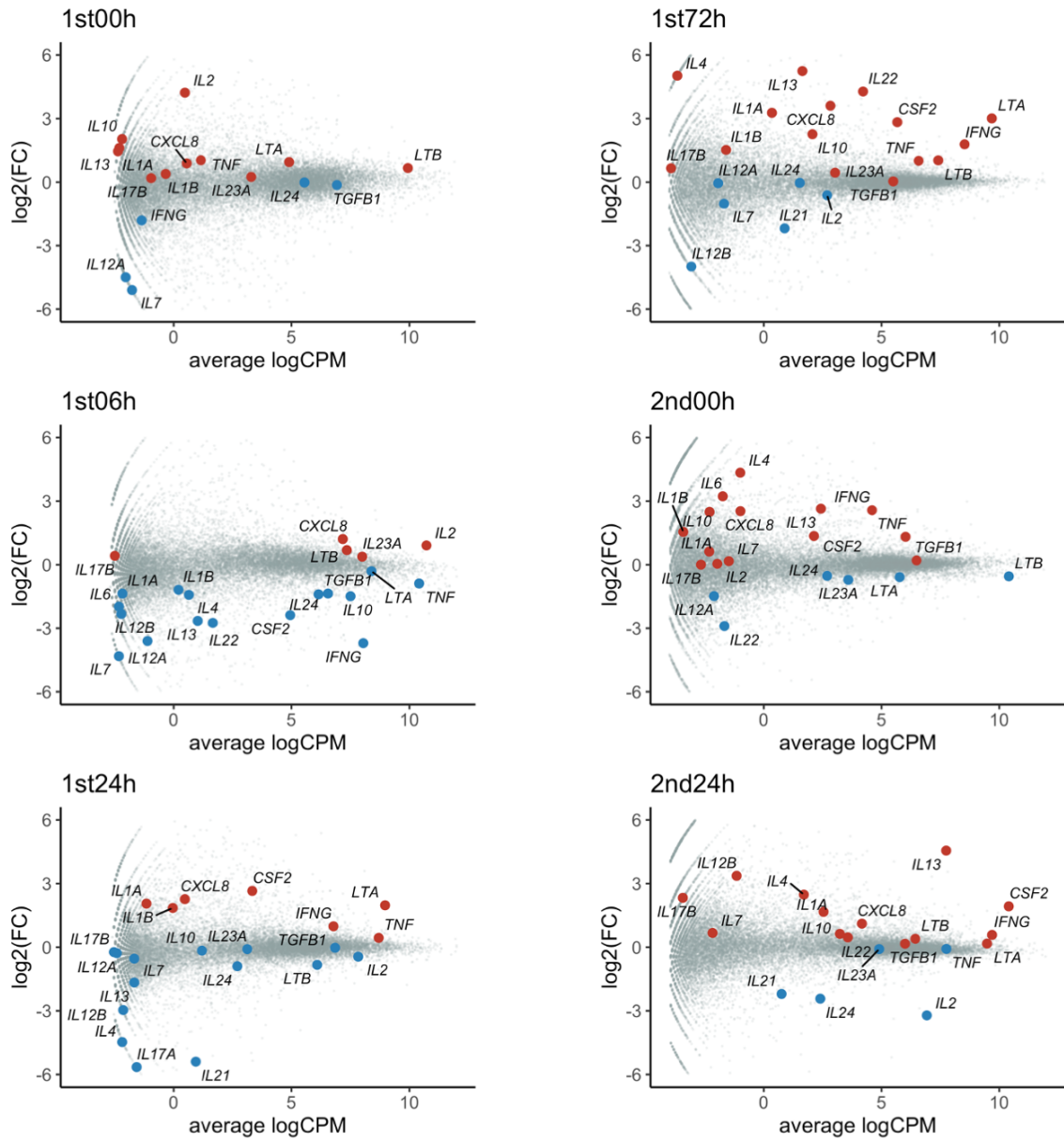


図 44：サイトカイン関連の遺伝子プロットした各時点での MA plot

$\log_2(\text{FC}) > 0$ の場合(臍帯血で高発現)は赤いプロットで、 $\log_2(\text{FC}) < 0$ の場合は青いプロットで示す。遺伝子名とタンパク質名が大きく異なる例については以下に記す。

CXCL8: IL-8、*TNF*: TNF α 、*LTA*: TNF β 、*LTB*: TNF γ 、*CSF2*: GM-CSF

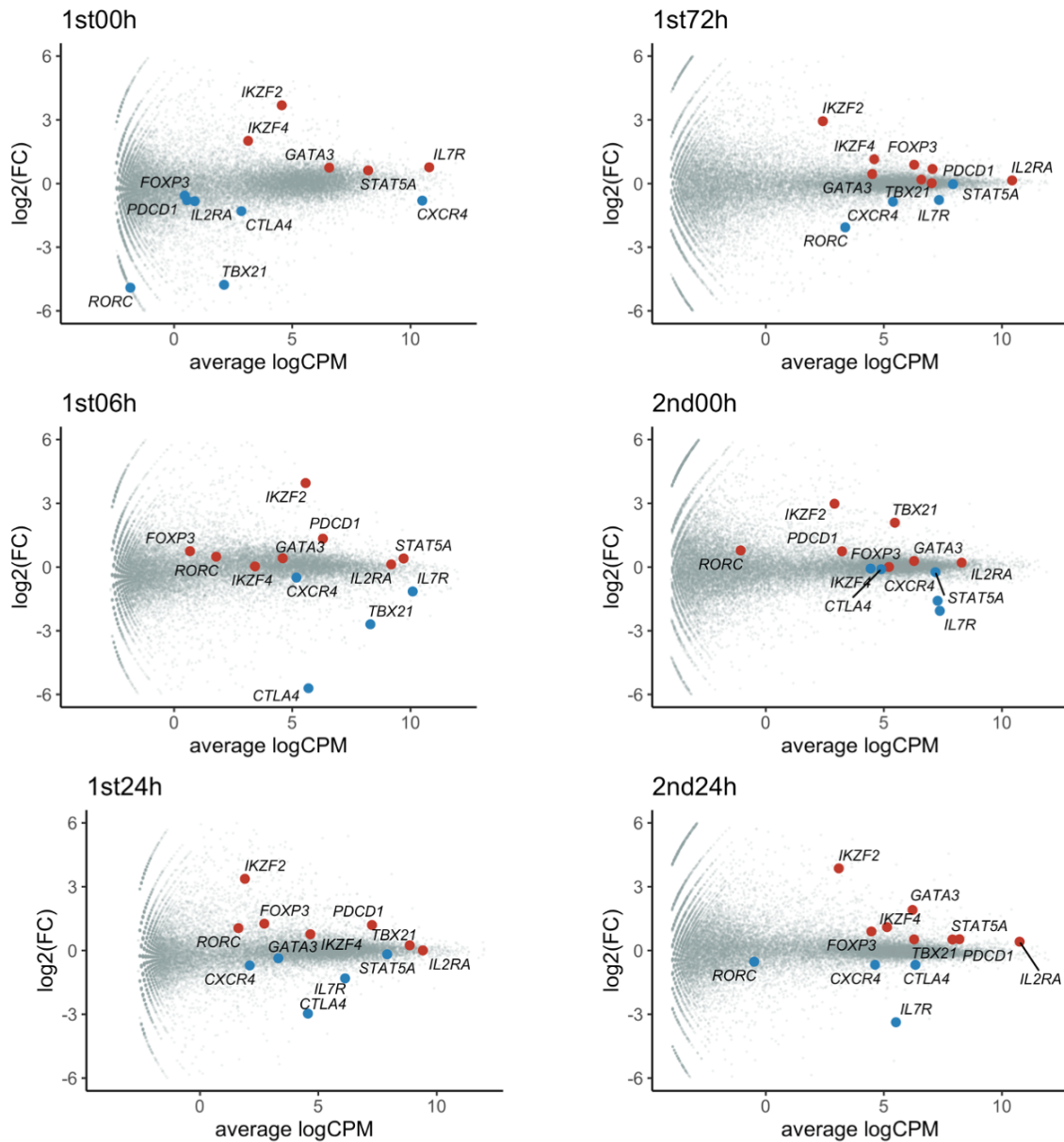


図 45 : T 細胞関連の遺伝子プロットした各時点での MA plot

$\log_2(\text{FC}) > 0$ の場合(臍帯血で高発現)は赤いプロットで、 $\log_2(\text{FC}) < 0$ の場合は青いプロットで示す。遺伝子名とタンパク質名が大きく異なる例については以下に記す。

IKZF2: Helios、*IKZF4*: Eos、*IL7R*: CD127、*IL2RA*: CD25、*PDCD1*: PD1、*STAT5A*: STAT5

結果 4-5. RNA-seq: GSEA (Gene set enrichment analysis)

<まとめ> GSEA を行ったところ、在胎 20 週の胎児と成人の T 細胞を比較した一連の遺伝子セットに対してエンリッチが見られた。CB は胎児の遺伝子発現と共通したパターンを認めたほか、細胞刺激によって Treg への分化が疑われる結果であった。

前述のエンリッチメント解析により、各ポイントにおいての CB と APB の差異は免疫関連の遺伝子によるものが大きいと予想されたので、免疫関連の gene set を用いて GSEA (gene set enrichment analysis)[42, 43]を行うこととした。

使用する gene set のリストとして、Molecular Signature Database v7.4 (MSigDB) [44, 45]のカテゴリ C7: immunologic signature gene sets[46]を選択した。これは、公開されているクオリティの高い免疫関連の RNA-seq やマイクロアレイの研究データからキュレーターが重要な遺伝子を手作業でピックアップしてリストを作成したものである。2021 年 11 月現在、合計 5219 の gene set が登録されている。

MSigDB カテゴリ C7 の全 gene set を対象として GSEA ソフトウェアを用いて、解析を行い、Normalized ES (NES), FDR q-value など上位にランク付けされたなかで今回の実験と関連のありそうな項目を探した。胎児と成人末梢血の T 細胞の比較をしている研究報告[17]から得られた 8 つの gene set が、本研究の複

数の時点でエンリッチが見られた。この研究報告はいずれも 18-22 週のヒト胎児と成人の Naïve T 細胞 (CD3+CD4+CD45RA+CCR7+CD27+) 及び制御性 T 細胞 (CD3+CD4+CD25bright) を比較した、マイクロアレイの結果をもとにしたものである。

一次刺激前から二次刺激 24 時間後までの 6 時点での、CB と APB の二群間比較について TMM 正規化したカウントデータを使用し、NES は CB で優位なら正に、APB で優位なら負になるように設定した。NES と q-value の結果について図 46 に示す。一次刺激前(1st 00h)、一次刺激後 24 時間(1st 24h)、二次刺激前(2nd 00h)、二次刺激後 24 時間(2nd 24h)については、個別に図 47 と図 48 に Enrichment plot を示す。

胎児と成人の TCONV (Naïve T 細胞)を比較した下 2 行の遺伝子セット FETAL_VS_ADULT_TCONV_(UP or DN)について、どの時点においても UP の gene set が CB でエンリッチし、DN の gene set が APB でエンリッチしていることが分かる。一次刺激前 (1st 00h) は、Naïve T 細胞 (gene set での TCONV) が対象であり、APB と CB の TCONV を比較したものである。在胎 20 週の胎児と正期産の新生児の間で Naïve T 細胞は、成人末梢血と比較すると非常に似通った遺伝子発現パターンを有しており、そのパターンは刺激後も続いていることを示している。

一方、胎児と成人それぞれで、制御性 T 細胞 (TREG) と Naïve T 細胞 (TCONV) を比較した上段の 4 行の遺伝子セットのうち、1 行目と 2 行目 (TREG_VS_TCONV_FETUS_UP 及び TREG_VS_TCONV_ADULT_UP) を見ると、刺激前の段階ではエンリッチしていない状況から、一次刺激 24 時間、72 時間、二次刺激 24 時間では、CB でエンリッチしている様子が見られる (ADULT の二次刺激 24 時間後は NOM.pvalue = 0.059 と有意水準を下回る)。胎児・成人血どちらの基準においても、Treg に高発現の遺伝子が CB により多く発現していることを反映しているものと思われる。

以上、まとめると

- ① CB と APB の Naïve T 細胞は遺伝子発現パターンが異なり、CB は在胎 20 週の胎児 Naïve T 細胞の特徴を有している。
- ② CB は APB よりも細胞刺激によって Treg に分化する傾向が疑われる。CB の Treg は胎児により近い性質である。

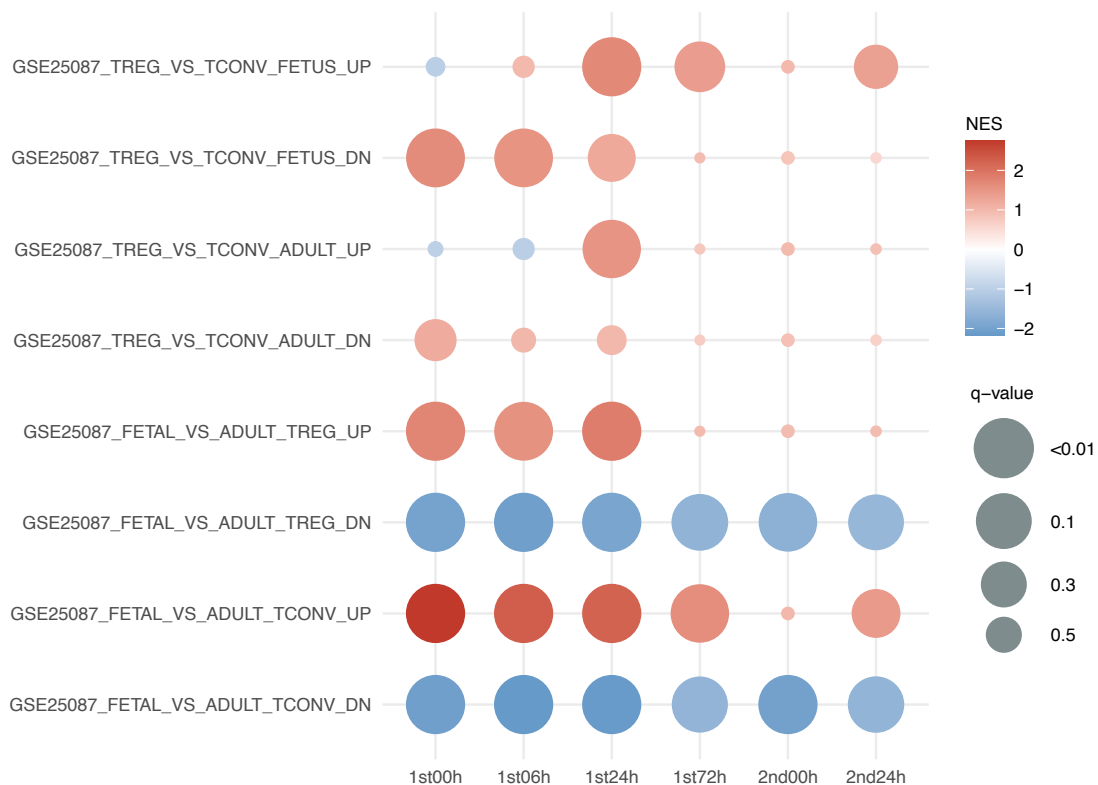


図 46：文献[17]の gene list を対象にした GSEA の結果

各 gene list の名前はそのままその gene list を構成する遺伝子の説明である。

GSE25087_(A)_(B)_(C)_(UP or DN)は「(C)での比較において、(A)が(B)よりも発現が(UP もしくは DOWN)している遺伝子のリストである」ことを示す。

例えば、GSE25087_TREG_VS_TCONV_FETUS_UP は、「胎児の比較において、制御性 T 細胞 (TREG)が古典的 T 細胞(TCONV)より発現が上昇している遺伝子のリスト」である。

NES の評価は各プロットの色で示す。赤系の色 (NES 0 以上) は CB で gene list 中の遺伝子が強く発現している傾向が高いこと、青系の色 (NES 0 以下) では APB で gene list 中の遺伝子が強く発現している傾向が高いことを示す。右の注釈のように色はスペクトラムになっており、NES の値を示す。q-value は各プロットの大きさと内部の色で示す。

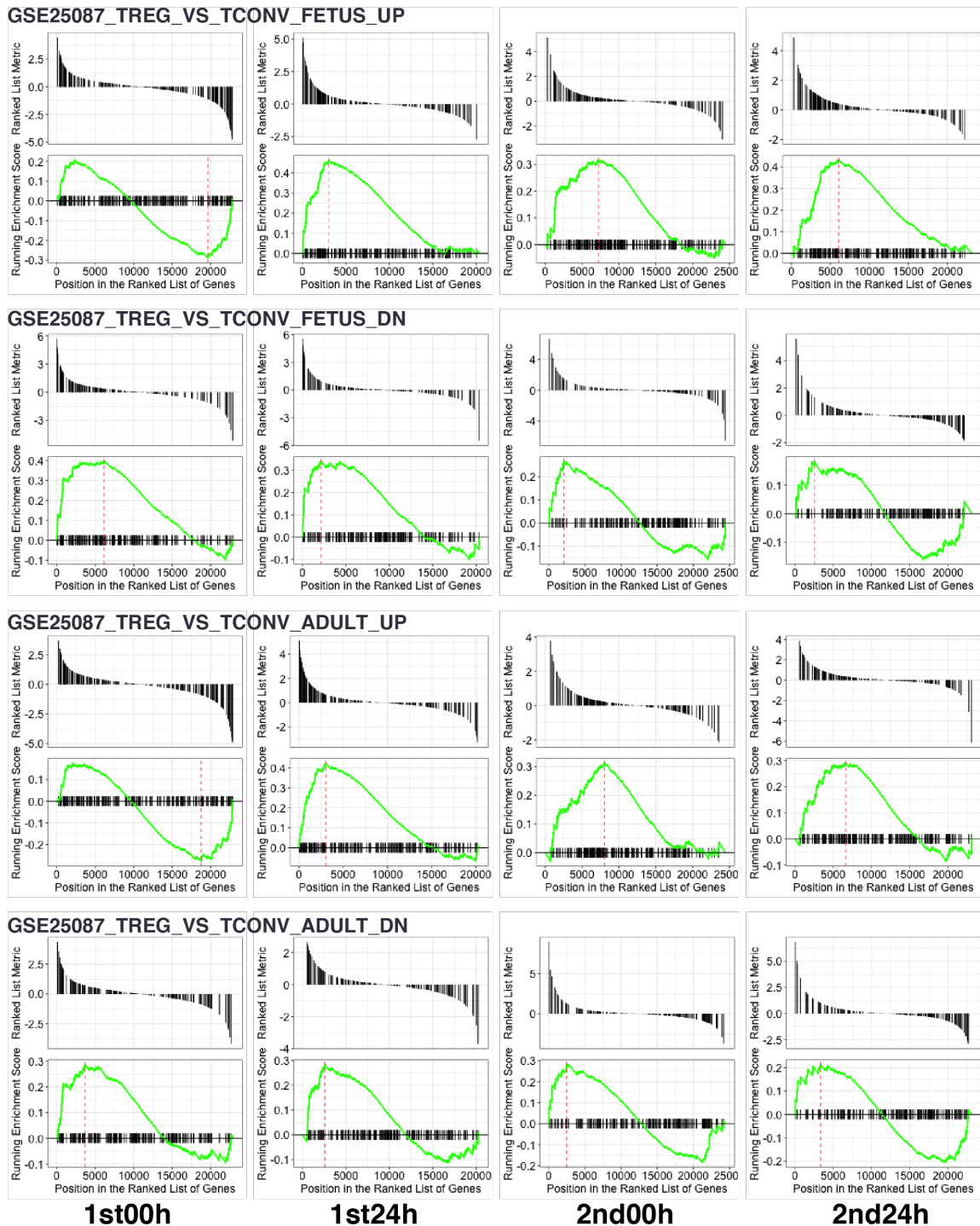


図 47：一次刺激前(1st 00h)、一次刺激後 24 時間(1st 24h)、二次刺激前(2nd 00h)、二次刺激後 24 時間(2nd 24h)でのそれぞれの gene set のエンリッチメントスコア波形

初めは「胎児で TREG が TCONV より発現が上昇する gene list」は CB で少なく、「胎児で TREG が TCONV より発現が低下する gene list」は CB で多かったが、実験の時間経過により前者が増加、後者が減少していき、最終的に逆転する。同様の傾向は「成人血で TREG が TCONV より発現が上昇（あるいは低下）する gene list」でも、その傾向はやや弱いが見られる。

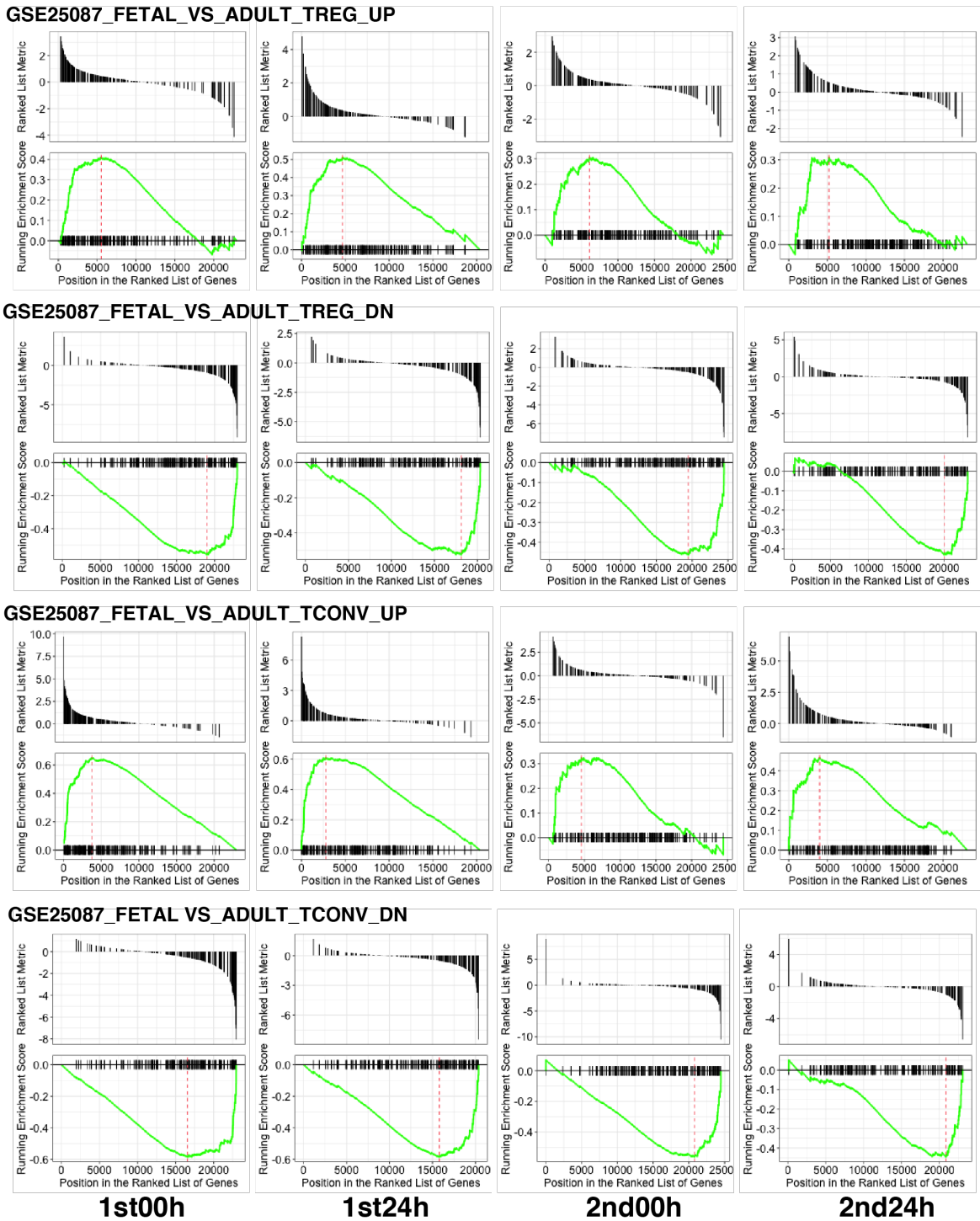


図 48：一次刺激前(1st 00h)、一次刺激後 24 時間(1st 24h)、二次刺激前(2nd 00h)、二次刺激後 24 時間(2nd 24h)でのそれぞれの gene set のエンリッチメントスコア波形
 NOM.pvalue が有意水準 0.05 未満の例については赤枠 (NES>0) もしくは青枠 (NES<0) で示す。
 「胎児 TREG が成人血 TREG より発現が上昇する遺伝子リスト」の多くは当実験においても CB で増加しており、「胎児 TREG が成人血 TREG より発現が低下する遺伝子リスト」の多くは CB

で減少している。同様にすべての時点を通して、「胎児 TCONV が成人血 TCONV より発現が上昇する遺伝子リスト」の多くは当実験においても CB で増加しており、「胎児 TCONV が成人血 TCONV より発現が低下する遺伝子リスト」の多くは CB で減少している。

V. 考察

今回の実験では、スーパー抗原 TSST-1 を用いて TCR への刺激を受けた臍帯血の CD4+T 細胞は成人末梢血よりも、より制御性 T 細胞(Treg)に分化しやすい可能性があることが推察された。特に、単核球から Effector T 細胞や Memory T 細胞、CD8+ T 細胞を除去した Naïve T 細胞のみとしても Treg に分化する傾向が確認され、臍帯血の Naïve T 細胞自体が Treg へ分化しやすい性質を持つことが推察された。また、RNA-seq の GSEA の結果から、臍帯血の Naïve T 細胞が胎児の Naïve T 細胞と共通した遺伝子発現パターンを持つこと、TSST-1 刺激を受けたのちは特に胎児の Treg と似た遺伝子発現パターンが見られることも分かった。

スーパー抗原の一種である TSST-1 は新生児医療の領域では NTED (新生児 TSS 様発疹症) の原因として知られている[3-5]。同じく TSST-1 によって引き起こされる TSS(Toxic shock syndrome)は、発疹などの皮膚症状に留まらずサイトカインストームによる循環不全や多臓器障害などが引き起こされる[47]。一方で、新生児の NTED は生後数日で発症し特徴的な発疹と軽微な活気低下、血液検査上は CRP の中等度上昇と血小板数の低下が見られる程度で基本的に自然寛解する疾患である[2, 3]。NTED の報告は TSST-1 産生の MRSA(メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)が流行した

1990年代から2000年代初頭の日本で多かったが、日本人に特有の疾患というわけではなく欧米でも報告例がある[48, 49]。基本的に自然寛解し症状も非特異的なものが多いことから看過されている症例も多いかもしれない。

このように TSST-1 は臨床上、新生児と成人では異なる免疫応答を引き起こすこともあり、今回の研究では臍帯血 T 細胞の免疫寛容の機構を探索する *in vitro* の実験の reagent として使用した。NTED が軽症であることのメカニズムを探った研究[3]では、無症状の MRSA キャリアの新生児（おそらく TSST-1 産生の MRSA）の血液から分離した単核球に対して *in vitro* で TSST-1 刺激をしたところ、IL-2 の産生が低下していた。おそらく単核球中の TCR Vbeta2+ CD4+ T 細胞において今回の我々の実験や先行研究[36]と同様の機構が働いたと思われる。スーパー抗原は T 細胞を *in vitro* で活性化させる reagent として使われてきたが、刺激後に T 細胞表面より細胞内部へと TCR が移行するため、既報のスーパー抗原を用いた実験では、刺激後のフローサイトメトリー評価は行われなかったことが多く、行われる場合は単核球を刺激後に細胞膜固定・透過処理を行った後でフローサイトメトリー解析のための染色を行う必要があった[40]。今回の実験の独自性の一つは、TSST-1 刺激後の TCR Vbeta2+ CD4+ T 細胞のソーティングでの回収方法である。結果の予備実験の項で示したように TSST-1 の刺激を受けたのちに TCR と CD3 が複合体を形成して細胞内へ移行すること[38, 39]を利用

し、生細胞を高純度で回収した。このことによりRNA-seqや二次刺激など以降の実験を行うことが可能となった。先行研究では、二次刺激には人工的な抗原提示細胞(APC)の存在下でTSST-1刺激を用いた。本研究では抗CD3/CD28ビーズを用いて、先行研究と同様の現象、すなわち二次刺激で臍帯血のIL-2産生低下が起こることが再現された。

先行研究と同様の方法を用いなかった理由は、実務的な問題（APCの処理に対する放射線照射など機器の問題など）で実施が難しかったことのほか、TSST-1による再刺激は一般的な手法でないこと、同種異系反応のリスクがあることなどが挙げられる。抗CD3/CD28ビーズは近年T細胞のin vitroでの刺激に頓用される手法である。抗原提示のいわば起点のTCRに直接的な刺激を加えるという、体内での反応に近い先行研究の手法の方がより生理的な反応と言える。しかし逆に言えば、臍帯血と成人末梢血Naive T細胞の差異はTCRではなく、それ以降のメカニズムであることを今回の実験手法により示したとも言える。

今回の研究の主たる目的は、ヒトの臍帯血と成人末梢血の免疫寛容機能を比較することである。しかし、例えばマウスなどの実験動物の実験では、in vitroで生成した細胞が制御性 T 細胞であるかを評価するには、同系のマウスに移入して反応を評価するなどの方法が考えられるが、ヒトの検体を用いた実験においては当然ながらそのような手法をとることはできない。また、変化した細胞の中

には異なる複数の種類の細胞が混在している可能性もあるが、あくまで均一の性状や機能を持った一様な細胞集団とみなして評価を行わざるを得ない部分もある。以上のことから、変化した細胞が Treg であると断言するのは困難で、あくまでも複数の結果から総合的に判断せざるを得ない。

結果としては、フローサイトメトリーにて細胞内染色評価で一次刺激後に成人末梢血よりも臍帯血で FOXP3 の発現が上昇することを示した。FOXP3 は制御性 T 細胞のマスター転写因子であり [20]、TSST-1 の一次刺激後に Treg 様の変化を起こしたことを反映しているものと考えられる。加えて、RNA-seq の GSEA からも一次刺激 24 時間以降は CB が APB よりも Treg に近い遺伝子パターンに変化している（胎児・成人どちらの基準においても）ことが示された。フローサイトメトリーの結果では、TCR V β 2+ CD4+ T 細胞の中では、Treg の機能分子である CTLA-4+ の細胞表面発現の割合が APB の方が高い傾向があり（有意差は出ず）、RNA-seq でも一次刺激後においては *CTLA4* の成人優位の発現であった。しかし、フローサイトメトリーにおいて FOXP3 と CTLA4 の共発現の割合はほぼ差が見られず、APB では CTLA4+ の細胞は FOXP3- の細胞が多い結果であった。

二次刺激での変化もフローサイトメトリーで評価する予定で予備実験を数回行ったが、rIL-2 による拡大培養を行なって以降は、細胞膜固定・透過処理に対

する細胞のダメージが非常に強く評価困難であったため、RNA-seq での評価に変えた。二次刺激前は臍帯血・成人末梢血の間に差異なく、二次刺激 24 時間後では臍帯血優位の *FOXP3* の遺伝子発現が見られた。同様に、rIL-2 拡大培養後に CellTrace Violet 染色を行ったところ、その後の二次刺激では明らかに細胞死が増加した。濃度や反応時間などの条件を工夫するも安定した結果が見られず、二次刺激の細胞増加をフローサイトメトリーで行うことを断念した経緯がある。二次刺激後の細胞増殖については位相差顕微鏡を用いて増殖を比較したのみであるが、臍帯血よりも成人末梢血由来の細胞の増殖傾向が強い場合が多かった。

免疫寛容の評価として培養上清中のサイトカインの評価も行った。抑制性サイトカインである IL-10 や TGF- β の変動を予想していたが、それらのサイトカインが臍帯血で増加するような現象は今回の実験系では見られず、一番変動が大きかったのは、先行研究[36]と同様に IL-2 であった。

IL-2 は主として活性化した CD4+T 細胞から産生されるサイトカインであり、当初 T 細胞増殖因子(T cell growth factor)として発見され[50]、in vitro で T 細胞を増殖・活性化させるはたらきを見出された。IL-2 はこのような作用から免疫応答を刺激させるが、一方で制御性 T 細胞の維持・増殖のためにも IL-2 が必要である [51-54]。体内でも高濃度の IL-2 は T 細胞を活性化させて免疫刺激に働くのに対して、低濃度の IL-2 は Treg の維持・拡大に関与して免疫を抑制す

る働きがある[55]。近年では、自己免疫疾患に対する低用量 IL-2 療法(Low-dose IL-2 therapy)として臨床上も応用されている[56-59]。

今回の我々の実験では、二次刺激後の IL-2 は CB で 2000-4000 pg/ml と非活性のネガティブコントロールと大差ないレベルであったのに対して APB では 20000-50000 pg/ml 程度と 10 倍に近い濃度の差がみられた。今回の実験においては、RNA-seq でも CB は APB に比べて二次刺激後に *IL2* の発現が非常に低下していた。Treg による消費亢進もあったかもしれないが、上清中の IL-2 の低下の最大の原因は、CB では Treg 様の分化が多かったことに伴う産生低下と考えられる (Treg は IL-2 をほとんど産生しない)。しかし、IL-2 は前述のように低濃度では免疫寛容に、高濃度では免疫刺激に作用するため、IL-2 の産生が CB で抑えられているというのは、単に CB が Treg 様の変化を起こしたためという結果のみならず、免疫寛容に関わる下流の応答に関わっている可能性も考えられる。

本研究では RNA-seq の GSEA により、既報の胎児の Naïve T 細胞、Treg との関連も示された[17]。

ヒト胎児の造血は胎生 7 週頃より卵黄嚢で始まり、その後胎生 10 週ころに肝臓に移り、その後胎生 16 週 (在胎 18 週) ころからは骨髄での造血も開始されるが、肝臓での造血も出生前後まで続く[60, 61]。胸腺での成熟期間も考慮する

と、本研究の GSEA で取り上げた遺伝子セット [17] の元になった、胎児（在胎 18～22 週）の T 細胞の多くは肝臓造血由来と考えられる。

ヒトの胎児・新生児の T 細胞の成熟について single cell RNA-seq (scRNA-seq) などの手法を用いて調べた研究により [62]、臍帯血の Naïve T 細胞は胎児の T 細胞（肝臓造血）と成人の T 細胞（骨髄造血）が混在したものではなく、個々の細胞が胎児と成人の中間の遺伝子発現をもつ成熟途上の比較的一様な細胞集団であることが判明した。我々の研究は単一細胞ではなくバルクの RNA-seq であり、個々の細胞の遺伝子発現について評価を行うことはできなかったが、Naïve T 細胞（一次刺激前）の CB と APB の二群間比較の GSEA の結果から、CB が APB より胎児 T 細胞に近い遺伝子発現パターンを持っていることは、既報と照らし合わせると妥当な結果であったと考えられる。

また、胎児は Naïve T 細胞の段階で Treg 関連の遺伝子の発現が多く [17]、同種抗原などの細胞刺激で Treg への誘導傾向があることはさまざまな実験で示されている [10]。本研究で用いた reagent はスーパー抗原の一種の TSST-1 で、TCR を介して T 細胞の活性化を引き起こしており、言わば新生児の感染症モデルと言える。新生児が感染症罹患時に免疫応答が不十分であったり、NTED などサイトカイン関連疾患でサイトカインストームが抑えられたりすることと、母体と共存するための胎児期の生理的な免疫寛容は、同様の遺伝子発現変化が

あることを今回の結果は示していると思われる。

胎児期の免疫寛容について重要な役割を担っていると指摘されているのが、Helios (遺伝子名 *IKZF2*)である[63]。Helios は ikaros family 分子の転写因子であり、Treg での発現が報告されている[64]。この報告[63]ではヒト胎児では Treg のみならず Naïve T 細胞の 60%が Helios を発現しており (成人 Naïve T 細胞はほぼ 0%)、サイトカイン(IL-2/TGF- β)で Treg の誘導を行った場合にも Helios の発現は胎児では 100%近く、成人より有意に高かった。

また、同報告[63]では、Helios を阻害することで、Naïve T 細胞から Treg への誘導が抑制されること、Helios の発現のコントロールはエピジェネティックにコントロールされていることが示されている。さらに、iTreg(induced Treg, in vitro で誘導された Treg)を PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate)で再刺激を行ったところ、胎児の IL-2 の産生は成人よりも抑えられることが示されている。この現象も Helios を阻害することにより、IL-2 産生増加が見られ、胎児 iTreg の再刺激に対する IL-2 産生抑制にも Helios が関わっている可能性が示唆される。マウスを用いた報告では in vivo においても Helios がエピジェネティックな作用で IL-2 の産生抑制に関わることが示されている[65]。

我々の今回の結果 (図 45) でも、Helios (*IKZF2*)は Naïve T 細胞 (一次刺激前) から二次刺激 2 4 時間後まで、継続して CB での高発現が確認された。また、

TSST-1 の刺激を受けた細胞の遺伝子発現変化は胎児の Treg と同様のパターンを示すこと、再刺激での IL-2 の産生低下がみられた。

今回得られた結果からは不十分であるが、臍帯血でも Helios が免疫寛容に重要な役割を果たしている可能性は十分に考えられる。

今回の実験の限界として、前述のようにフローサイトメトリーでの評価（細胞内染色・細胞増殖評価）二次刺激で行えなかったことのほかに以下のようなことが挙げられる。RNA-seq はコストとスケジュールの点からシーケンシングは2回に分けて行ったため、一次刺激前と二次刺激後の直接的な比較を行えなかった。評価のタイミングは結果的には適切であったと考えるが、採取ポイントを増やしてタイミングの検討も行いたかった。もちろんシングルセルでなくバルクの RNA-seq であり、細胞分化の評価には限界がある。

また、*in vitro* の実験であり、体内で生じている反応をどこまで再現できているかは不明である。特に、本来 Naïve CD4⁺ T 細胞はリンパ節内で樹状細胞より抗原提示を受けて分化するのであり、同じく MHC class II を発言した単球を APC として用いるのは単核球刺激の実験で頻用されている手法とはいえ、この点は考慮すべきことである。

しかし臍帯血の CD4⁺T 細胞と、胎児の Naïve T 細胞や Treg で発現増加が報告されている遺伝子群との関連が見られたことは、胎児・新生児の免疫成熟を考

える上で非常に興味深い。今回の実験結果はあくまで間接的な証拠にしかならないが、新生児の免疫寛容は Naive T 細胞に Helios が高発現であることが原因の一つかもしれない。今後の研究対象として注目していきたい。

新生児集中医療の水準が上がり重症児の救命率が向上した現在でも、細菌感染は頻度が高く、児の予後への影響が大きい病態である。本研究を基にして、新生児医療の発展のため新生児特有の免疫機能の特徴について更なる研究を進める所存である。

VI. 結論

今回の研究では、まず *in vitro* でスーパー抗原 TSST-1 により活性化した Vbeta2+ CD4+ T 細胞を、フローサイトメトリーを用いて高純度で回収する手法を新たに開発した。

それを用いて TSST-1 刺激を受けたヒトの臍帯血は再刺激により IL-2 の産生能が低下することと、Naïve T 細胞自体にその原因があることを示した。

フローサイトメトリーでの FOXP3 評価の結果や RNA-seq の解析から臍帯血 Naïve T 細胞は細胞刺激によって制御性 T 細胞様の変化を起こすことを示した。

また、RNA-seq の gene set enrichment analysis により臍帯血の Naïve T 細胞と在胎 20 週前後の胎児の Naïve T 細胞の遺伝子発現パターンが共通していること、TSST-1 刺激及びその後の再刺激によって、胎児の制御性 T 細胞の遺伝子発現と似た変化を起こすことを示した。

新生児でみられる免疫寛容とみられる現象の一つに、今回の実験で示したような制御性 T 細胞の関わりがあると思われる。

VII.倫理面への配慮

本研究は東京大学医学部附属病院の倫理委員会（審査番号 2018041NI）の承認を得て行った。臍帯血の提供については、分娩前に母に（同席の場合は父にも）小児科医より面談で説明したのちに、書面での同意を得た。

VIII. 謝辞

ご指導いただきました東京大学医学部附属病院 小児・新生児集中医療部の高橋尚人教授、同小児科の垣内五月講師、伊藤淳助教、同産婦人科学講座の永松健准教授、中山敏男助教、瀬山貴博助教、同アレルギーリウマチ科の土田優美助教、東京女子医科大学微生物免疫学教室加藤秀人先生、東京大学医学部小児科特任研究員佐藤亜以子様、感謝申し上げます。

また、実験に使用する血液の提供をしていただきました、東大病院小児科の先生方、臍帯血の提供をしていただきましたご両親とお子様、ご協力ありがとうございました。

IX. 引用文献

1. L. Liu, H. L. Johnson, S. Cousens, J. Perin, S. Scott, J. E. Lawn, I. Rudan, H. Campbell, R. Cibulskis, M. Li, C. Mathers, R. E. Black, C. H. E. R. G. o. W. a. UNICEF, Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet* **379**, 2151-2161 (2012).
2. N. Takahashi, H. Nishida, H. Kato, K. Imanishi, Y. Sakata, T. Uchiyama, Exanthematous disease induced by toxic shock syndrome toxin 1 in the early neonatal period. *Lancet* **351**, 1614-1619 (1998).
3. N. Takahashi, H. Kato, K. Imanishi, K. Miwa, S. Yamanami, H. Nishida, T. Uchiyama, Immunopathophysiological aspects of an emerging neonatal infectious disease induced by a bacterial superantigen. *J Clin Invest* **106**, 1409-1415 (2000).
4. N. Takahashi, Neonatal toxic shock syndrome-like exanthematous disease (NTED). *Pediatr Int* **45**, 233-237 (2003).
5. N. Takahashi, H. Kato, K. Imanishi, T. Ohki, R. Uehara, M. Y. Momoi, H. Nishida, T. Uchiyama, Change of specific T cells in an emerging neonatal infectious disease induced by a bacterial superantigen. *Microbiol Immunol* **53**, 524-530 (2009).
6. Y. Dong, X. Mo, Y. Hu, X. Qi, F. Jiang, Z. Jiang, S. Tong, Epidemiology of COVID-19 Among Children in China. *Pediatrics* **145**, (2020).
7. W. Shalish, S. Lakshminrusimha, P. Manzoni, M. Keszler, G. M. Sant'Anna, COVID-19 and Neonatal Respiratory Care: Current Evidence and Practical Approach. *Am J Perinatol* **37**, 780-791 (2020).
8. K. B. Hoehn, P. Ramanathan, A. Unterman, T. S. Sumida, H. Asashima, D. A. Hafler, N. Kaminski, C. S. Dela Cruz, S. C. Sealfon, A. Bukreyev, S. H. Kleinstein, Cutting Edge: Distinct B Cell Repertoires Characterize Patients with Mild and Severe COVID-19. *J Immunol*, (2021).
9. V. Vardhelli, A. Pandita, A. Pillai, S. K. Badatya, Perinatal COVID-19: review of current evidence and practical approach towards prevention and management. *Eur J Pediatr* **180**, 1009-1031 (2021).
10. J. E. Mold, J. Michaëlsson, T. D. Burt, M. O. Muench, K. P. Beckerman, M. P. Busch, T. H. Lee, D. F. Nixon, J. M. McCune, Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science* **322**, 1562-1565 (2008).
11. K. M. Adams, J. L. Nelson, Microchimerism: an investigative frontier in

- autoimmunity and transplantation. *JAMA* **291**, 1127-1131 (2004).
12. T. D. Burt, Fetal regulatory T cells and peripheral immune tolerance in utero: implications for development and disease. *Am J Reprod Immunol* **69**, 346-358 (2013).
 13. C. G. Brunstein, J. S. Miller, D. H. McKenna, K. L. Hippen, T. E. DeFor, D. Sumstad, J. Curtsinger, M. R. Verneris, M. L. MacMillan, B. L. Levine, J. L. Riley, C. H. June, C. Le, D. J. Weisdorf, P. B. McGlave, B. R. Blazar, J. E. Wagner, Umbilical cord blood-derived T regulatory cells to prevent GVHD: kinetics, toxicity profile, and clinical effect. *Blood* **127**, 1044-1051 (2016).
 14. H. D. Yun, A. Varma, M. J. Hussain, S. Nathan, C. Brunstein, Clinical Relevance of Immunobiology in Umbilical Cord Blood Transplantation. *J Clin Med* **8**, (2019).
 15. J. S. Do, F. Zhong, A. Y. Huang, W. J. Van't Hof, M. Finney, M. J. Laughlin, Foxp3 expression in induced T regulatory cells derived from human umbilical cord blood vs. adult peripheral blood. *Bone Marrow Transplant* **53**, 1568-1577 (2018).
 16. L. Yang, R. Jin, D. Lu, Q. Ge, T cell Tolerance in Early Life. *Front Immunol* **11**, 576261 (2020).
 17. J. E. Mold, S. Venkatasubrahmanyam, T. D. Burt, J. Michaëlsson, J. M. Rivera, S. A. Galkina, K. Weinberg, C. A. Stoddart, J. M. McCune, Fetal and adult hematopoietic stem cells give rise to distinct T cell lineages in humans. *Science* **330**, 1695-1699 (2010).
 18. S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, M. Toda, Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* **155**, 1151-1164 (1995).
 19. S. Sakaguchi, Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* **101**, 455-458 (2000).
 20. S. Hori, T. Nomura, S. Sakaguchi, Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**, 1057-1061 (2003).
 21. T. A. Chatila, F. Blaeser, N. Ho, H. M. Lederman, C. Voulgaropoulos, C. Helms, A. M. Bowcock, JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest* **106**, R75-81 (2000).
 22. M. A. Curotto de Lafaille, J. J. Lafaille, Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* **30**, 626-635 (2009).

23. A. M. Bilate, J. J. Lafaille, Induced CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in immune tolerance. *Annu Rev Immunol* **30**, 733-758 (2012).
24. T. S. Davidson, R. J. DiPaolo, J. Andersson, E. M. Shevach, Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3⁺ T regulatory cells. *J Immunol* **178**, 4022-4026 (2007).
25. A. M. Thornton, P. E. Korty, D. Q. Tran, E. A. Wohlfert, P. E. Murray, Y. Belkaid, E. M. Shevach, Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells. *J Immunol* **184**, 3433-3441 (2010).
26. W. Liu, A. L. Putnam, Z. Xu-Yu, G. L. Szot, M. R. Lee, S. Zhu, P. A. Gottlieb, P. Kapranov, T. R. Gingeras, B. Fazekas de St Groth, C. Clayberger, D. M. Soper, S. F. Ziegler, J. A. Bluestone, CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med* **203**, 1701-1711 (2006).
27. K. Wing, Y. Onishi, P. Prieto-Martin, T. Yamaguchi, M. Miyara, Z. Fehervari, T. Nomura, S. Sakaguchi, CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science* **322**, 271-275 (2008).
28. B. V. Kumar, T. J. Connors, D. L. Farber, Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity* **48**, 202-213 (2018).
29. J. Zhu, H. Yamane, W. E. Paul, Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol* **28**, 445-489 (2010).
30. L. Zhou, M. M. Chong, D. R. Littman, Plasticity of CD4⁺ T cell lineage differentiation. *Immunity* **30**, 646-655 (2009).
31. J. Zhu, W. E. Paul, Peripheral CD4⁺ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol Rev* **238**, 247-262 (2010).
32. H. Yamane, W. E. Paul, Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4(+) T cells toward distinct T-helper cell subsets. *Immunol Rev* **252**, 12-23 (2013).
33. A. J. Brosnahan, Animal Models Used to Study Superantigen-Mediated Diseases. *Methods Mol Biol* **1396**, 1-17 (2016).
34. J. A. Merriman, P. M. Schlievert, Identification, Purification, and Characterization of Staphylococcal Superantigens. *Methods Mol Biol* **1396**, 19-33 (2016).
35. H. Y. Tsen, S. C. Li, Y. C. Chiang, S. W. Tsai, Strain Discrimination of *Staphylococcus aureus* Using Superantigen Profiles. *Methods Mol Biol* **1396**, 35-49 (2016).

36. N. Takahashi, K. Imanishi, H. Nishida, T. Uchiyama, Evidence for immunologic immaturity of cord blood T cells. Cord blood T cells are susceptible to tolerance induction to in vitro stimulation with a superantigen. *J Immunol* **155**, 5213-5219 (1995).
37. N. Takahashi, H. Hasegawa, M. Komiyama, T. Ohki, Y. Yada, Y. Koike, R. Kawamata, Y. Honma, M. Momoi, Selective excretion of anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in a superantigen-inducing neonatal infectious disease. *Cytokine* **45**, 39-43 (2009).
38. A. Alcover, B. Alarcón, Internalization and intracellular fate of TCR-CD3 complexes. *Crit Rev Immunol* **20**, 325-346 (2000).
39. H. Liu, M. Rhodes, D. L. Wiest, D. A. Vignali, On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. *Immunity* **13**, 665-675 (2000).
40. S. Caserta, A. L. Taylor, N. Terrazzini, M. J. Llewelyn, Induction of Human Regulatory T Cells with Bacterial Superantigens. *Methods Mol Biol* **1396**, 181-206 (2016).
41. The Gene Ontology Consortium, The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic Acids Res* **47**, D330-D338 (2019).
42. A. Subramanian, P. Tamayo, V. K. Mootha, S. Mukherjee, B. L. Ebert, M. A. Gillette, A. Paulovich, S. L. Pomeroy, T. R. Golub, E. S. Lander, J. P. Mesirov, Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15545-15550 (2005).
43. J. Reimand, R. Isserlin, V. Voisin, M. Kucera, C. Tannus-Lopes, A. Rostamianfar, L. Wadi, M. Meyer, J. Wong, C. Xu, D. Merico, G. D. Bader, Pathway enrichment analysis and visualization of omics data using g:Profiler, GSEA, Cytoscape and EnrichmentMap. *Nat Protoc* **14**, 482-517 (2019).
44. A. Liberzon, C. Birger, H. Thorvaldsdóttir, M. Ghandi, J. P. Mesirov, P. Tamayo, The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst* **1**, 417-425 (2015).
45. A. Liberzon, A. Subramanian, R. Pinchback, H. Thorvaldsdóttir, P. Tamayo, J. P. Mesirov, Molecular signatures database (MSigDB) 3.0. *Bioinformatics* **27**, 1739-1740 (2011).
46. J. Godec, Y. Tan, A. Liberzon, P. Tamayo, S. Bhattacharya, A. J. Butte, J. P. Mesirov, W. N. Haining, Compendium of Immune Signatures Identifies Conserved and Species-Specific Biology in Response to Inflammation.

- Immunity* **44**, 194-206 (2016).
47. I. Kimber, S. Nookala, C. C. Davis, G. F. Gerberick, H. Tucker, L. M. Foertsch, R. J. Dearman, J. Parsonnet, R. V. Goering, P. Modern, M. Donnellen, J. Morel, M. Kotb, Toxic shock syndrome: characterization of human immune responses to TSST-1 and evidence for sensitivity thresholds. *Toxicol Sci* **134**, 49-63 (2013).
 48. G. Durand, M. Bes, H. Meugnier, M. C. Enright, F. Forey, N. Liassine, A. Wenger, K. Kikuchi, G. Lina, F. Vandenesch, J. Etienne, Detection of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones containing the toxic shock syndrome toxin 1 gene responsible for hospital- and community-acquired infections in France. *J Clin Microbiol* **44**, 847-853 (2006).
 49. M. C. Freeman, S. Mitchell, J. Ibrahim, J. V. Williams, Neonatal Toxic Shock Syndrome-Like Exanthematous Disease in North America. *J Pediatric Infect Dis Soc* **10**, 205-206 (2021).
 50. D. A. Morgan, F. W. Ruscetti, R. Gallo, Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* **193**, 1007-1008 (1976).
 51. O. Boyman, J. Sprent, The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol* **12**, 180-190 (2012).
 52. A. L. Bayer, A. Yu, T. R. Malek, Function of the IL-2R for thymic and peripheral CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ T regulatory cells. *J Immunol* **178**, 4062-4071 (2007).
 53. R. Setoguchi, S. Hori, T. Takahashi, S. Sakaguchi, Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med* **201**, 723-735 (2005).
 54. J. D. Fontenot, J. P. Rasmussen, M. A. Gavin, A. Y. Rudensky, A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* **6**, 1142-1151 (2005).
 55. J. G. Pol, P. Caudana, J. Paillet, E. Piaggio, G. Kroemer, Effects of interleukin-2 in immunostimulation and immunosuppression. *J Exp Med* **217**, (2020).
 56. H. Graßhoff, S. Comdühr, L. R. Monne, A. Müller, P. Lamprecht, G. Riemekasten, J. Y. Humrich, Low-Dose IL-2 Therapy in Autoimmune and Rheumatic Diseases. *Front Immunol* **12**, 648408 (2021).
 57. J. He, R. Zhang, M. Shao, X. Zhao, M. Miao, J. Chen, J. Liu, X. Zhang, Y. Jin, Y. Wang, S. Zhang, L. Zhu, A. Jacob, R. Jia, X. You, X. Li, C. Li, Y. Zhou, Y. Yang, H. Ye, Y. Liu, Y. Su, N. Shen, J. Alexander, J. Guo, J. Ambrus, X. Lin, D.

- Yu, X. Sun, Z. Li, Efficacy and safety of low-dose IL-2 in the treatment of systemic lupus erythematosus: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis* **79**, 141-149 (2020).
58. J. Y. Humrich, G. Riemekasten, Low-dose interleukin-2 therapy for the treatment of systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* **31**, 208-212 (2019).
59. M. Mizui, G. C. Tsokos, Low-Dose IL-2 in the Treatment of Lupus. *Curr Rheumatol Rep* **18**, 68 (2016).
60. J. L. Galloway, L. I. Zon, Ontogeny of hematopoiesis: examining the emergence of hematopoietic cells in the vertebrate embryo. *Curr Top Dev Biol* **53**, 139-158 (2003).
61. S. H. Orkin, L. I. Zon, Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* **132**, 631-644 (2008).
62. D. G. Bunis, Y. Bronevetsky, E. Krow-Lucal, N. R. Bhakta, C. C. Kim, S. Nerella, N. Jones, V. F. Mendoza, Y. J. Bryson, J. E. Gern, R. L. Rutishauser, C. J. Ye, M. Sirota, J. M. McCune, T. D. Burt, Single-Cell Mapping of Progressive Fetal-to-Adult Transition in Human Naive T Cells. *Cell Rep* **34**, 108573 (2021).
63. M. S. F. Ng, T. L. Roth, V. F. Mendoza, A. Marson, T. D. Burt, Helios enhances the preferential differentiation of human fetal CD4(+) naive T cells into regulatory T cells. *Sci Immunol* **4**, (2019).
64. N. Ohkura, M. Hamaguchi, H. Morikawa, K. Sugimura, A. Tanaka, Y. Ito, M. Osaki, Y. Tanaka, R. Yamashita, N. Nakano, J. Huehn, H. J. Fehling, T. Sparwasser, K. Nakai, S. Sakaguchi, T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development. *Immunity* **37**, 785-799 (2012).
65. I. Baine, S. Basu, R. Ames, R. S. Sellers, F. Macian, Helios induces epigenetic silencing of IL2 gene expression in regulatory T cells. *J Immunol* **190**, 1008-1016 (2013).