

審査の結果の要旨

氏名 武藤 浩司

新生児は易感染性や免疫寛容性など、成人とは異なる免疫学的特徴を有している。本研究ではこのような新生児特有の現象について調べるために、Naïve CD4+ T 細胞（以降 Naïve T 細胞）の機能に注目し、*in vitro* でのスーパー抗原 TSST-1 刺激に対する臍帯血と成人末梢血 Naïve T 細胞の差異を評価・観察し、制御性 T 細胞(Treg : regulatory T cells)への分化など免疫寛容に関わる現象の有無について評価を行なうこととした。

まず予備実験において、TSST-1 刺激で活性化した TCR V $\beta$ 2+ CD4+ T 細胞を回収する方法を新たに開発した。TSST-1 刺激後に V $\beta$ 2 鎖を有する T 細胞受容体は CD3 と複合体を作って細胞内に移行する性質を利用し、CD4+ T 細胞をフローサイトメトリーで CD3 と V $\beta$ 2 で展開し、CD4+(CD3-V $\beta$ 2- ~CD3+V $\beta$ 2+) で定義される部分を本来の TCR V $\beta$ 2+ CD4+ T 細胞としてフローサイトメトリーで回収することとした。この方法で実際に同細胞を回収可能なことは、TCRV $\beta$  鎖レパトア解析と recombinant IL-2 で拡大培養した細胞のフローサイトメトリーで解析で高純度であることを確認した。

これらの手法などを用い、下記の結果が得られている。

- ① 先行研究では単核球に対して、TSST-1 刺激を行い反応した芽球に対して、再刺激を行なったところ臍帯血の培養上清で IL-2 の低下が見られたが、本研究で対象を Naïve T 細胞としても同様に再刺激に対する臍帯血の IL-2 低下がみられた。RNA-seq の結果でも再刺激後は *IL2* が臍帯血で低下しており、産生低下に伴うものと推測された。
- ② そのほか培養上清中のサイトカインの評価では、IL-10 や TGF- $\beta$ 1 など抑制性サイトカインが臍帯血で増加するなどの現象は見られなかった。
- ③ フローサイトメトリーでの評価では、臍帯血での FOXP3 の増加が見られた。また、一次刺激では臍帯血の方が旺盛な細胞分裂が確認された。
- ④ RNAseq での個々の遺伝子発現評価でも、Treg 関連の複数の遺伝子が刺激後に、成人末梢血と比較して臍帯血で有意に発現増加が見られた。特に *IKZF2* は Naïve 細胞の段階から刺激後まで一貫して臍帯血で高発現であった。
- ⑤ RNAseq の GO enrichment 解析により、臍帯血・成人末梢血とともに、刺激例と非刺激例の遺伝子発現の差異は、細胞の活性や増殖反応によるものと推測された。一方、細胞刺激の同じタイミングでの臍帯血と成人末梢血の差異は免疫機能と推測された。
- ⑥ ⑤の結果を踏まえて、MSigDB の C7:immunologic signature gene sets を対象として、GSEA (Gene set enrichment analysis)を行なった。刺激前後の複数のタイミング

でエンリッチの評価が上位であった遺伝子セットは、胎児と成人の Naïve T 細胞および Treg を比較した一連の遺伝子セット (GSE25087) であった。これにより、本研究での刺激前の臍帯血 Naïve T 細胞は胎児の Naïve T 細胞に高発現の遺伝子セットにエンリッチしていること (逆に本研究の成人末梢血 Naïve T 細胞は同じく胎児の Naïve T 細胞に低発現の遺伝子セットにエンリッチしている) ことが判明した。また、本研究での刺激後の臍帯血は胎児の Treg に高発現の遺伝子セットにエンリッチしていることが判明した。

以上、本論文は新生児の免疫寛容・易感染性は、Naïve T 細胞が制御性 T 細胞に分化しやすい性質を有していることが一つの原因であり、そのメカニズムは胎児期の免疫寛容機構と共通したものであることが推測されることが示された。今後の新生児の免疫寛容や成長に伴う小児の免疫機能の成熟の研究につながる重要な知見が得られた。

よって本論文は博士 ( 医学 ) の学位請求論文として合格と認められる。