

**T 細胞抗原受容体シグナルの TRAF6 依存的な調節による  
制御性 T 細胞の胸腺内分化決定**

下茂 佑輔

目次

1. 緒言 . . . . . 1

2. 結果と考察

2-1 TRAF6 欠損による制御性 T 細胞の胸腺内分化異常 . . . . . 7

2-2 TRAF6 が機能して制御性 T 細胞の胸腺内分化を誘導する細胞の同定 . . . . . 10

2-3 胸腺細胞で制御性 T 細胞への分化を誘導する TRAF6 シグナルの上流の受容体と細胞内シグナル伝達機構の解明 . . . . . 16

3. 総括 . . . . . 27

4. 材料と実験方法 . . . . . 30

5. 参考文献 . . . . . 34

6. 図表 . . . . . 45

## 第一章 緒言

### 1-1 免疫寛容

免疫系による自己と非自己の識別は、生体の免疫恒常性維持に必須である。免疫系は生体にとって有害な、膨大な病原微生物などを非自己として認識し、排除する。この予見不可能な非自己の認識を可能にしているのが、獲得免疫系最大の特徴の1つである、T細胞とB細胞が持つ抗原受容体の多様性である。理論上  $10^{15\sim 16}$  にも及ぶこの抗原受容体の多様性は、ランダムな体細胞組み換えの過程を経て生じる。この過程では自己を認識する抗原受容体を持つリンパ球クローンも生じるため、免疫系は常に自己免疫という危険性を内包している。

免疫系にはこの自己免疫を回避するために複数の機構が備わっている。自己に対する不応答性(免疫寛容)を誘導する機構は、機能する場所に応じて中枢性と末梢性に分類される。T細胞においては、中枢性寛容は胸腺でのT細胞分化の途中に起こる **negative selection** 機構であり、自己反応性T細胞を除去することにより成立する。末梢性寛容は、末梢組織でのアナジー誘導、アポトーシス誘導、さらには制御性T細胞による免疫反応の抑制機構から成り立っている。これらの機構の破綻は自己組織に対する免疫応答を惹起し、それが持続すると自己免疫疾患を発症する。

ここではこれらのうち、本研究との関わりが深い、胸腺内における胸腺髄質上皮細胞を介した自己反応性T細胞の除去と、末梢組織での自己免疫反応の抑制に必須な制御性T細胞について概説する。

#### 1-1-1 胸腺髄質における自己反応性T細胞の除去

##### 1-1-1-1 胸腺内におけるT細胞の選択

T細胞分化の場である胸腺は、組織構造としては外側に皮質(**cortex**)、内側に髄質(**medulla**)に分かれており、胸腺皮質上皮細胞、胸腺髄質上皮細胞、樹状細胞等のストローマ細胞が3次元的に配置された機能的な微小環境が形成されている(図1)。胸腺におけるT細胞の分化は、骨髄の造血幹細胞に由来するT前駆細胞が胸腺内に移入することによって開始される。T前駆細胞は、最も未熟な  $CD4^+CD8^-$  (**double negative: DN**)胸腺細胞から、 $CD4^+CD8^+$  (**double positive: DP**)胸腺細胞へと分化する。このDP胸腺細胞は、それぞれ抗原特異性の異なるT細胞抗原受容体(**T cell antigen receptor: TCR**)を発現している。DP胸腺細胞は、自身のTCRを介してストローマ細胞によって提示された主要組織適合遺伝子複合体抗原(**major histocompatibility complex: MHC**)と自己抗原ペプチドとの複合体と相互作用しながら、皮質

から髄質の方向へ移動しながら分化成熟する。この過程で TCR/MHC の相互作用を介して、細胞生死の選択を受ける。自己の MHC と適度に反応する TCR 発現する細胞は CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (CD4 single positive: CD4SP) 胸腺細胞、あるいは CD8SP 胸腺細胞へと分化する (positive selection)。一方で、MHC に提示された自己抗原と強く反応する TCR を持つ細胞には、アポトーシスが誘導される (negative selection)。また、自己の MHC を認識できない細胞にもアポトーシスが誘導される (death by neglect)。このような選択を経て、大部分の自己反応性 T 細胞は除去され、非自己である外来抗原を認識できる T 細胞が胸腺から末梢組織へと移出する<sup>12)</sup>。

#### 1-1-1-2 胸腺髄質上皮細胞を介した自己反応性 T 細胞の除去

個々の細胞は、その種類によらず共通に保有する構造タンパク質に加え、構成する臓器や組織に関連した固有の機能性タンパク質をもつ。近年の報告から、胸腺髄質上皮細胞には、本来末梢組織で機能する多くのタンパク質 (例えば膵臓で機能するインシュリンなど) が異所的に発現していることが明らかになった (promiscuous gene expression)。Kyewski らのグループは、そのような組織特異的抗原 (tissue specific antigen: TSA) が MHC に提示され、それらに反応する TCR を発現する細胞が自己反応性 T 細胞として除去されることを提唱した<sup>3)</sup>。この組織特異的抗原の発現を制御する分子として Autoimmune regulator (Aire) が同定されている<sup>4)</sup>。Aire はヒトの遺伝性自己免疫疾患の 1 つである自己免疫性多腺性内分泌不全症 I 型 (Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy: APECED) の原因遺伝子として同定された<sup>56)</sup>。Aire は胸腺内では胸腺髄質上皮細胞に特異的に発現している。また、Aire 欠損マウスの胸腺では、一部の組織特異的抗原の発現が顕著に低下する。そして Aire 欠損マウスは APECED 患者に類似した自己免疫疾患を発症する。これらの結果から、胸腺髄質上皮細胞に発現する Aire が組織特異的抗原の発現を制御し、それらの抗原に反応する自己反応性 T 細胞を除去することで、中枢性寛容を誘導すると考えられている<sup>4)78)</sup> (図 1)。

自己免疫疾患を発症し、胸腺微小環境の構造に異常が見られる RelB 欠損マウス<sup>9)</sup>、TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) 欠損マウス<sup>10)</sup>や、NF-κB inducing kinase (NIK) の変異マウス (aly/aly)<sup>11)</sup> の解析から、この Aire<sup>+</sup> 胸腺髄質上皮細胞の分化を誘導するシグナルが明らかになった。当研究室では TRAF6 欠損マウスの解析を糸口として、胸腺髄質上皮細胞の分化を誘導する細胞表面受容体を同定し、そのシグナル伝達機構を解明した。マウス胎仔期の胸腺髄質上皮細胞の分化は TNF receptor super family の receptor activator of NF-κB (RANK) からのシグナルによって誘導される。そして、出生後は RANK と CD40 のシグナルが協調的に機能して分化が誘導される。さらに、胸腺髄質上皮細胞分化を誘導する RANK と CD40 シグナルは TRAF6 と NIK を介しており、このシグナルの下流では RelB が活性化する<sup>12)</sup>。したがって、RANK と CD40 のシグナルが Aire<sup>+</sup> 胸腺髄質上皮細胞の分化を制御することで、中枢性寛容を誘導すると考えられている<sup>12)13)14)</sup>。

### 1-1-2 制御性 T 細胞

上述した機構により、大部分の自己反応性 T 細胞は除去される。しかし、この機構は完全ではなく、一部の自己反応性 T 細胞は胸腺内での negative selection を回避して末梢組織へと移出する。近年、この negative selection を逃れた自己反応性 T 細胞は、免疫抑制機能に特化した「制御性 T 細胞(regulatory T cell: T<sub>reg</sub>)」というヘルパー T 細胞のサブセットによって抑制的に制御されていることが判明し<sup>15)</sup>、その分化メカニズムを解明するための研究が盛んに行われている<sup>16)</sup>。

#### 1-1-2-1 自己免疫反応を抑制する CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T 細胞

免疫反応を抑制的に制御する T 細胞の存在を示唆する報告は 1969 年まで遡る。西塚、坂倉は、生後 3 日目のマウスから胸腺を除去すると臓器特異的な自己免疫疾患を自然発症することを報告した<sup>17)</sup>。この胸腺を摘出したマウスに成体マウスの T 細胞、あるいは胸腺細胞を移植すると自己免疫疾患は抑制された。これらの結果は、正常個体の免疫系には自己反応性 T 細胞を抑制する T 細胞が「生得的」に存在すること、そしてそれらは生後 3 日目以降に胸腺内で産生されることを示唆していた。

その後、自己免疫反応を抑制する T 細胞を他の T 細胞と細胞表面のマーカーで区別することが試みられた。坂口らは細胞表面に CD25 (IL-2 receptor  $\alpha$  chain) を発現する少数の CD4<sup>+</sup>T 細胞集団が *in vivo* で免疫反応抑制能を持ち、自己免疫反応を抑制することを明らかにした<sup>18)</sup>。この発見をきっかけとして“CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T<sub>reg</sub>”の機能と性質が詳細に解析され、この集団が自己免疫だけでなく、炎症、アレルギーなど、様々な免疫反応を抑制する活性を持つことが明らかになった。さらにこの集団は主に胸腺内で分化し、他の T 細胞とは異なる分子的、機能的性状を示すことが判明した。この集団は cytotoxic T cell-associated antigen-4 (CTLA-4)、glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene/protein (GITR) の発現が高く、*in vitro* で TCR を刺激しても IL-2 などのサイトカインを産生せず、増殖しないアナジー状態にある。そして、*in vitro* で他の T 細胞と共培養すると、その増殖とサイトカイン産生を抑制するという機能を持つ<sup>19)20)</sup>。

制御性 T 細胞研究を飛躍的に発展させたのが、この集団の分化と免疫反応抑制能を司る転写因子として forkhead box P3 (Foxp3) が同定されたことである。Foxp3 は Scurfy マウスと、ヒト immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked (IPEX) 症候群患者に発症する致死性の自己免疫性、炎症性、アレルギー性疾患の原因遺伝子として同定された<sup>21)22)</sup>。堀らは Foxp3 が CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T<sub>reg</sub> に特異的に発現していること、そして免疫反応抑制能を持たない CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞に Foxp3 を強制発現するだけで、制御性 T 細胞に特徴的な遺伝子の一群の発現が誘導され、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T<sub>reg</sub> と非常に良く似た細胞集団へと転換できることを示した。また、Foxp3 は CD25 と異なり活性化によって誘導されないことから、制

御性 T 細胞の特異的な分子マーカーであることが明らかになった<sup>23)</sup>。さらに、Foxp3 欠損マウスおよび Scurfy マウスでは CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T<sub>reg</sub> がほとんど存在しないことが示され、Foxp3 が制御性 T 細胞の分化と機能に必要な十分なマスター遺伝子であることが明らかになった<sup>23)24)25)</sup>。

#### 1-1-2-2 胸腺内における制御性 T 細胞分化のメカニズム

胸腺内の Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞分化には TCR/MHC の相互作用が必須である<sup>26)</sup>。TCR トランスジェニックマウスを用いた解析から、自己抗原に高い親和性を持つ TCR を発現する細胞が制御性 T 細胞へと分化することが示唆されている<sup>27)28)29)</sup>。TCR からの刺激と共に、CD28 を介した共刺激も制御性 T 細胞分化に必要である<sup>30)</sup>。また、Foxp3 を発現する細胞は生後 3 日目以降に出現し、髄質領域に局在する<sup>31)</sup>。さらに、髄質に局在する抗原提示細胞である胸腺髄質上皮細胞<sup>32)</sup>と樹状細胞<sup>33)</sup>の制御性 T 細胞分化における重要性を示唆する報告もある。このような背景から、制御性 T 細胞と胸腺髄質における自己反応性 T 細胞の除去の間には密接な関係があると考えられている(図 1)。しかし、その分化メカニズムには未解明な部分が多く、それぞれの細胞の制御性 T 細胞分化に対する寄与の度合いや、制御性 T 細胞と他の T 細胞への分化がどのようなシグナルによって分けられているかは明らかではない。

#### 1-1-2-3 内在性と誘導性制御性 T 細胞分化

大部分の制御性 T 細胞は胸腺内で分化すると考えられているが、近年の報告から末梢組織においても transforming growth factor (TGF) $\beta$ 依存的に Foxp3 を発現する制御性 T 細胞が分化誘導されることが明らかになっている。このような背景から、制御性 T 細胞は内在性と誘導性に分類されるようになった(図 2)。内在性制御性 T 細胞(natural T<sub>reg</sub>: nT<sub>reg</sub>)は胸腺内で分化し、自己寛容など「生得性」免疫寛容の獲得・維持を担う。一方で、誘導性制御性 T 細胞(induced T<sub>reg</sub>: iT<sub>reg</sub>)は抗原刺激により末梢のナイーブ T 細胞から誘導され、抗原特異的な「獲得性」免疫寛容に関与する。iT<sub>reg</sub> は特に腸管関連リンパ組織で誘導され、食物や腸内細菌に対する免疫寛容の誘導に関与すると考えられている<sup>34)</sup>。

*in vitro* の TGF $\beta$ による iT<sub>reg</sub> の分化誘導系が確立され<sup>35)</sup>、iT<sub>reg</sub> の分化は IL-2 やレチノイン酸によって促進されることが明らかになった<sup>36)37)38)</sup>。一方で IL-6 は TGF $\beta$ による Foxp3 の発現を阻害し、IL-17 を産生する Th17 という炎症性ヘルパー T 細胞への分化が誘導されることが判明している<sup>39)40)41)</sup>。

## 1-2 TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6)

### 1-2-1 TRAF6 によるシグナル制御機構

TRAF6 は CD40 や RANK などの TNF receptor super family や IL-1/Toll-like receptor family からのシグナルを伝達し、転写因子である NF- $\kappa$ B や AP-1 の活性化することで、細胞の増殖や分化を誘導する分子である<sup>42)43)</sup>。TRAF6 は N 末端より RING finger ドメイン、Zinc finger ドメイン、coiled-coil ドメイン、そして TRAF ファミリーで保存された TRAF-C ドメインより構成されている。TRAF-C ドメインは上流の受容体やアダプタータンパク質との結合および多量体形成、coiled-coil ドメインは多量体形成に必要と考えられている。RING finger ドメインはユビキチン転移酵素(E3)活性を持つ。細胞質に移行した TRAF6 は自己ユビキチン化反応により K63 型のポリユビキチン化を受ける<sup>44)</sup>。ついで形成したポリユビキチン鎖に TGF $\beta$  activating kinase-1 (TAK1)と TAK1 binding protein 2/3 (TAB2/3)<sup>45)</sup>の複合体が結合し、NF- $\kappa$ B の活性化に必要な I $\kappa$ B kinase (IKK)複合体や MAP kinase の活性化を誘導する(図 3)。

### 1-2-2 TRAF6 の生体内での機能

当研究室と Mak ら、Choi らのグループによって TRAF6 欠損マウスが作製され、TRAF6 の個体レベルでの機能が解析された<sup>46)47)48)49)</sup>。TRAF6 欠損マウスはメンデル則から予想されるよりも低い比率で出生し、生後約 2~3 週間で死亡する。TRAF6 欠損マウスは免疫系、特にリンパ組織形成に関して様々な表現型を示す。その解析から、TRAF6 は RANK の下流でシグナルを伝達し、破骨細胞の分化やリンパ節の初期発生に必須であること、さらに脾臓の微小環境形成にも必須であることが判明している。

### 1-2-3 TRAF6 による免疫寛容の誘導

TRAF6 欠損マウスは肺、肝臓、脾臓などにリンパ球の浸潤が見られると共に、自己抗体が産生されており、激しい自己免疫疾患を発症することを当研究室で報告している<sup>10)</sup>。TRAF6 欠損マウスの胸腺微小環境の構造には異常が見られ、胸腺髄質上皮細胞の髄質への局在が失われると共に、成熟した胸腺髄質上皮細胞がほとんど存在しない。さらに、TRAF6 欠損マウスの胸腺では Aire および組織特異的抗原の発現が著しく低下する。TRAF6 欠損胸腺ストローマ(胸腺から胸腺細胞、樹状細胞などの造血幹細胞由来の細胞を除去したもの)を、胸腺を持たないヌードマウスに移植すると、移植先のマウスが自己免疫疾患を発症する。以上の結果は、胸腺ストローマ内の TRAF6 が胸腺髄質上皮細胞の分化と免疫寛容の誘導に必須であることを強く示唆する。

一方で、TRAF6 欠損マウスの胸腺では CD4SP CD25<sup>+</sup>胸腺細胞が大幅に減少し、胸腺細胞における Foxp3 の発現が低下することも判明していた。つまり、TRAF6 欠損マウスの胸腺では Aire<sup>+</sup>胸腺髄質上皮細胞による自己反応性 T 細胞の除去と、Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞の分化という、免疫寛容の誘導に必須な 2 つの機構が破綻している。TRAF6 欠損による Aire<sup>+</sup>胸腺髄質上皮細胞の異常については、RANK と CD40 の下流で TRAF6 が機能してこの細胞の分化を誘導するためである<sup>12)</sup>。しかし、TRAF6 欠損による制御性 T 細胞分化異常の原因は解明されていなかった。TRAF6 欠損マウスの胸腺では CD4SP 胸腺細胞の分化は阻害されないにもかかわらず、CD4SP CD25<sup>+</sup>制御性 T 細胞が消失することから、TRAF6 がこの特殊な集団への分化を決定するプロセスに関与することが示唆されていた。

これまでに制御性 T 細胞の胸腺内分化に関与する胸腺髄質上皮細胞<sup>10)12)</sup>、樹状細胞<sup>49)</sup>そして、T 細胞<sup>50)51)</sup>のいずれにおいても TRAF6 が機能することが報告されている。そこで本研究では、それぞれの細胞における TRAF6 欠損が制御性 T 細胞分化に与える影響を検証し、さらに制御性 T 細胞への分化を決定する TRAF6 依存的なシグナル伝達機構の解明を目指した。

### 1-3 本研究の目的

制御性 T 細胞は自己免疫だけでなく、炎症、アレルギー、移植免疫、感染免疫、腫瘍免疫など様々な免疫反応を抑制する機能を持つ。このような背景から、この細胞は様々な免疫疾患治療の標的として注目されており、その分化決定機構は解明すべき重要な課題である。本研究は TRAF6 欠損マウスの解析を糸口として制御性 T 細胞分化の分子機構を解明し、免疫疾患治療に有益な情報基盤を得ることを最終目的とした。具体的に以下の方法で研究を進めた。

1. TRAF6 が機能して制御性 T 細胞への分化を誘導する細胞の同定
2. 同定した細胞で制御性 T 細胞への分化を誘導する TRAF6 シグナルの上流の受容体と細胞内シグナル伝達機構の解明



## 第二章 結果と考察

### 2-1 TRAF6 欠損による制御性 T 細胞の胸腺内分化異常

TRAF6 欠損マウスは激しい自己免疫疾患を発症し、その胸腺内では、CD4SP CD25<sup>+</sup> 胸腺細胞の比率が大幅に低下すること、そして胸腺細胞における Foxp3 mRNA の発現が大幅に減少することを当研究室ですでに報告していた<sup>10)</sup>。本研究では、まず抗 Foxp3 抗体を用いた細胞内染色および組織切片の免疫染色を行い、TRAF6 欠損マウスの胸腺および末梢組織における制御性 T 細胞について、より詳細に解析を行った。

#### 2-1-1 胸腺内の細胞における TRAF6 欠損により制御性 T 細胞分化異常は生じる

野生型および TRAF6 欠損マウスの胸腺内の細胞をフローサイトメトリーにより解析すると、TRAF6 欠損マウスの胸腺でも CD4SP 胸腺細胞の分化は阻害されていなかった。しかし、CD4SP 胸腺細胞中の Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞の比率および CD4SP Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞の絶対数は、TRAF6 欠損マウスの胸腺で野生型の約 1/10 に減少していた(図 4A)。野生型マウスの胸腺では、ほとんどの制御性 T 細胞は胸腺髄質領域(CD8α<sup>+</sup>細胞が少ない領域)に局在する。しかし、TRAF6 欠損マウスの胸腺髄質では、Foxp3<sup>+</sup>細胞がほぼ消失していた(図 4B)。

TRAF6 欠損マウスの末梢組織では激しい自己免疫性の炎症が起きており、胸腺も萎縮している。したがって、この制御性 T 細胞の大幅な減少が、胸腺内での分化異常によるかは明らかではなかった。そこで、まだ自己免疫疾患を発症していない生後 3 日齢以降の CD4SP CD25<sup>+</sup>制御性 T 細胞分化を解析した。その結果、TRAF6 欠損マウスの胸腺では生後非常に早い段階から CD4SP CD25<sup>+</sup>制御性 T 細胞が減少していた(図 4C)。

マウス胎仔胸腺は器官培養することができる。この器官培養系で DN 胸腺細胞は、DP 胸腺細胞から CD4SP 胸腺細胞、そして Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞まで分化する。理化学研究所免疫恒常性研究ユニットの堀昌平先生から Foxp3 レポーターマウス(*Foxp3<sup>hCD2</sup>*)を提供していただき<sup>52)</sup>、この胎仔胸腺器官培養系を用いて、末梢組織での激しい自己免疫反応など、胸腺外の影響を排除した状態で胸腺内の T 細胞分化を解析した。その結果、TRAF6 欠損マウス胎仔胸腺では制御性 T 細胞分化が著しく損なわれた(図 4D)。

以上の結果から、胸腺外の環境などの外的な要因ではなく、胸腺内の細胞における TRAF6 欠損により、制御性 T 細胞の胸腺内分化異常が生じることが明らかになった。

## 2-1-2 TRAF6 欠損マウスの脾臓には野生型と匹敵する数の制御性 T 細胞が存在する

次に TRAF6 欠損マウスの末梢組織における制御性 T 細胞の解析を行った。TRAF6 欠損マウスの胸腺では制御性 T 細胞がほぼ消失するにもかかわらず、脾臓における CD4<sup>+</sup>細胞中の CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞の比率は野生型の約 1/2 であった。また、TRAF6 欠損マウスの脾臓では CD4<sup>+</sup>細胞の絶対数が野生型の約 2 倍に増加するため、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞の絶対数は野生型と有意な差が無かった(図 5A)。

最近の報告から、末梢組織に存在する Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞は、転写因子 Helios を発現する胸腺由来のものと、Helios を発現しない末梢組織で誘導されたものに区別できることが明らかになった<sup>53)</sup>。そこで、脾臓の Foxp3<sup>+</sup>細胞における Helios と細胞増殖のマーカーである Ki-67(G<sub>0</sub> 期以外の細胞で発現)の発現を解析した。その結果、野生型では 5%以下の Helios<sup>+</sup>制御性 T 細胞が、TRAF6 欠損マウスの脾臓では約 15%存在した。したがって、TRAF6 欠損マウスの脾臓に存在する制御性 T 細胞は、末梢で誘導されたものの比率が野生型よりも高いことが判明した。また、Helios<sup>+</sup>の胸腺由来の制御性 T 細胞の増殖を解析すると、Ki-67 を発現する細胞の比率が TRAF6 欠損マウスの脾臓で野生型と比較して有意に高いことが判明した(図 5B)。

末梢での制御性 T 細胞の分化、増殖および維持にはサイトカインである IL-2<sup>54)</sup>と TGFβ が必須である<sup>55)56)</sup>。野生型および TRAF6 欠損マウスの脾臓から RNA を抽出し、半定量的な RT-PCR により IL-2 と TGFβ の mRNA の発現を解析した。その結果、TGFβ の発現には野生型と TRAF6 欠損マウスの間で大きな差が無かったものの、TRAF6 欠損マウスの脾臓では、IL-2 の発現が野生型と比較して著しく上昇していた(図 5C)。

末梢組織における誘導性の制御性 T 細胞分化は *in vitro* でナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞を TGFβ などで刺激することにより再現される<sup>35)</sup>。そこで、野生型および TRAF6 欠損マウスの脾臓から CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>ナイーブ T 細胞分離し、*in vitro* における TGFβ による誘導性の制御性 T 細胞分化を解析した。その結果、TRAF6 を欠損してもこの誘導性の制御性 T 細胞分化は阻害されず、むしろ亢進することが分かった(図 5D)。

以上の結果から、TRAF6 欠損マウスの脾臓では、IL-2 の過剰な産生による制御性 T 細胞の分化および増殖の亢進が起きていることが示唆された。また、TRAF6 の機能は末梢組織ではなく、「胸腺内」の制御性 T 細胞分化に特化していることが示唆された。

### 2-1-3 考察 (2-1)

#### 2-1-3-1 胸腺と末梢組織における制御性 T 細胞の TRAF6 要求性の違い

TRAF6 欠損マウスの胸腺では制御性 T 細胞が大幅に減少した。胎仔胸腺器官培養系を用いた解析の結果、これは胸腺内の細胞における TRAF6 欠損が原因であることが判明した(図 4D)。胸腺からの制御性 T 細胞の産生が大幅に減少するにもかかわらず、TRAF6 欠損マウスの脾臓には野生型と匹敵する数の制御性 T 細胞が存在した(図 5A)。

Shevach らは転写因子 Helios が胸腺由来の制御性 T 細胞(nT<sub>reg</sub>)のマーカーとなることを報告した<sup>53)</sup>。胸腺内に存在する制御性 T 細胞はほぼ Helios<sup>+</sup>である。一方で *in vitro* で TGFβ の刺激により誘導した制御性 T 細胞は Helios を発現しない。さらに、TCR トランスジェニックマウスを用いた外来抗原依存的な *in vivo* の iT<sub>reg</sub> 分化誘導実験においても、誘導される制御性 T 細胞は Helios を発現しないことから、Helios の発現を指標として内在性と誘導性の制御性 T 細胞を区別できると考えられている。TRAF6 欠損マウスの脾臓では Helios<sup>+</sup> の iT<sub>reg</sub> の比率が野生型よりも有意に高かった(図 5B)。また、*in vitro* で TGFβ によって誘導される iT<sub>reg</sub> の分化も TRAF6 欠損によって阻害されず、むしろ亢進していた(図 5D)。したがって、TRAF6 欠損マウスでは末梢組織における制御性 T 細胞の分化誘導が促進されていることが示唆された。

一方で、TRAF6 欠損マウスの脾臓では、Helios を発現する胸腺由来の nT<sub>reg</sub> の増殖が野生型よりも亢進していた(図 5B)。また、TRAF6 欠損マウスの脾臓では IL-2 が過剰に産生されていた(図 5C)。これはおそらく激しい自己免疫反応によるものと考えられる。この過剰な IL-2 産生による胸腺由来の nT<sub>reg</sub> の増殖亢進と、末梢組織における iT<sub>reg</sub> の分化誘導の促進が、絶対数では野生型と有意差がなくなる一因であると考えられる。

これらの結果から、制御性 T 細胞分化における TRAF6 の要求性は胸腺と末梢組織で異なり、TRAF6 は制御性 T 細胞の胸腺内分化には必須である一方で、末梢組織における分化、増殖や維持には必要ないことが示唆された。また、胸腺由来の nT<sub>reg</sub> も末梢組織で誘導される iT<sub>reg</sub> も共に Foxp3 を発現する免疫抑制機能を持った制御性 T 細胞であるが、その分化メカニズムは異なることが示唆された。

*in vivo* における誘導性制御性 T 細胞の分化は、特に腸管関連リンパ組織で誘導されることが知られている。胸腺と末梢組織で制御性 T 細胞分化における TRAF6 の要求性が異なることをより正確に示すために、TRAF6 欠損マウスの腸管関連リンパ組織における制御性 T 細胞を解析することが必要である。

## 2-2 TRAF6 が機能して制御性 T 細胞の胸腺内化を誘導する細胞の同定

制御性 T 細胞は胸腺内で抗原提示細胞と相互作用しながら、未成熟な T 細胞(胸腺細胞)から分化する。また胸腺には抗原提示細胞として胸腺上皮細胞と樹状細胞が存在する。胸腺上皮細胞は胸腺ストローマを形成する細胞であり、胸腺細胞と樹状細胞は造血幹細胞由来の細胞である。そこで、胸腺ストローマ移植と造血幹細胞を含む胎仔肝臓細胞の移植実験を行い、どの細胞における TRAF6 欠損が制御性 T 細胞分化異常の原因となっているかを解析した。

### 2-2-1 胸腺ストローマにおける TRAF6 は制御性 T 細胞分化に必須ではない

これまでに当研究室では、TRAF6 が胸腺髄質上皮細胞の分化に必須であることを報告してきた<sup>10)</sup>。TRAF6 は TNF receptor super family の RANK と CD40 の下流で機能して胸腺髄質上皮細胞の分化を誘導する<sup>12)</sup>。胸腺内の CD45<sup>+</sup>TER119<sup>-</sup>の胸腺ストローマ画分における胸腺髄質上皮細胞の比率を解析すると、TRAF6 欠損マウスの胸腺では MHCII<sup>+</sup>UEA-1<sup>+</sup>胸腺髄質上皮細胞の比率が大幅に低下した(図 6A)。この胸腺髄質上皮細胞が制御性 T 細胞の選択に関与することも報告されていたが、TRAF6 欠損によるこの細胞の異常が制御性 T 細胞分化異常の原因であるかは明らかではなかった。

そこで、まず胸腺髄質上皮細胞を含む胸腺ストローマにおける TRAF6 欠損が制御性 T 細胞分化に与える影響を解析した。野生型および TRAF6 欠損胎仔胸腺から、胸腺細胞、樹状細胞などの造血幹細胞由来の細胞を除去して胸腺ストローマとし、胸腺を持たないヌードマウスに移植した。8 週間後に移植した胸腺内における制御性 T 細胞の存在比および分布を解析した。フローサイトメトリーによる解析の結果、TRAF6 欠損胸腺ストローマを移植しても、CD4SP 胸腺細胞中の Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞の比率は野生型の胸腺ストローマを移植した際の 2/3 程度にしか低下しなかった(図 6B)。また、組織切片の免疫染色による解析の結果、TRAF6 欠損胸腺ストローマを移植した際の制御性 T 細胞の局在にも異常はなく、髄質領域に局在していた(図 6C)。TRAF6 欠損胸腺ストローマを移植した際の制御性 T 細胞の比率の低下は、統計的に有意な低下であった。したがって、胸腺ストローマにおける TRAF6 欠損は制御性 T 細胞の分化異常に影響を与えていると考えられる。しかし、TRAF6 欠損マウスの胸腺では制御性 T 細胞がほぼ消失するのと比較すると、TRAF6 欠損胸腺ストローマを移植した際の比率低下の度合いはかなり緩和されていた。

以上の結果から、胸腺上皮細胞を含む胸腺ストローマにおける TRAF6 は、制御性 T 細胞分化に寄与するものの、必須ではないことが明らかになった。

### 2-2-2 RelB 欠損マウスの胸腺における制御性 T 細胞分化

TRAF6 欠損マウスと同様に胸腺髄質上皮細胞の分化が著しく損なわれる RelB 欠損マウスにおける制御性 T 細胞の胸腺内分化も解析した。その結果、RelB 欠損マウスにおける CD4SP 胸腺細胞中の Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞の比率は、野生型の半分程度であった(図 7A)。これは統計的に有意な比率の低下であった。しかし、RelB 欠損マウスでは胸腺髄質上皮細胞がほぼ消失する<sup>13)</sup>。この胸腺髄質上皮細胞の異常の度合いと制御性 T 細胞分化異常の度合いは、TRAF6 欠損胸腺ストローマを移植した際と同様に単純な相関が無かった。さらに組織切片の免疫染色で解析を行うと、RelB 欠損マウスの胸腺髄質には UEA-1<sup>+</sup>胸腺髄質上皮細胞がほぼ存在しないにもかかわらず、Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞が局在していることが分かった(図 7B)。

以上の結果から、RelB は胸腺髄質上皮細胞の分化に必須であるが、制御性 T 細胞の分化には寄与するものの必須ではないことが明らかになった。

### 2-2-3 胎仔肝臓細胞由来の細胞における TRAF6 が制御性 T 細胞分化を誘導する

次に胸腺ストローマの調製時に除去されている、造血幹細胞由来の胸腺細胞あるいは樹状細胞における TRAF6 欠損が制御性 T 細胞分化に与える影響を解析した。野生型および TRAF6 欠損胎仔肝臓細胞を X 線照射した RAG2 欠損マウスに移植し、4~6 週間後に制御性 T 細胞分化を解析した。TRAF6 欠損胎仔肝臓細胞を移植すると、CD4SP 胸腺細胞の分化は阻害されないにもかかわらず、胸腺内の制御性 T 細胞の比率および絶対数が著しく減少した(図 8A)。胸腺髄質における Foxp3<sup>+</sup>細胞の減少は、組織切片の免疫染色でも確認された(図 8B)。また、TRAF6 欠損マウスと異なり、この胎仔肝臓細胞由来の細胞においてのみ TRAF6 を欠損するキメラマウスでは、脾臓でも制御性 T 細胞の著しい減少が見られた(図 8C)。この TRAF6 欠損キメラマウスは、移植後 8 週間まで観察しても自己免疫疾患を発症しない。また半定量的 RT-PCR によって脾臓における IL-2 と TGFβ の発現を解析した結果、TRAF6 欠損マウスの脾臓では見られた IL-2 の過剰な産生が、TRAF6 欠損キメラマウスの脾臓では見られなかった(図 8D)。

以上の結果から、胎仔肝臓細胞由来の胸腺細胞あるいは樹状細胞における TRAF6 欠損により、制御性 T 細胞の胸腺内分化異常は生じることが明らかになった。また、TRAF6 欠損マウスの脾臓における制御性 T 細胞の絶対数の回復は、激しい自己免疫反応に伴う IL-2 の過剰な産生による、末梢組織での分化誘導の促進および増殖の亢進が一因であることが示唆された。

#### 2-2-4 胸腺内の樹状細胞に TRAF6 欠損が与える影響

TRAF6 は樹状細胞の分化、活性化と成熟に必須であることが明らかになっている。Choi らのグループは、TRAF6 欠損マウスの脾臓では樹状細胞の分化に異常が見られること、そして、*in vitro* および *in vivo* で DC を刺激しても MHC class II および CD86 の発現が上昇しないことを報告した<sup>49)</sup>。樹状細胞は制御性 T 細胞の胸腺内分化に寄与することが報告されている<sup>33)</sup>。そこで、野生型および TRAF6 欠損マウスの胸腺内の樹状細胞をフローサイトメトリーと組織切片の免疫染色で解析した。

TRAF6 欠損マウスの胸腺内における CD11c<sup>+</sup>樹状細胞は、野生型と比較して比率で約 1/2、絶対数で約 1/3 であった(図 9A)。組織切片の免疫染色で樹状細胞の分布を解析すると、以前報告した通り、TRAF6 欠損マウスの胸腺でも野生型と同様に樹状細胞は髄質領域に局在していた<sup>10)</sup>。また、髄質領域の MHC class II の発現が TRAF6 欠損マウスの胸腺で著しく低下することが分かった(図 9B)。

以上の結果から、TRAF6 欠損マウスの胸腺では樹状細胞の減少や活性化の異常が見られ、制御性 T 細胞分化異常の一因となっている可能性が示唆された。

#### 2-2-5 TRAF6 は胸腺細胞内で機能して制御性 T 細胞への分化を決定する

次に胸腺細胞に内在する TRAF6 の欠損が制御性 T 細胞分化に与える影響を解析した。野生型、TRAF6 ヘテロおよび TRAF6 欠損胎仔肝臓細胞(CD45.2<sup>+</sup>)を、それぞれ congenic な野生型の胎仔肝臓細胞(CD45.1<sup>+</sup>)と混合し、X 線を照射した RAG2 欠損マウスに移植した。CD45.1<sup>+</sup>の野生型の胎仔肝臓細胞を混合することにより、正常な樹状細胞や胸腺細胞が存在する胸腺環境内における、TRAF6 欠損胎仔肝臓細胞由来の制御性 T 細胞分化を解析することができる。移植 4~6 週間後に胸腺内の野生型、TRAF6 ヘテロおよび TRAF6 欠損胎仔肝臓細胞由来の制御性 T 細胞をフローサイトメトリーにより解析した。野生型同士あるいは野生型と TRAF6 ヘテロの胎仔肝臓細胞を混合して移植した際には、いずれの由来の制御性 T 細胞も同程度の比率で分化した。しかし、congenic な野生型と TRAF6 欠損胎仔肝臓細胞を混合して移植した際には、CD45.1<sup>+</sup>の野生型の制御性 T 細胞が正常に分化できる胸腺環境でも、CD45.1<sup>-</sup> (CD45.2<sup>+</sup>)の TRAF6 を欠損する制御性 T 細胞の分化は著しく損なわれた(図 10A)。また、脾臓でも TRAF6 を欠損する CD45.1<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞の比率は著しく低下していた(図 10B)。

以上の結果から、胸腺上皮細胞や樹状細胞による抗原提示や、胸腺細胞からのサイトカイン産生などが正常な胸腺環境であっても、胸腺細胞内で TRAF6 を欠損すると制御

性 T 細胞への分化は著しく阻害されることが判明した。したがって、TRAF6 は胸腺細胞内で機能して制御性 T 細胞分化を誘導することが明らかになった。

## 2-2-6 考察 (2-2)

### 2-2-6-1 制御性 T 細胞分化における胸腺髄質上皮細胞の寄与

TRAF6 欠損マウスの胸腺では、Aire<sup>+</sup>胸腺髄質上皮細胞の著しい分化異常が生じる。Klein らのグループは、Aire promoter の下流で HA を発現するトランスジェニックマウスを作製した<sup>32)</sup>。Aire は胸腺髄質上皮細胞に特異的に発現するため、このマウスでは Aire<sup>+</sup>胸腺髄質上皮細胞が HA を発現する。このマウスを、HA を認識する TCR をもつトランスジェニックマウスと掛け合わせると Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞が効率よく選択されることから、胸腺髄質上皮細胞は Aire 依存的に自己抗原特異的な制御性 T 細胞を選択すると考えられた。したがって、TRAF6 欠損によるこの細胞の異常が制御性 T 細胞分化異常の原因ではないかと考えた。しかし、胸腺髄質上皮細胞を含む胸腺ストローマのみで TRAF6 を欠損しても、制御性 T 細胞はある程度産生された(図 6B)。さらに胸腺髄質上皮細胞がほぼ消失する RelB 欠損マウスの胸腺髄質においても、制御性 T 細胞は確認された(図 7)。また、最近胸腺皮質のみに MHC class II を発現するマウスの胸腺でも制御性 T 細胞が分化し、髄質に局在することが報告されている<sup>57)</sup>。これらの結果から、胸腺髄質上皮細胞は制御性 T 細胞分化に寄与するが必須とは言えず、制御性 T 細胞のレパトアの一部を選択している可能性が示唆された。

### 2-2-6-2 「胸腺細胞」内の TRAF6 が制御性 T 細胞分化を誘導する

渡部らはヒトの胸腺に存在するハッサル小体では thymic stromal lymphopoietin (TSLP)が発現しており、TSLP によって活性化した樹状細胞が *in vitro* で制御性 T 細胞分化を効率よく誘導することを報告した<sup>33)</sup>。また、末梢組織から胸腺内に移入してきた CD11c<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>Sirpα<sup>+</sup>樹状細胞が、制御性 T 細胞の分化誘導能が高いことも最近報告されている<sup>58)</sup>。樹状細胞における TRAF6 欠損が制御性 T 細胞分化に与える影響は未だ明らかではなく、今後の課題である。しかし、mixed fetal liver chimera の正常な樹状細胞が存在する胸腺環境であったとしても、胸腺細胞内で TRAF6 を欠損するだけで制御性 T 細胞分化は著しく損なわれた(図 10A)。これは胸腺細胞内の TRAF6 が制御性 T 細胞分化に決定的な役割を果たしていることを明確に示している。したがって、これ以降は胸腺細胞内における TRAF6 の機能に焦点を当てて解析を進めた。



### 2-2-6-3 TRAF6 欠損マウスにおける激しい自己免疫疾患の原因

TRAF6 欠損マウスは激しい自己免疫疾患を発症する。TRAF6 欠損胸腺ストローマをヌードマウスに移植すると、移植先のヌードマウスで自己免疫が誘導される。これは自己免疫疾患の発症には、胸腺髄質上皮細胞を含む胸腺ストローマにおける TRAF6 欠損で十分であることを示している。TRAF6 欠損により、胸腺内に存在する抗原提示細胞である胸腺髄質上皮細胞の分化異常が生じる。この細胞は自己反応性 T 細胞の除去に必須であるため、胸腺髄質上皮細胞の異常が激しい自己免疫疾患の原因の一つと考えられる<sup>10)</sup>。

制御性 T 細胞の異常も自己免疫疾患の直接の原因となる。現在のところ、TRAF6 欠損マウスが発症する自己免疫疾患に、制御性 T 細胞の異常がどの程度寄与しているかは不明である。TRAF6 欠損ストローマを移植したヌードマウスでは制御性 T 細胞がある程度産生されているにも関わらず、自己免疫疾患を発症する。しかし、異常な胸腺環境で選択された制御性 T 細胞が、機能的に正常であるかは明らかではない。

TRAF6 欠損マウスの末梢組織には野生型と匹敵する数の制御性 T 細胞が存在し、TGFβによる iT<sub>reg</sub> の誘導も起きていると考えられる。しかし、異常な胸腺環境から産生された、あるいは激しい自己免疫反応の起きている末梢組織で誘導されたこの TRAF6 を欠損する制御性 T 細胞が、正常な免疫反応の抑制機能を持っているかは明らかではない。今後 *in vitro* あるいは *in vivo* の実験系で、制御性 T 細胞の免疫反応抑制能に TRAF6 欠損が与える影響を解析する必要がある。

### 2-3 胸腺細胞で制御性 T 細胞への分化を誘導する TRAF6 シグナルの上流の受容体と細胞内シグナル伝達機構の解明

TRAF6 はシグナル伝達分子であるため、胸腺細胞上に発現するいずれかの受容体の下流で機能して制御性 T 細胞分化を誘導しているはずである。胸腺内の制御性 T 細胞分化には様々な受容体からのシグナルが必要である。これまでに必須であることが明らかになっているサイトカインシグナルは、common gamma chain ( $\gamma c$ )を介した IL-2、IL-7 や IL-15 などのシグナル<sup>59)</sup>、そして TGF $\beta$ シグナルである<sup>56)</sup>。また、制御性 T 細胞の胸腺内分化には TCR と MHC の相互作用が必須である<sup>26)</sup>。最近の報告から、制御性 T 細胞の胸腺内分化は 2 つのステップに分かれており、それぞれの段階で依存する受容体が異なることが明らかになっている。まず TCR と MHC の相互作用依存的に、制御性 T 細胞の前駆細胞と考えられる CD4SP CD25<sup>high</sup>GITR<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup>胸腺細胞が産生される<sup>60)</sup>。そしてこの前駆細胞が IL-2 などのサイトカインシグナルを受容することで Foxp3 を安定に発現し、分化が完了すると考えられている<sup>60)61)</sup>(図 11A)。野生型、TRAF6 ヘテロおよび TRAF6 欠損マウスの胸腺内における CD4SP Foxp3<sup>+</sup>胸腺細胞中の CD25<sup>high</sup>GITR<sup>high</sup>胸腺細胞の比率をフローサイトメトリーにより解析した。その結果、TRAF6 欠損マウスの胸腺では、TCR と MHC の相互作用依存的に産生されるこの前駆細胞の時点で既に大幅な比率の低下が見られた(図 11B)。また、これまでに T cell line の Jurkat 細胞<sup>62)63)64)</sup>および末梢の T 細胞<sup>50)</sup>を用いた解析により、T 細胞内の TRAF6 が TCR の下流で機能することが報告されている。これらの事実から、TRAF6 が胸腺細胞上に発現する TCR の下流でシグナルを制御することで、制御性 T 細胞分化を誘導していることが強く示唆される。

#### 2-3-1 TRAF6 による TCR シグナルの制御

胸腺細胞上に発現する TCR の下流では NF- $\kappa$ B、MAP kinase、Ca<sup>2+</sup>、Akt など様々な経路が活性化し、胸腺内における細胞生死の運命決定がなされる(図 12)。 $\alpha\beta$ 型の TCR は DP 胸腺細胞の段階で完成し、シグナルを受容することが可能になる。野生型、TRAF6 欠損マウス共に胸腺細胞全体のうち 85%以上が制御性 T 細胞へと分化する可能性を持つ未熟な DP 胸腺細胞である。そこで胸腺細胞全体を Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA)/ionomycin および抗 CD3/CD28 抗体で刺激し、TCR を *in vitro* で刺激した際に活性化する種々のシグナルについて、その TRAF6 依存性を解析した。刺激前の細胞の状態を揃えるため、調製後の胸腺細胞はインキュベーター内で 3 時間以上培養して rest させた後に刺激した。

### 2-3-1-1 PMA/ionomycin 刺激によって誘導されるシグナルの TRAF6 依存性

PMA/ionomycin による刺激後に細胞を回収し、ウェスタンブロッティングにより解析した。PMA と ionomycin による刺激は、TCR の下流で活性化するシグナルのうち、DAG と  $\text{Ca}^{2+}$  のシグナルを活性化する。TRAF6 欠損胸腺細胞では、 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  の分解、そして p38 と JNK のリン酸化が著しく損なわれた。一方で extracellular signal-regulated kinase (ERK) のリン酸化は TRAF6 欠損により影響を受けなかった(図 13)。TCR 下流の Ras-ERK 経路は胸腺細胞の positive selection を誘導し、CD4SP 胸腺細胞の分化に必須である<sup>65)</sup>。これは TRAF6 欠損マウスの胸腺でも CD4SP 胸腺細胞の分化は阻害されないことと対応すると考えられる。

以上の結果から、PMA と ionomycin 刺激によって活性化するシグナルの一部は TRAF6 に依存していることが判明した。したがって、TRAF6 は胸腺細胞上に発現する TCR の下流でもシグナルを制御することが示唆された。

### 2-3-1-2 TCR 刺激によって誘導されるシグナルの TRAF6 依存性

次に抗 CD3/CD28 抗体で胸腺細胞を刺激し、 $\text{Ca}^{2+}$  の流入および  $\text{PLC}\gamma 1$  のリン酸化を解析した。その結果、TRAF6 欠損胸腺細胞でも TCR 刺激依存的に  $\text{Ca}^{2+}$  が流入し(図 14A)、 $\text{PLC}\gamma 1$  もリン酸化された(図 14B)。これら 2 つの経路は制御性 T 細胞分化に必要であることが報告されているが<sup>66)67)</sup>、TRAF6 欠損がこの経路には与える影響は少ないことが示唆された。

TCR 刺激によって誘導される  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  のリン酸化を刺激後 15 分まで解析すると、TRAF6 欠損胸腺細胞ではリン酸化がほぼ検出されなかった(図 15A)。また、TRAF6 欠損胎仔肝臓細胞を RAG2 欠損マウスに移植したキメラマウスから調製した胸腺細胞でも、10 分間の TCR 刺激による NF- $\kappa\text{B}$  の活性化に異常が見られた(図 15B)。この TRAF6 欠損キメラマウスは、移植 8 週間後までは自己免疫疾患を発症していない。また、胸腺には UEA-1 陽性の成熟した胸腺髄質上皮細胞が存在する。したがって、自己免疫や異常な胸腺環境などの外的な要因ではなく、胸腺細胞内の TRAF6 欠損によって NF- $\kappa\text{B}$  活性化の異常が生じていることが示唆された。一方で、 $\text{TNF}\alpha$  で刺激した場合には、TRAF6 欠損胸腺細胞でも野生型と同程度の NF- $\kappa\text{B}$  活性化が検出された(図 15C)。したがって、TRAF6 欠損胸腺細胞では IKK complex などの NF- $\kappa\text{B}$  活性化に必須な因子に異常があるわけではないことが分かった。そして、TRAF6 による NF- $\kappa\text{B}$  の活性化には受容体の特異性があり、TRAF6 は TCR の下流で NF- $\kappa\text{B}$  の活性化を制御することが判明した。

TCR 刺激によって誘導される p38 と JNK のリン酸化は、TRAF6 欠損胸腺細胞で減弱していた(図 16A、B)。p38 と JNK の活性化は胸腺細胞の negative selection への関与が報

告されており<sup>68)</sup>、TRAF6 欠損胸腺細胞における negative selection の異常の可能性が示唆された。一方で、Akt と ERK のリン酸化は TRAF6 欠損によりやや亢進していた(図 16C)。TRAF6 を T 細胞特異的に欠損させたマウスの末梢の T 細胞では、Akt が恒常的に活性化していることが報告されている<sup>50)</sup>。したがって、胸腺細胞内においても TRAF6 は Akt の活性化を負に制御していることが示唆された。

以上の結果から、胸腺細胞における TRAF6 欠損が TCR シグナルに与える影響をまとめると、表 1 のようになった。TCR の刺激によって誘導される  $\text{Ca}^{2+}$  の流入と PLC $\gamma$ 1 のリン酸化は TRAF6 欠損による影響は少なく、NF- $\kappa$ B、JNK、p38 のシグナルは TRAF6 欠損によってその活性化が阻害され、Akt と ERK は活性化がやや亢進した。

これまでに NF- $\kappa$ B の活性化と Akt の抑制は制御性 T 細胞分化を誘導することが報告されている<sup>69)</sup>。したがって、このような TCR シグナルの TRAF6 依存的な調節により、制御性 T 細胞の胸腺内分化は決定されることが示唆された。

### 2-3-2 TCR 下流で活性化する NF- $\kappa$ B の TRAF6 による時間的制御

TCR 下流の NF- $\kappa$ B の活性化には、CARMA1-BCL10-MALT1 (CBM) complex が必須である<sup>70)71)72)73)</sup>。また、CARMA1 変異マウス<sup>74)</sup>、CARMA1 欠損マウス<sup>75)</sup>と BCL10 欠損マウス<sup>76)</sup>は、TRAF6 欠損マウスと同様に、胸腺内の制御性 T 細胞がほぼ消失する。さらに、TRAF6 は MALT1 に結合して TCR 下流の NF- $\kappa$ B の活性化を誘導することが、T cell line である Jurkat 細胞を用いて示されている<sup>62)64)</sup>。したがって、TCR の下流で TCR-CBM complex-TRAF6-NF- $\kappa$ B という経路が活性化することで、制御性 T 細胞の胸腺内分化が決定されることが示唆される。

しかし、このモデルでは説明できない事象が存在する。TCR 下流の NF- $\kappa$ B 活性化は細胞増殖にも必須であり、CARMA1、BCL10 あるいは MALT1 を欠損する T 細胞は、TCR を刺激しても増殖しない<sup>70)72)</sup>。TRAF6 も CBM complex と同様に TCR の下流で NF- $\kappa$ B の活性化を制御する。それにもかかわらず、TRAF6 欠損 CD4SP 胸腺細胞の TCR を 48 時間刺激すると、増殖が野生型よりも亢進する<sup>77)</sup>。さらに、TCR を 24 時間刺激後に核抽出液を回収して核内の NF- $\kappa$ B を解析すると、TRAF6 欠損 CD4SP 胸腺細胞でも RelA、c-Rel、p50 はいずれも野生型と同程度に核移行していた(図 17)。これらの結果から、TRAF6 は TCR 刺激によって誘導される細胞増殖と、持続的な NF- $\kappa$ B の活性化には必要ないことが示唆された。

短時間 TCR を刺激した際の NF- $\kappa$ B の活性化は TRAF6 に依存するのに対し、長時間刺激した際の活性化は TRAF6 に依存しなかった。これらの結果から、TRAF6 は単純に NF- $\kappa$ B の活性化を誘導するわけではなく、TCR 下流の NF- $\kappa$ B 活性化は、TRAF6 依存的な早い経路と非依存的な遅い経路に分かれるという仮説を立て、より詳細な解析を行った。

TCR を 3 時間まで刺激して細胞質における I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化をウェスタンブロッティングで解析した。刺激後 15 分で野生型では非常に強いリン酸化が検出されたが、TRAF6 欠損胸腺細胞ではまったく検出されなかった。しかし、刺激後 30 分以降では TRAF6 欠損胸腺細胞でもリン酸化が検出され、そして持続することが分かった。I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化を定量すると、30 分以降のリン酸化は TRAF6 欠損胸腺細胞で弱いものの、活性化の kinetics は野生型と類似していた(図 18A)。また、PMA/ionomycin で刺激した際にも、刺激後 15 分で野生型では見られる非常に強い I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化が、TRAF6 欠損胸腺細胞では検出されなかった。一方で、30 分以降では TRAF6 欠損胸腺細胞でも弱いリン酸化が検出され、45 から 60 分にかけては I $\kappa$ B $\alpha$  の分解も見られた(図 18B)。

以上の結果から、TRAF6 は TCR 下流の NF- $\kappa$ B の活性化に必須ではなく、その迅速な活性化を誘導するために必要であることが示唆された。したがって、TCR 下流の NF- $\kappa$ B の活性化は、TRAF6 依存性により非常に早い経路と遅い持続的な経路に分かれることが判明した。

### 2-3-3 TRAF6 による c-Rel と RelA の活性化制御

NF- $\kappa$ B family のうち p50 ではなく、c-Rel と RelA が制御性 T 細胞の胸腺内分化を誘導することが複数のグループから報告された<sup>78)79)</sup>。そこで胸腺細胞内の c-Rel と RelA の活性化に TRAF6 欠損が与える影響を解析した。抗 CD3/CD28 抗体および PMA/ionomycin で胸腺細胞を刺激後に核抽出液を回収し、c-Rel と RelA の核移行をウェスタンブロッティングにより解析した。その結果、野生型では TCR 刺激後 30 から 45 分にかけて c-Rel と RelA の核移行が検出された。一方で TRAF6 欠損胸腺細胞では、そのような NF- $\kappa$ B の迅速な核移行が著しく損なわれていた(図 19A)。また、PMA/ionomycin で刺激した際にも、TRAF6 欠損胸腺細胞で c-Rel と RelA の迅速な核移行が阻害されていた。さらに、c-Rel は 60 分以降、RelA は刺激後 45 から 60 分にかけて、TRAF6 欠損胸腺細胞でもはっきりとした核移行が検出された(図 19B)。これは 2-3-2 で TRAF6 欠損胸腺細胞でも刺激の後期段階で見られた細胞質における I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化と分解を反映しているものと考えられる(図 18B)。

以上の結果から、TRAF6 は TCR の下流で c-Rel と RelA の迅速な核移行を誘導するために必要であることが示唆された。そして TRAF6 欠損胸腺細胞では持続的な後期の NF- $\kappa$ B の活性化が起きても制御性 T 細胞分化が阻害されることから、この TRAF6 依存的な迅速な NF- $\kappa$ B の活性化が制御性 T 細胞分化に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

## 2-3-4 考察 (2-3)

### 2-3-4-1 制御性 T 細胞の前駆細胞は TRAF6 依存的に産生される

Hsieh らのグループは、胸腺内に存在する CD4SP CD25<sup>high</sup> GITR<sup>high</sup> Foxp3<sup>-</sup>胸腺細胞の中には制御性 T 細胞の前駆細胞が濃縮されていることを報告した<sup>60)</sup> (図 11A)。この集団は CD69<sup>high</sup> HSA<sup>high</sup> という TCR から刺激が入って間もない胸腺細胞の表現型を示す。この集団を MHC class II 欠損マウスに移植して TCR から刺激が入らない *in vivo* の環境においても、一部の細胞が Foxp3 を発現するようになる。また、この集団を *in vitro* において IL-2 で刺激するだけで Foxp3 の発現が誘導される。さらにこの集団は Foxp3<sup>+</sup>胸腺細胞と TCR のレパトアの重なる部分が多い。これらの結果から、この前駆細胞は制御性 T 細胞への分化に必要な TCR シグナルが既に入った細胞であり、 $\gamma$ c から STAT5 を活性化するシグナルが入れば、Foxp3 を安定に発現して制御性 T 細胞分化が完了する状態になっていると考えられる。

TRAF6 欠損マウスではこの前駆細胞がほぼ消失することから(図 11B)、制御性 T 細胞への分化に必要な「TCR シグナル」が入らない状態になっていることが強く示唆される。さらに、これまでにこの前駆細胞が大幅に減少するマウスとして、CARMA1 欠損マウス<sup>75)</sup>と c-Rel 欠損マウス<sup>80)</sup>が報告されている。これは TCR-CBM complex-TRAF6-NF- $\kappa$ B (c-Rel) という経路の活性化がこの前駆細胞の分化には必須であり、このシグナルが制御性 T 細胞という lineage への分化を決定することを強く示唆している。

### 2-3-4-2 CD4SP Foxp3<sup>-</sup>胸腺細胞と Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞の分化を分けるシグナル

TRAF6 欠損マウスの胸腺では CD4SP Foxp3<sup>-</sup>胸腺細胞の分化は阻害されないにもかかわらず、CD4SP Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞の分化は著しく阻害される。*in vitro* の刺激実験で得られた結果と過去の報告をもとに、positive selection、negative selection、そして制御性 T 細胞分化を誘導するシグナルにおける TRAF6 の寄与についてまとめる。

TCR から刺激が入ると、TCR/CD3 complex 近傍の LAT がリン酸化される。この LAT のリン酸化部位に PLC $\gamma$ 1 が結合する。そして、活性化した PLC $\gamma$ 1 が IP3 および DAG を産生し、それぞれ Ca<sup>2+</sup>シグナルの活性化と ERK などの MAP kinase 経路の活性化を誘導する。これらのシグナルが胸腺細胞の positive selection を誘導し、DP 胸腺細胞から CD4SP、CD8SP 胸腺細胞へ分化する。Ca<sup>2+</sup>シグナルおよび ERK の経路に関する分子群を欠損するマウスでは CD4SP 胸腺細胞の分化が阻害される<sup>81)82)</sup>。TRAF6 欠損胸腺細胞では PLC $\gamma$ 1 と ERK のリン酸化、および Ca<sup>2+</sup>の流入は阻害されていない(図 13、14、16C)。これは TRAF6 欠損マウスの胸腺でも CD4SP 胸腺細胞の分化が阻害されないことと相関があると考えられる(図 4A)。

一方、アダプター分子 Grb2 は LAT のリン酸化に応答して p38 と JNK の活性化を誘導する<sup>68)</sup>。p38 と JNK はこれまでに様々な解析系で negative selection への関与が示唆されている。内在性の superantigen を認識する TCRV $\beta$ 陽性細胞の比率を解析し、TRAF6 欠損が negative selection に与える影響を解析した。その結果、BALB/c バックグラウンドの TRAF6 欠損マウスで一部の V $\beta$ 陽性細胞の比率が有意に高く、negative selection の異常が確認された(図 20)。TRAF6 欠損マウスの胸腺では抗原提示細胞である胸腺上皮細胞や樹状細胞の異常も生じる。したがって、TRAF6 欠損による胸腺細胞内のこれらのシグナル異常が negative selection の異常に繋がっているかを確定するには、TCR トランスジェニックマウスなどを用いた更なる解析が必要である。

様々な遺伝子欠損マウスの解析から、制御性 T 細胞の胸腺内分化には TCR の下流で活性化する PKC $\theta$ —CBM complex—NF- $\kappa$ B、Ca<sup>2+</sup>—NFAT、PI3K—Akt—Foxo の経路が重要であることが明らかになっている<sup>83)</sup>。TCR 下流の NF- $\kappa$ B 活性化を誘導する PKC $\theta$ <sup>76)</sup>、CARMA1<sup>74)75)</sup>、BCL10<sup>76)</sup>、TAK1<sup>84)85)</sup>、IKK $\beta$ <sup>86)</sup>、さらに、NF- $\kappa$ B family である c-Rel<sup>78)79)</sup>の欠損は、CD4SP 胸腺細胞の分化は阻害しないにもかかわらず、胸腺内の制御性 T 細胞の大幅な減少に繋がる。また、小胞体に局在する Ca<sup>2+</sup>センサーSTIM1、STIM2 の両方を T 細胞で欠損すると制御性 T 細胞の胸腺内分化が著しく損なわれる<sup>67)</sup>。さらに、Akt の過剰な活性化が制御性 T 細胞分化を抑制することが報告され<sup>87)88)89)</sup>、その下流の転写因子として Foxo1 と Foxo3a が関与することが示唆されている<sup>90)91)</sup>。

これらのシグナルのうち、TRAF6 は NF- $\kappa$ B を活性化し、Akt を抑制する(図 15、16)。これらのシグナルの TRAF6 依存的な調節により、制御性 T 細胞の胸腺内分化は誘導されることが示唆された。

#### 2-3-4-3 TRAF6 欠損による NF- $\kappa$ B および Akt シグナルの異常が制御性 T 細胞分化異常の原因か？

TRAF6 欠損胸腺細胞を用いた *in vitro* における刺激実験の結果、TRAF6 欠損マウスの胸腺内における制御性 T 細胞分化異常の原因となっているシグナルの候補として、TCR 下流の NF- $\kappa$ B と Akt の経路が挙げられた。しかし、実際にこれらの経路の異常が原因であるかは明らかではない。それを証明するためには、TRAF6 欠損胸腺細胞でこれらのシグナルを正常に戻した時に、制御性 T 細胞分化が回復するかを検証しなければならない。

NF- $\kappa$ B の活性化を誘導する手法として、恒常的活性化型の IKK $\beta$ を導入する方法が可能である。TCR 下流で NF- $\kappa$ B 活性化を誘導するシグナルにおいて TRAF6 の上流と考えられる CARMA1 欠損マウス、下流と考えられる TAK1 を T 細胞特異的に欠損するマウスで

は、共に胸腺内の制御性 T 細胞がほぼ消失する。これらのマウスは、T 細胞特異的に恒常的活性化型の IKK $\beta$ を発現するマウスと掛け合わせることで、制御性 T 細胞分化が回復することが報告されている<sup>92)</sup>。本研究からは TCR 下流の非常に早い NF- $\kappa$ B の活性化が重要であることが示唆されるが、恒常的活性化型の IKK $\beta$ の導入により、この TRAF6 依存的な初期の活性化も含めて活性化されると予想される。したがって、TRAF6 欠損マウスも同様に、NF- $\kappa$ B を強制的に活性化することで制御性 T 細胞分化が回復する可能性が高いと考えられる。

TRAF6 欠損胸腺細胞における Akt の過剰な活性化を抑制する手法としては、PI3K-Akt 経路を抑制する PTEN を導入する、あるいはこの経路を抑制する薬剤の使用が可能である。Ly290042 や Rapamycin などの PI3K-Akt 阻害剤の存在下で胎仔胸腺器官培養を行い、TRAF6 欠損胎仔胸腺で制御性 T 細胞分化が回復すれば、この経路の過剰な活性化が制御性 T 細胞分化異常の原因であるという仮説を支持する証拠となる。

Akt の下流で制御され、制御性 T 細胞分化を誘導すると考えられている転写因子が Foxo1 と Foxo3a である。転写因子 Foxo の活性化は Akt によるリン酸化で制御される。Foxo は Akt によってリン酸化されることで核外へ移行し、不活性化される。したがって、Akt の過剰な活性化は Foxo の不活性化を誘導する。Akt の活性化が促進されているマウスでは制御性 T 細胞の分化が阻害され<sup>87)88)89)</sup>、Foxo のリン酸化も亢進されていた<sup>90)</sup>。また、T 細胞特異的な Foxo1 と Foxo3a の二重欠損マウスは制御性 T 細胞分化に異常が生じる<sup>91)</sup>。さらに、Foxo1 と Foxo3a は Foxp3 の発現を直接制御することが示されている<sup>90)91)</sup>。したがって、今後 TRAF6 欠損胸腺細胞で Foxo1 と Foxo3a の活性化に異常が見られるかを解析し、TCR 下流の Akt-Foxo 経路における TRAF6 の寄与を検討する必要がある。

#### 2-3-4-4 TRAF6 による TCR 下流の NF- $\kappa$ B 活性化制御機構

TRAF6 は TCR の下流で NF- $\kappa$ B の活性化を誘導する。しかし、その機能は NF- $\kappa$ B の活性化に必須な CBM complex などとは大きく異なる。TCR 刺激後の迅速な NF- $\kappa$ B の活性化は、TRAF6 依存性が非常に高い。一方で後期の持続的な NF- $\kappa$ B の活性化は、TRAF6 依存性が比較的低い。野生型と TRAF6 欠損胸腺細胞で I $\kappa$ B $\alpha$ リン酸化の kinetics を比較すると、TRAF6 欠損胸腺細胞で単純に全体的な活性化が下がるわけではなく、初期と後期で TRAF6 の依存性が異なると考えられる(図 18A)。TCR 下流の NF- $\kappa$ B 活性化は 2 つの経路に分かれるという明確なモデルは示されていないが、胸腺細胞の TCR 下流で同様な NF- $\kappa$ B の制御を行う分子として Ubc13 が報告されている<sup>93)</sup>。Ubc13 はユビキチン結合酵素(E2)であり、TRAF6がユビキチン転移酵素(E3)として K63型のユビキチン化を行う際に一緒に機能する。したがって、TCR 下流の NF- $\kappa$ B の迅速な活性化はこれらの分子が担っていることが示唆された。CBM complex の構成因子を欠損する T 細胞は TCR 刺激による増殖が起きないが、



TRAF6 を欠損する T 細胞は増殖が亢進する。したがって、TCR 刺激によって誘導される細胞増殖には後期の持続的な NF- $\kappa$ B の活性化で十分であることが示唆された。さらに、TRAF6 欠損による IL-2 シグナルの亢進などにより<sup>77)</sup>、野生型よりも増殖が促進されることが示唆された。

NF- $\kappa$ B family のうち、c-Rel と RelA は Foxp3 の発現を直接制御することが示されている。Rudensky らのグループは、c-Rel が *Foxp3* 遺伝子座の exon1 の直後に存在する conserved non-coding sequence (CNS) に結合することを報告している<sup>94)</sup>。まだ Foxp3 を発現していない制御性 T 細胞の前駆細胞の段階では、この領域だけが permissive なクロマチン修飾を受けている。したがって、この領域が制御性 T 細胞分化の”pioneer element”であり、この領域に結合する c-Rel が Foxp3 の転写を誘導する際に最初に機能する転写因子である可能性が示唆されている。また、Ghosh らのグループは CNS のうちの、T<sub>reg</sub>-specific demethylation region (TSDR) と名付けられた領域に、TCR 刺激依存的に c-Rel が結合することを報告している<sup>92)</sup>。さらに、Chen らのグループは c-Rel と RelA が Foxp3 プロモーターで、転写因子 NFAT、Smad、CREB を含む制御性 T 細胞特異的な”enhanceosome”の形成を誘導して転写を活性化するモデルを提唱している<sup>95)</sup>。

これらの報告から、TCR 下流の c-Rel の活性化が制御性 T 細胞分化に重要であることは明らかである。また、RelA の活性化も制御性 T 細胞分化に寄与する可能性が示唆される。TRAF6 欠損胸腺細胞では、TCR 依存的な c-Rel と RelA の迅速な核移行が阻害されている。T 細胞では c-Rel と結合して核移行を阻害している I $\kappa$ B $\beta$ <sup>96)</sup>の PMA/ionomycin 刺激による分解も、TRAF6 欠損により阻害された(図 18B)。TCR を長時間刺激した際には TRAF6 欠損 CD4SP 胸腺細胞でも c-Rel と RelA は核移行するが、TRAF6 欠損胸腺細胞からの制御性 T 細胞分化は著しく損なわれる。これらの結果から、TRAF6 依存性の低い後期の c-Rel と RelA の活性化は制御性 T 細胞分化に十分ではなく、TRAF6 依存的な迅速な c-Rel と RelA の活性化が必要である可能性が示唆された。

## 2-3-4-5 TCR 刺激により TRAF6 依存的に迅速に活性化する NF- $\kappa$ B の生理学的意義

本研究により得られた結果から、TCR 下流の NF- $\kappa$ B 活性化は、TRAF6 依存性の非常に高い迅速な活性化経路と、TRAF6 依存性の比較的低い後期の活性化経路に分かれることが判明した。CARMA1 欠損マウスと c-Rel 欠損マウスは、TRAF6 欠損マウスと同様に制御性 T 細胞の前駆細胞がほぼ消失する<sup>75)80)</sup>。NF- $\kappa$ B の活性化に必須な分子を欠損するマウスと TRAF6 欠損マウスは、制御性 T 細胞の胸腺内分化異常に関して非常に良く似た表現型を示すことから、TRAF6 依存的な迅速な NF- $\kappa$ B の活性化が、制御性 T 細胞の胸腺内分化に重要な役割を果たしていることが示唆される。

TCR 刺激により TRAF6 依存的に迅速に活性化する NF- $\kappa$ B の制御性 T 細胞分化への寄与、および生理学的意義を示す 1 つの方法として、その標的遺伝子を同定することが挙げられる。T 細胞は胸腺内で受容した TCR からのシグナルに応じて細胞生死の運命決定を受ける。制御性 T 細胞も同様の過程を経て選択される。したがって、制御性 T 細胞の生存、あるいは細胞死に関与する遺伝子が標的となっている可能性が考えられる。また、CD25 は NF- $\kappa$ B の標的として知られている。CD25 は制御性 T 細胞の前駆細胞で発現が高く、IL-2 のシグナルを効率よく受容して制御性 T 細胞分化を完了するために必要とされている<sup>60)</sup>。したがって、CD25 が初期の NF- $\kappa$ B の標的として誘導されることで制御性 T 細胞分化に寄与する可能性がある。

現在 TCR 刺激により TRAF6 依存的に迅速に活性化する NF- $\kappa$ B の標的遺伝子を同定するため、野生型と TRAF6 欠損胸腺細胞の TCR を 30 分、180 分刺激したサンプルから RNA を回収してマイクロアレイ解析を行っている。同定された遺伝子の制御性 T 細胞分化への寄与が証明されることで、この TRAF6 依存的な迅速な NF- $\kappa$ B 活性化経路の生理学的意義が解明されることが期待される。

#### 2-3-4-6 TRAF6 依存性の低い後期の NF- $\kappa$ B 活性化機構

TCR 刺激によって活性化する NF- $\kappa$ B のうち、TRAF6 依存性の比較的低い後期の活性化は、細胞増殖には十分であることが示唆された。しかし、この後期の活性化がどのような機構で誘導されているかは未だ明らかではない。

TCR の下流では TRAF6 以外に TRAF2 も機能して NF- $\kappa$ B の活性化に寄与することが報告されている<sup>62)</sup>。したがって、迅速な活性化は TRAF6、後期の活性化は他の TRAF family によって担われている可能性がある。これを検証するには、初期と後期で TCR complex に含まれる TRAF family の違いを解析する必要がある。

また、このモデルと類似したメカニズムで活性化するシグナルとして、Toll-like receptor 4 (TLR4) のシグナルが報告されている<sup>97)</sup>。TLR4 は lipopolysaccharide (LPS) の刺激を受けると endocytosis によって internalization する。TLR4 は、細胞表面上においては TIR domain-containing adaptor protein (TIRAP)–Myeloid differentiation factor 88 (MyD88)–TRAF6 という経路が活性化して初期の NF- $\kappa$ B や MAPK の活性化が誘導される。一方で internalization した TLR4 の下流においては、TRIF-related adaptor molecule (TRAM)–TIR domain-containing adaptor inducing interferon (IFN)- $\beta$  (TRIF)–TRAF3 という経路も機能し、IFN- $\beta$  の産生が誘導されることが明らかになっている<sup>98)</sup>。TCR も刺激依存的に endocytosis によって internalization することが報告されていることから<sup>99)100)</sup>、TLR4 と類似したメカニズムで細胞表面と細胞内で機能する TRAF family が使い分けられている可能性も考えられる。この可能性を検証するには、プレート上に結合させた抗体で刺激を入れる、あるいは

dynamin 阻害剤存在下で刺激するなど、endocytosis を阻害した状態で刺激することが必要である。

上記の機構以外にも、初期の NF- $\kappa$ B 活性化によって誘導されたサイトカインなどによって、後期の活性化が誘導される可能性も考えられる。それがタンパク質合成を介するものであれば、タンパク質合成阻害剤の cycloheximide (CHX)などの存在下で TCR 刺激を行うことで検証可能である。また、すでに細胞内に存在するサイトカインが刺激依存的にタンパク質合成を介さずに分泌され、後期の活性化を誘導する可能性も考えられる。刺激後早い段階で分泌されるサイトカインを特定することができれば、中和抗体を用いてブロックすることでこの可能性を検証することができる。

#### 2-3-4-7 TCR 下流の NF- $\kappa$ B 活性化における TRAF6 の寄与に関する過去の相違

T cell line である Jurkat 細胞を用いた実験系では、TRAF6 が TCR 下流の NF- $\kappa$ B 活性化を正に制御することが報告されている。Chen らのグループと Krappmann らのグループは、TRAF6 が TCR の下流で MALT1 に結合してユビキチン転移酵素(E3)として機能することで NF- $\kappa$ B の活性化を誘導することを証明した<sup>62)64)</sup>。また、Lenardo らのグループは、TRAF6 が Caspase8 のアダプターとして機能して NF- $\kappa$ B を活性化することを報告した<sup>63)</sup>。これら3つのいずれの論文でも siRNA を用いて TRAF6 をノックダウンすると、TCR 刺激依存的な NF- $\kappa$ B の活性化が減弱することを報告している。

一方で、Choi らのグループは T 細胞特異的に TRAF6 を欠損したマウス(TRAF6- $\Delta$ T)を作製し、TCR 刺激によって誘導される NF- $\kappa$ B の活性化を解析した<sup>50)</sup>。胸腺細胞を用いた解析では、抗 CD3/CD28 抗体と PMA/ionomycin による刺激後に Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA)を行い、TRAF6- $\Delta$ T の胸腺細胞でも野生型と同程度の活性化が起きることを報告した。この論文では TCR 刺激によって誘導される NF- $\kappa$ B の活性化に TRAF6 は必要ないと結論され、生体内では他の TRAF family によってその機能が補われている可能性が示唆されていた。

TCR 下流の NF- $\kappa$ B 活性化への TRAF6 の寄与について、T cell line と primary の T 細胞の間でこのような矛盾が生じている原因は未だ解明されていない。本研究によって TCR 下流の NF- $\kappa$ B 活性化は、TRAF6 依存性の異なる2つの経路に分かれるという新たな知見が得られた。過去の Jurkat 細胞を用いた実験系では TCR 刺激によって誘導される迅速な NF- $\kappa$ B 活性化における TRAF6 の寄与が解析され、TRAF6- $\Delta$ T では TRAF6 を欠損していても誘導される後期の持続的な NF- $\kappa$ B 活性化が解析されていた可能性がある。したがって、本研究で明らかになった TCR 下流で活性化する NF- $\kappa$ B の TRAF6 による時間的な制御機構によって、一見矛盾するこれら過去の報告を説明できることが示唆された。

## 2-3-4-8 制御性 T 細胞分化に必要なサイトカインシグナルにおける TRAF6 の寄与

制御性 T 細胞の胸腺内分化には TCR を介したシグナル以外にも IL-2、IL-7、IL-15 などの $\gamma c$  を介した STAT5<sup>101)</sup>の活性化を誘導するシグナルも必要である。TRAF6 欠損 CD4SP 胸腺細胞を用いた解析により、TRAF6 は IL-2 シグナルの JAK1-ERK 経路を負に制御することを当研究室で報告した<sup>77)</sup>。しかし、現在までのところ、制御性 T 細胞の劇的な減少につながるような IL-2 シグナルの異常は見つかっていない。

胸腺、末梢共に制御性 T 細胞分化には TGF $\beta$ のシグナルが必要である。TGF $\beta$ の下流では Smad が活性化し、Foxp3 のエンハンサー領域に結合して転写を促進する<sup>102)</sup>。これまでに繊維芽細胞を用いて、TRAF6 は TGF $\beta$ R I に直接結合して下流の Smad 非依存的な MAP kinase の活性化を誘導することが報告されている<sup>103)104)</sup>。TRAF6 欠損胸腺細胞を抗 CD3/CD28 抗体と TGF $\beta$ で刺激すると、Smad2 のリン酸化は野生型と同程度に検出された。しかし、p38 と ERK のリン酸化は野生型と比較して減弱した(図 21)。したがって、TRAF6 は繊維芽細胞と同様に、胸腺細胞内でも TGF $\beta$ 刺激による Smad 非依存的な MAP kinase の活性化を制御することが判明した。しかし、これまでにこの経路が制御性 T 細胞分化に関連するという報告はなく、この経路の異常が制御性 T 細胞分化に与えている影響は明らかではない。

また、最近 TGF $\beta$ シグナルが制御性 T 細胞のアポトーシスを抑制するということが報告された。TGF $\beta$ R II を欠損する胸腺細胞では、アポトーシスを促進する BIM、BAX、BAK が高発現している<sup>105)</sup>。したがって、TRAF6 欠損胸腺細胞を用いてこれらの分子の発現を解析することで、制御性 T 細胞の TGF $\beta$ シグナル依存的なアポトーシスの抑制における TRAF6 の寄与を検討する必要がある。

### 第三章 総括

制御性 T 細胞は自己免疫、感染免疫、アレルギー、移植免疫、腫瘍免疫など、免疫反応全般を抑制する能力を持つ。したがって、その分化や活性化機構が解明され、免疫抑制機能を人為的に促進あるいは抑制することができれば、様々な免疫疾患治療への応用に繋がる可能性がある。本研究は TRAF6 欠損マウスの解析を糸口として、制御性 T 細胞分化の分子機構の一端を解明した。以下に本研究で新たに得られた知見についてまとめる。

1. TRAF6 は末梢組織ではなく、制御性 T 細胞の胸腺内分化に必要である。
2. RANK と CD40 の下流で TRAF6 が機能することで誘導される Aire および組織特異的抗原を発現する胸腺髄質上皮細胞は、制御性 T 細胞分化に寄与するが必須ではない。
3. TRAF6 は胸腺細胞内で機能して制御性 T 細胞への分化を誘導する。
4. TRAF6 は胸腺細胞上に発現する TCR の下流でシグナルを制御する。
5. TRAF6 は TCR 刺激によって誘導される NF- $\kappa$ B の迅速な活性化を誘導すると共に、Akt の活性化を抑制する。
6. TCR 下流の NF- $\kappa$ B の活性化は TRAF6 依存性の異なる 2 つの経路に分かれている。

本研究では、まず TRAF6 が制御性 T 細胞の「胸腺内」における分化に必要であることを示した。これは胸腺と末梢でそれぞれ誘導され、共に Foxp3 を発現する nT<sub>reg</sub> と iT<sub>reg</sub> の分化を誘導するシグナルが異なることを示唆するものである。また、これまでに TRAF6 と同様に制御性 T 細胞の胸腺内分化に特化した機能を持つ分子として、TCR 下流の NF- $\kappa$ B 活性化に必須な CARMA1 が報告されている<sup>74)</sup>。したがって、本研究の後半部分で解析したシグナルのデータとも相関のある結果であると言える。TCR – PKC $\theta$  – CBM complex – TRAF6 – NF- $\kappa$ B という経路は、末梢組織ではなく、胸腺内で制御性 T 細胞分化を決定するシグナルであることが示唆された。

胸腺髄質における **negative selection** と自己抗原を認識する制御性 T 細胞の関係から、**Aire**<sup>+</sup>胸腺髄質上皮細胞の制御性 T 細胞分化への寄与が示唆されている。**TRAF6** 欠損マウスは **Aire**<sup>+</sup>胸腺髄質上皮細胞がほぼ消失する。しかし、胸腺髄質上皮細胞を含む胸腺ストローマのみで **TRAF6** を欠損させても、制御性 T 細胞はある程度産生された。したがって、胸腺髄質上皮細胞の制御性 T 細胞分化への寄与は部分的であることが本研究により明らかになった。そして、胎仔肝臓細胞移植実験の結果から、胸腺細胞内の **TRAF6** が制御性 T 細胞分化には決定的な役割を果たしていることが明確に示された。

**TRAF6** が機能して制御性 T 細胞分化を誘導する細胞を「胸腺細胞」とすると同定し、この細胞内で **TRAF6** が制御するシグナルを *in vitro* の刺激実験により解析した。**TRAF6** を欠損しても **TCR** 刺激によって誘導される **CD4SP** 胸腺細胞の産生に必要なシグナルは阻害されなかった。しかし、制御性 T 細胞の産生に必要なシグナルのうち、**NF-κB** と **Akt** の 2 つの経路に異常が見られた。したがって、これらの **TCR** シグナルの **TRAF6** 依存的な調節により、制御性 T 細胞の胸腺内分化が決定されることが示唆された。

さらに、本研究で新たに得られた特筆すべき知見は、**TRAF6** の **TCR** 下流の **NF-κB** 活性化における機能は、その活性化に必須な **CBM complex** とは異なるということである。**TRAF6** は **NF-κB** の迅速な活性化には必須であるが、持続的な活性化への寄与はそれほど大きくない。**NF-κB** の活性化に必須な因子を欠損するマウスと **TRAF6** 欠損マウスは、制御性 T 細胞の胸腺内分化異常について、前駆細胞の消失など非常に良く似た表現型を示す。したがって、制御性 T 細胞の胸腺内分化には、**TRAF6** 依存的な迅速な **NF-κB** の活性化が必要であることが示唆された。また、**TCR** 下流の **NF-κB** 活性化は **TRAF6** 依存性が異なる 2 つの経路に分かれることが明らかになり、**TCR**—**NF-κB** 経路における **TRAF6** の寄与について、過去の報告の矛盾をこの 2 つの経路で説明できる可能性が示唆された。

以上の本研究で得られた新たな知見を基に、**TRAF6** 依存的な制御性 T 細胞の胸腺内分化のモデルを構築した(図 22)。**TRAF6** は胸腺細胞内で機能し、**TCR** の下流で **Akt** の活性化を抑制する。**TCR** 刺激によって誘導される **NF-κB** の活性化は、**CBM complex** の下流で **TRAF6** 依存性により 2 つに分かれる。**TRAF6** 依存性の低い後期の持続的な **NF-κB** の活性化は、細胞増殖に十分である。一方で、制御性 T 細胞の胸腺内分化には、**c-Rel** と **RelA** の迅速な核移行を誘導する **TRAF6** 依存的な迅速な **NF-κB** の活性化が必要である。分化途中の胸腺細胞内で、**TCR** シグナルが **TRAF6** 依存的に上記のように調節されることで、制御性 T 細胞の胸腺内分化は決定されることが示唆された。

本研究で得られた結果から、制御性 T 細胞の胸腺内分化における TCR 下流の迅速な NF- $\kappa$ B 活性化の重要性が示唆された。しかし、本当にこの迅速な NF- $\kappa$ B 活性化が制御性 T 細胞分化に関与するかは明らかではない。TCR 刺激によって誘導される迅速な NF- $\kappa$ B の活性化だけを人為的に誘導する方法は存在しない。したがって、今後の課題はこの TRAF6 依存的な初期 NF- $\kappa$ B の標的遺伝子を同定することである。その標的遺伝子の中に制御性 T 細胞の胸腺内分化に必須な遺伝子が含まれていれば、この迅速な活性化の重要性を支持する証拠となる。現在進めているマイクロアレイ解析により TRAF6 依存的な初期 NF- $\kappa$ B の標的遺伝子が同定され、その遺伝子の制御性 T 細胞分化への寄与が証明されることで、本研究が制御性 T 細胞分化機構の解明に貢献することが期待される。

APECED と IPEX はそれぞれ *AIRE* と *FOXP3* という単一遺伝子の変異が原因の自己免疫疾患である。*Aire*<sup>+</sup>胸腺髄質上皮細胞を介した自己反応性 T 細胞の除去と、*Foxp3*<sup>+</sup>制御性 T 細胞による免疫反応の抑制は、共に免疫恒常性の維持に必須である。TRAF6 は胸腺髄質上皮細胞上に発現する RANK と CD40 の下流で機能して *Aire*<sup>+</sup>胸腺髄質上皮細胞の分化を誘導する。また、TRAF6 は胸腺細胞上に発現する TCR の下流でシグナルを調節して *Foxp3*<sup>+</sup>制御性 T 細胞の分化を誘導する。TRAF6 は異なる細胞上に発現する異なる受容体の下流で機能して、いずれも免疫寛容を誘導する。「TRAF6」という分子の解析を糸口として免疫寛容の誘導、免疫恒常性維持のメカニズムがより詳細に解明され、様々な免疫疾患治療に繋がる発見がなされることを期待する。そして、本研究から得られた知見がその一助になることを心から願う。

## 第四章 材料と実験方法

### 4-1 マウス

*Traf6*<sup>-/-</sup>マウス<sup>46)</sup>と *Foxp3*<sup>hCD2</sup> レポーターマウス<sup>52)</sup>は既報のものを用いた。*Relb*<sup>-/-</sup>マウスは Jackson Laboratory から購入した。*Rag2*<sup>-/-</sup>マウスは F. W. Alt 博士 (Harvard University Medical School, Boston, MA) から提供していただいた。BALB/c ノードマウスは日本クレアから購入した。すべてのマウスは特定病原微生物の非存在下で飼育し、マウスを用いた動物実験は、東京大学医科学研究所動物実験委員会による動物実験規定を順守して遂行した。

### 4-2 抗体と試薬

本研究で使用した抗体と試薬は以下の通りである。PE-conjugated rat anti-mouse CD8 $\alpha$  (53-6.7)、FITC-conjugated anti-mouse CD4 (GK1.5)、CD25 (7D4)、CD45.1 (A20)、Ki-67 (B56)、PE-Cy5-conjugated anti-mouse CD4 (H129.19)、CD8 (53-6.7)、biotinylated anti-mouse CD8 $\alpha$  (53-6.7)、CD11b (M1/70)、CD11c (HL3)、CD45R/B220 (RA3-6B2)、Ly-6G and Ly-6C (RB6-8C5)、TER119 (Ly-76)、purified anti-mouse CD16/32 (2.4G2)抗体(BD Pharmingen)。PE-conjugated anti-mouse/rat Foxp3 (FKJ-16s)、biotinylated anti-mouse CD25 (PC61.5)、CD49b (DX5)、FG purified anti-mouse CD3 $\epsilon$  (145-2C11)、FG purified anti-mouse CD28 (37.51)、purified anti-mouse/rat Foxp3 (FJK-16s) 抗体 (eBioscience)。Streptavidin-ECD (Beckman Coulter)。PE-conjugated anti-human CD2 (RPA-2.10)、APC-conjugated anti-mouse GITR (DTA-1)、anti-mouse/human Helios (22F6) 抗体 (BioLegend)。Alexa488-conjugated anti-rat IgG、Alexa546-conjugated anti-rabbit IgG 抗体、Alexa647-conjugated streptavidin (Molecular Probes)。抗 phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  (5A5)、phospho-ERK、phospho-Akt (Ser473) (D9E)、phospho-JNK、phospho-PLC $\gamma$ 1 (Tyr783)、I $\kappa$ B $\alpha$  抗体(Cell signaling Technology)。抗 ERK2、Akt、JNK1、PLC $\gamma$ 1、RelA (F6)、c-Rel、p50 抗体(Santa Cruz Biotechnology)。抗 $\alpha$ -tubulin (DM1A)抗体(Calbiochem)。Recombinant mouse IL-2、recombinant human TGF- $\beta$ 1 (R&D SYSTEMS)。Biotinylated goat anti-hamster IgG 抗体(VECTOR LABORATORIES)。Streptavidin (Pierce)。Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA)、Ionomycin (SIGMA)。

### 4-3 免疫染色

胸腺を OCT compound (Sakura Finetech, Tokyo, Japan)で包埋し、液体窒素で凍結した。クリオスタットで作製した組織切片(6  $\mu$ m 厚)を4℃のアセトンで固定後、非特異的な抗体の結



合を防ぐため 10% goat serum (ZYMED)でブロッッキングを行った。ブロッッキング後に 4-2 に記載した 1 次抗体で染色した (室温 1 時間、あるいは 4 °C overnight)。切片を phosphate-buffered saline (PBS)で洗浄後、2 次抗体で染色した(室温 40 分)。共焦点画像は Radiance 2000 共焦点顕微鏡(Bio-Rad Laboratories)により取得した。

#### 4-4 フローサイトメトリーによる解析

胸腺と脾臓から単細胞溶液を調製した。脾細胞は調製後に ACK lysis バッファーで処理し(氷上 5 分)、赤血球を除去した。非特異な染色を防ぐため、蛍光標識抗体による染色の前に抗 Fcγ III/II receptor 抗体 で染色して Fc receptor をブロックした。死細胞は 7-aminoactinomycin D (Wako) 染色により除去した。Foxp3、Helios、Ki-67 の細胞内染色には PE-conjugated anti-mouse/rat Foxp3 Staining Set (eBioscience)を用いた。染色後の細胞は fluorescence-activated cell sorter (FACS) (Epics XL, Beckmann Coulter, Fullerton, CA)および FACS CANTO™ II (Becton, Dickinson and Company)により解析した。

#### 4-5 胎仔肝臓細胞移植

胎齢 15 日(E15)の Wild-type および *Traf6*<sup>-/-</sup>マウス胎仔の肝臓細胞(1~3×10<sup>7</sup> 個)を、X 線(950 rad)を照射した 6~8 週齢の *Rag2*<sup>-/-</sup>マウスに移植した。mixed fetal liver chimera の作製の際には、E15 の CD45.2<sup>+</sup> Wild-type、*Traf6*<sup>+/-</sup>、および *Traf6*<sup>-/-</sup> マウス胎仔の肝臓細胞(1~3×10<sup>7</sup> 個)を congenic な CD45.1<sup>+</sup> E15 野生型マウス胎仔の肝臓細胞(1~3×10<sup>7</sup> 個)と混合し、X 線(950 rad)を照射した 6~8 週齢の *Rag2*<sup>-/-</sup>マウスに移植した。移植 4~6 週間後、臓器を回収してフローサイトメトリーと免疫染色により解析した。

#### 4-6 胎仔胸腺器官培養 (fetal thymic organ culture: FTOC)

胎仔胸腺器官培養系による hCD2<sup>+</sup>胸腺細胞分化の解析の際には、*Foxp3*<sup>hCD2</sup> バックグラウンドの E15 Wild-type および *Traf6*<sup>-/-</sup> マウス胎仔から胸腺を摘出し、R10 (RPMI1640 (Invitrogen)、10% fetal bovine serum (FBS) (Equitech-Bio, Kerrville, TX)、2 mM L-glutamine (Wako)、100 U/ml penicillin (Banyu Pharmaceutical)、100 µg/ml streptomycin (Meiji Seika)、50 µM 2-mercaptoethanol (Wako))に浮かべた Nucleopore filters (Whatmann, Clifton, NJ)上で培養した。培養 8 日後の胸腺から細胞を調製し、抗 CD4、CD8α、hCD2 抗体で染色してフローサイトメトリーにより解析した。

#### 4-7 胸腺ストローマ移植

E14 Wild-type および *Traf6*<sup>-/-</sup> マウス胎仔から胸腺を摘出し、リンパ球を除去するために 1.35 mM 2'-deoxyguanosine (2-DG) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 含有 R10 に浮かべた Nucleopore filter 上で 4 日間培養した。Wild-type および *Traf6*<sup>-/-</sup> それぞれ 4 個の胸腺を、BALB/c スードマウスの腎臓皮膜下に移植した。移植 8 週間後、移植した胸腺内の細胞を、フローサイトメトリーと免疫染色により解析した。

#### 4-8 *in vitro*における胸腺細胞の刺激

胸腺細胞と分離した CD4SP 胸腺細胞を RPMI5 (RPMI1640、5% FBS、2 mM L-glutamine、100 U/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin、50 µM 2-mercaptoethanol) に懸濁し、刺激前の細胞の状態を揃えるために 37 °C のインキュベーターで 3 時間以上培養した(rest)。rest 後の細胞を PMA (10 ng/ml) と Ionomycin (400 ng/ml) あるいは TNFα (20 ng/ml) で刺激した。TCR 刺激の際には、rest 後の細胞をまず hamster anti-CD3ε (5 µg/ml) と hamster anti-CD28 (2 µg/ml) 抗体を用いて氷上で 20 分染色した。anti-hamster IgG 抗体(30 µg/ml)を添加することにより、CD3/CD28 をクロスリンクして刺激した。

#### 4-9 脾臓 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の分離と TGF β による *in vitro* の iT<sub>reg</sub> 分化誘導

脾細胞をビオチン化抗 CD8α、CD11b、CD11c、CD25、CD45R/B220、CD49b、Ly-6G /Ly-6C、TER119 抗体で染色後、抗ビオチンマイクロビーズ(Miltenyi Biotec)でラベルした。ラベルした細胞を、LD カラム(Miltenyi Biotec)を用いて除去した。分離した CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞を、recombinant mouse IL-2 (20 ng/ml) と recombinant human TGF-β1 (2 ng/ml) の存在下でプレート上に結合させた抗 CD3ε抗体(10 µg/ml)と、抗 CD28 抗体(2 µg/ml)で刺激した。刺激 3 日目に細胞を回収し、抗 CD4、CD25、Foxp3 抗体で染色してフローサイトメトリーにより解析した。

#### 4-10 ウェスタンブロッティング

刺激後の細胞を PBS で洗浄後、サンプルバッファー(50 mM Tris-HCl [pH 6.8], 2% SDS, 0.9 M β-mercaptoethanol, 10% glycerol)に可溶化し、全細胞溶解液とした。全細胞溶解液、核抽出液、細胞質溶液を 7.5-10% polyacrylamide/SDS ゲルで分離し、PVDF 膜(Millipore,

Bedford, MA)に転写した。転写後の膜を 4-2 に記載した特異的な 1 次抗体と反応させ、1 次抗体に応じて $\alpha$ -rabbit IgG-horseradish peroxidase (HRP)抗体、 $\alpha$ -mouse IgG-HRP 抗体を反応させ、ECL detection system (Amersham Bioscience、GE Healthcare)を用いて検出した。

#### 4 - 1 1 細胞内カルシウム濃度の測定

Wild-type および *Traf6*<sup>-/-</sup> 胸腺細胞を loading medium (RPMI1640、10% FBS、2 mM L-glutamine、100 U/ml penicillin、100  $\mu$ g/ml streptomycin、50  $\mu$ M 2-mercaptoethanol)に懸濁し、37 °C のインキュベーターで培養した(overnight)。rest 後の細胞を calcium indicator の Fura2-AM (1  $\mu$ M、Invitrogen)と界面活性剤の Cremophore EL (0.01 % v/v)で処理した( $10^6$  cells/ml、室温 30 分、遮光)。Loading medium で 3 回洗浄後、Cell TAK (BD Pharmingen)を塗布したスライドガラス上に播種して接着させた(室温 10 分、遮光)。BSS (-Ca<sup>2+</sup>) (2 mM HEPES、11.5 mM NaCl、0.54 mM KCl、10 mM Glucose、1 mM MgCl<sub>2</sub>)で 3 回洗浄し、スライドガラス上に 200  $\mu$ l の BSS (-Ca<sup>2+</sup>)添加した。細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度は 340 nm と 380 nm の励起による蛍光強度の比(F340/F380)から測定した。測定開始 100 秒後にビオチン化抗 CD3 $\epsilon$ 抗体(5  $\mu$ g/ml)を添加し、さらに 100 秒後に streptavidin (30  $\mu$ g/ml)と抗 CD28 抗体(5  $\mu$ g/ml)を添加してクロスリンクした。さらに 300 秒後に BSS (+ Ca<sup>2+</sup>)を添加し、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の最高値を測定した。

#### 4 - 1 2 統計解析

p 値は Microsoft Excel software を用いて不等分散 2 標本の両側検定を行い、Student's t test により算出した。

## 第五章 参考文献

1. Takahama, Y. (2006). Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol* 6, 127-135.
2. Hogquist, K.A., Baldwin, T.A., and Jameson, S.C. (2005). Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol* 5, 772-782.
3. Kyewski, B., and Derbinski, J. (2004). Self-representation in the thymus: an extended view. *Nat Rev Immunol* 4, 688-698.
4. Anderson, M.S., Venzani, E.S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S.P., Turley, S.J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., *et al.* (2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298, 1395-1401.
5. Nagamine, K., Peterson, P., Scott, H.S., Kudoh, J., Minoshima, S., Heino, M., Krohn, K.J., Lalot, M.D., Mullis, P.E., Antonarakis, S.E., *et al.* (1997). Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet* 17, 393-398.
6. Consortium, F.-G.A. (1997). An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. *Nat Genet* 17, 399-403.
7. Ramsey, C., Winqvist, O., Puhakka, L., Halonen, M., Moro, A., Kampe, O., Eskelin, P., Pelto-Huikko, M., and Peltonen, L. (2002). Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response. *Hum Mol Genet* 11, 397-409.
8. Zuklys, S., Balciunaite, G., Agarwal, A., Fasler-Kan, E., Palmer, E., and Hollander, G.A. (2000). Normal thymic architecture and negative selection are associated with Aire expression, the gene defective in the autoimmune-polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED). *J Immunol* 165, 1976-1983.
9. DeKoning, J., DiMolfetto, L., Reilly, C., Wei, Q., Havran, W.L., and Lo, D. (1997). Thymic cortical epithelium is sufficient for the development of mature T cells in relB-deficient mice. *J Immunol* 158, 2558-2566.
10. Akiyama, T., Maeda, S., Yamane, S., Ogino, K., Kasai, M., Kajiura, F., Matsumoto, M., and Inoue, J. (2005). Dependence of self-tolerance on TRAF6-directed development of thymic stroma. *Science* 308, 248-251.

11. Kajiura, F., Sun, S., Nomura, T., Izumi, K., Ueno, T., Bando, Y., Kuroda, N., Han, H., Li, Y., Matsushima, A., *et al.* (2004). NF-kappa B-inducing kinase establishes self-tolerance in a thymic stroma-dependent manner. *J Immunol* 172, 2067-2075.
12. Akiyama, T., Shimo, Y., Yanai, H., Qin, J., Ohshima, D., Maruyama, Y., Asaumi, Y., Kitazawa, J., Takayanagi, H., Penninger, J.M., *et al.* (2008). The tumor necrosis factor family receptors RANK and CD40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance. *Immunity* 29, 423-437.
13. Hikosaka, Y., Nitta, T., Ohigashi, I., Yano, K., Ishimaru, N., Hayashi, Y., Matsumoto, M., Matsuo, K., Penninger, J.M., Takayanagi, H., *et al.* (2008). The cytokine RANKL produced by positively selected thymocytes fosters medullary thymic epithelial cells that express autoimmune regulator. *Immunity* 29, 438-450.
14. Irla, M., Hugues, S., Gill, J., Nitta, T., Hikosaka, Y., Williams, I.R., Hubert, F.X., Scott, H.S., Takahama, Y., Hollander, G.A., *et al.* (2008). Autoantigen-specific interactions with CD4+ thymocytes control mature medullary thymic epithelial cell cellularity. *Immunity* 29, 451-463.
15. Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133, 775-787.
16. Josefowicz, S.Z., and Rudensky, A. (2009). Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity* 30, 616-625.
17. Nishizuka, Y., and Sakakura, T. (1969). Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* 166, 753-755.
18. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). 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.
19. Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T.W., and Sakaguchi, S. (2000). Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 192, 303-310.

20. Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y., and Sakaguchi, S. (2002). Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 3, 135-142.
21. Bennett, C.L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M.E., Ferguson, P.J., Whitesell, L., Kelly, T.E., Saulsbury, F.T., Chance, P.F., and Ochs, H.D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27, 20-21.
22. Wildin, R.S., Ramsdell, F., Peake, J., Faravelli, F., Casanova, J.L., Buist, N., Levy-Lahad, E., Mazzella, M., Goulet, O., Perroni, L., *et al.* (2001). X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 27, 18-20.
23. Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-1061.
24. Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4, 330-336.
25. Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S.A., and Ramsdell, F. (2003). An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4, 337-342.
26. Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Williams, L.M., Dooley, J.L., Farr, A.G., and Rudensky, A.Y. (2005). Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 22, 329-341.
27. Apostolou, I., Sarukhan, A., Klein, L., and von Boehmer, H. (2002). Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol* 3, 756-763.
28. Hsieh, C.S., Liang, Y., Tyznik, A.J., Self, S.G., Liggitt, D., and Rudensky, A.Y. (2004). Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors. *Immunity* 21, 267-277.
29. Hsieh, C.S., Zheng, Y., Liang, Y., Fontenot, J.D., and Rudensky, A.Y. (2006). An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat Immunol* 7, 401-410.

30. Tai, X., Cowan, M., Feigenbaum, L., and Singer, A. (2005). CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol* 6, 152-162.
31. Fontenot, J.D., Dooley, J.L., Farr, A.G., and Rudensky, A.Y. (2005). Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J Exp Med* 202, 901-906.
32. Aschenbrenner, K., D'Cruz, L.M., Vollmann, E.H., Hinterberger, M., Emmerich, J., Swee, L.K., Rolink, A., and Klein, L. (2007). Selection of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire<sup>+</sup> medullary thymic epithelial cells. *Nat Immunol* 8, 351-358.
33. Watanabe, N., Wang, Y.H., Lee, H.K., Ito, T., Cao, W., and Liu, Y.J. (2005). Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in human thymus. *Nature* 436, 1181-1185.
34. Curotto de Lafaille, M.A., and Lafaille, J.J. (2009). Natural and adaptive foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 30, 626-635.
35. Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naive T cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198, 1875-1886.
36. Sun, C.M., Hall, J.A., Blank, R.B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J.R., and Belkaid, Y. (2007). Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* 204, 1775-1785.
37. Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103<sup>+</sup> DCs induces Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 204, 1757-1764.
38. Benson, M.J., Pino-Lagos, K., Roseblatt, M., and Noelle, R.J. (2007). All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med* 204, 1765-1774.
39. Zhou, L., Lopes, J.E., Chong, M.M., Ivanov, I.I., Min, R., Vitoria, G.D., Shen, Y., Du, J., Rubtsov, Y.P., Rudensky, A.Y., *et al.* (2008). TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function. *Nature* 453, 236-240.

40. Ichiyama, K., Yoshida, H., Wakabayashi, Y., Chinen, T., Saeki, K., Nakaya, M., Takaesu, G., Hori, S., Yoshimura, A., and Kobayashi, T. (2008). Foxp3 inhibits RORgammat-mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with RORgammat. *J Biol Chem* 283, 17003-17008.
41. Mucida, D., Park, Y., Kim, G., Turovskaya, O., Scott, I., Kronenberg, M., and Cheroutre, H. (2007). Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 317, 256-260.
42. Inoue, J., Gohda, J., and Akiyama, T. (2007). Characteristics and biological functions of TRAF6. *Adv Exp Med Biol* 597, 72-79.
43. Yamazaki, K., Gohda, J., Kanayama, A., Miyamoto, Y., Sakurai, H., Yamamoto, M., Akira, S., Hayashi, H., Su, B., and Inoue, J. (2009). Two mechanistically and temporally distinct NF-kappaB activation pathways in IL-1 signaling. *Sci Signal* 2, ra66.
44. Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C., and Chen, Z.J. (2000). Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 103, 351-361.
45. Kanayama, A., Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.K., Hong, M., Shaito, A., Chiu, Y.H., Deng, L., and Chen, Z.J. (2004). TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol Cell* 15, 535-548.
46. Naito, A., Azuma, S., Tanaka, S., Miyazaki, T., Takaki, S., Takatsu, K., Nakao, K., Nakamura, K., Katsuki, M., Yamamoto, T., *et al.* (1999). Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient mice. *Genes Cells* 4, 353-362.
47. Qin, J., Konno, H., Ohshima, D., Yanai, H., Motegi, H., Shimo, Y., Hirota, F., Matsumoto, M., Takaki, S., Inoue, J., *et al.* (2007). Developmental stage-dependent collaboration between the TNF receptor-associated factor 6 and lymphotoxin pathways for B cell follicle organization in secondary lymphoid organs. *J Immunol* 179, 6799-6807.
48. Lomaga, M.A., Yeh, W.C., Sarosi, I., Duncan, G.S., Furlonger, C., Ho, A., Morony, S., Capparelli, C., Van, G., Kaufman, S., *et al.* (1999). TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev* 13, 1015-1024.
49. Kobayashi, T., Walsh, P.T., Walsh, M.C., Speirs, K.M., Chiffoleau, E., King, C.G., Hancock, W.W., Caamano, J.H., Hunter, C.A., Scott, P., *et al.* (2003). TRAF6 is a critical factor for



dendritic cell maturation and development. *Immunity* 19, 353-363.

50. King, C.G., Kobayashi, T., Cejas, P.J., Kim, T., Yoon, K., Kim, G.K., Chiffolleau, E., Hickman, S.P., Walsh, P.T., Turka, L.A., *et al.* (2006). TRAF6 is a T cell-intrinsic negative regulator required for the maintenance of immune homeostasis. *Nat Med* 12, 1088-1092.
51. King, C.G., Buckler, J.L., Kobayashi, T., Hannah, J.R., Bassett, G., Kim, T., Pearce, E.L., Kim, G.G., Turka, L.A., and Choi, Y. (2008). Cutting edge: requirement for TRAF6 in the induction of T cell anergy. *J Immunol* 180, 34-38.
52. Komatsu, N., Mariotti-Ferrandiz, M.E., Wang, Y., Malissen, B., Waldmann, H., and Hori, S. (2009). Heterogeneity of natural Foxp3<sup>+</sup> T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1903-1908.
53. Thornton, A.M., Korty, P.E., Tran, D.Q., Wohlfert, E.A., Murray, P.E., Belkaid, Y., and Shevach, E.M. (2010). Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells. *J Immunol* 184, 3433-3441.
54. Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., and Sakaguchi, S. (2005). 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.
55. Marie, J.C., Liggitt, D., and Rudensky, A.Y. (2006). Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity* 25, 441-454.
56. Liu, Y., Zhang, P., Li, J., Kulkarni, A.B., Perruche, S., and Chen, W. (2008). A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol* 9, 632-640.
57. Liston, A., Nutsch, K.M., Farr, A.G., Lund, J.M., Rasmussen, J.P., Koni, P.A., and Rudensky, A.Y. (2008). Differentiation of regulatory Foxp3<sup>+</sup> T cells in the thymic cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 11903-11908.
58. Proietto, A.I., van Dommelen, S., Zhou, P., Rizzitelli, A., D'Amico, A., Steptoe, R.J., Naik, S.H., Lahoud, M.H., Liu, Y., Zheng, P., *et al.* (2008). Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19869-19874.

59. Vang, K.B., Yang, J., Mahmud, S.A., Burchill, M.A., Vegoe, A.L., and Farrar, M.A. (2008). IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoietin, redundantly govern CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell development. *J Immunol* 181, 3285-3290.
60. Lio, C.W., and Hsieh, C.S. (2008). A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity* 28, 100-111.
61. Burchill, M.A., Yang, J., Vang, K.B., Moon, J.J., Chu, H.H., Lio, C.W., Vegoe, A.L., Hsieh, C.S., Jenkins, M.K., and Farrar, M.A. (2008). Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity* 28, 112-121.
62. Sun, L., Deng, L., Ea, C.K., Xia, Z.P., and Chen, Z.J. (2004). The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Mol Cell* 14, 289-301.
63. Bidere, N., Snow, A.L., Sakai, K., Zheng, L., and Lenardo, M.J. (2006). Caspase-8 regulation by direct interaction with TRAF6 in T cell receptor-induced NF-kappaB activation. *Curr Biol* 16, 1666-1671.
64. Oeckinghaus, A., Wegener, E., Welteke, V., Ferch, U., Arslan, S.C., Ruland, J., Scheidereit, C., and Krappmann, D. (2007). Malt1 ubiquitination triggers NF-kappaB signaling upon T-cell activation. *EMBO J* 26, 4634-4645.
65. Takahama, Y., and Nakauchi, H. (1996). Phorbol ester and calcium ionophore can replace TCR signals that induce positive selection of CD4 T cells. *J Immunol* 157, 1508-1513.
66. Koonpaew, S., Shen, S., Flowers, L., and Zhang, W. (2006). LAT-mediated signaling in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell development. *J Exp Med* 203, 119-129.
67. Oh-Hora, M., Yamashita, M., Hogan, P.G., Sharma, S., Lamperti, E., Chung, W., Prakriya, M., Feske, S., and Rao, A. (2008). Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance. *Nat Immunol* 9, 432-443.
68. Gong, Q., Cheng, A.M., Akk, A.M., Alberola-Ila, J., Gong, G., Pawson, T., and Chan, A.C. (2001). Disruption of T cell signaling networks and development by Grb2 haploid insufficiency. *Nat Immunol* 2, 29-36.
69. Feuerer, M., Hill, J.A., Mathis, D., and Benoist, C. (2009). Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nat Immunol* 10, 689-695.

70. Hara, H., Wada, T., Bakal, C., Kozieradzki, I., Suzuki, S., Suzuki, N., Nghiem, M., Griffiths, E.K., Krawczyk, C., Bauer, B., *et al.* (2003). The MAGUK family protein CARD11 is essential for lymphocyte activation. *Immunity* 18, 763-775.
71. Egawa, T., Albrecht, B., Favier, B., Sunshine, M.J., Mirchandani, K., O'Brien, W., Thome, M., and Littman, D.R. (2003). Requirement for CARMA1 in antigen receptor-induced NF-kappa B activation and lymphocyte proliferation. *Curr Biol* 13, 1252-1258.
72. Ruland, J., Duncan, G.S., Wakeham, A., and Mak, T.W. (2003). Differential requirement for Malt1 in T and B cell antigen receptor signaling. *Immunity* 19, 749-758.
73. Ruefli-Brasse, A.A., French, D.M., and Dixit, V.M. (2003). Regulation of NF-kappaB-dependent lymphocyte activation and development by paracaspase. *Science* 302, 1581-1584.
74. Barnes, M.J., Krebs, P., Harris, N., Eidenschenk, C., Gonzalez-Quintial, R., Arnold, C.N., Crozat, K., Sovath, S., Moresco, E.M., Theofilopoulos, A.N., *et al.* (2009). Commitment to the regulatory T cell lineage requires CARMA1 in the thymus but not in the periphery. *PLoS Biol* 7, e51.
75. Molinero, L.L., Yang, J., Gajewski, T., Abraham, C., Farrar, M.A., and Alegre, M.L. (2009). CARMA1 controls an early checkpoint in the thymic development of FoxP3+ regulatory T cells. *J Immunol* 182, 6736-6743.
76. Schmidt-Suppran, M., Tian, J., Grant, E.P., Pasparakis, M., Maehr, R., Ovaa, H., Ploegh, H.L., Coyle, A.J., and Rajewsky, K. (2004). Differential dependence of CD4+CD25+ regulatory and natural killer-like T cells on signals leading to NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4566-4571.
77. Motegi, H., Shimo, Y., Akiyama, T., and Inoue, J. (2010) TRAF6 negatively regulates the Jak1-Erk pathway in interleukin-2 signaling. *Genes Cells in press*.
78. Isomura, I., Palmer, S., Grumont, R.J., Bunting, K., Hoyne, G., Wilkinson, N., Banerjee, A., Proietto, A., Gugasyan, R., Wu, L., *et al.* (2009). c-Rel is required for the development of thymic Foxp3+ CD4 regulatory T cells. *J Exp Med* 206, 3001-3014.
79. Visekruna, A., Huber, M., Hellhund, A., Bothur, E., Reinhard, K., Bollig, N., Schmidt, N., Joeris, T., Lohoff, M., and Steinhoff, U. (2010). c-Rel is crucial for the induction of Foxp3(+) regulatory CD4(+) T cells but not T(H)17 cells. *Eur J Immunol* 40, 671-676.

80. Vang, K.B., Yang, J., Pagan, A.J., Li, L.X., Wang, J., Green, J.M., Beg, A.A., and Farrar, M.A. (2010). Cutting edge: CD28 and c-Rel-dependent pathways initiate regulatory T cell development. *J Immunol* 184, 4074-4077.
81. Neilson, J.R., Winslow, M.M., Hur, E.M., and Crabtree, G.R. (2004). Calcineurin B1 is essential for positive but not negative selection during thymocyte development. *Immunity* 20, 255-266.
82. Fischer, A.M., Katayama, C.D., Pages, G., Pouyssegur, J., and Hedrick, S.M. (2005). The role of erk1 and erk2 in multiple stages of T cell development. *Immunity* 23, 431-443.
83. Merkenschlager, M., and von Boehmer, H. (2010). PI3 kinase signalling blocks Foxp3 expression by sequestering Foxo factors. *J Exp Med* 207, 1347-1350.
84. Wan, Y.Y., Chi, H., Xie, M., Schneider, M.D., and Flavell, R.A. (2006). The kinase TAK1 integrates antigen and cytokine receptor signaling for T cell development, survival and function. *Nat Immunol* 7, 851-858.
85. Sato, S., Sanjo, H., Tsujimura, T., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Takeuchi, O., and Akira, S. (2006). TAK1 is indispensable for development of T cells and prevention of colitis by the generation of regulatory T cells. *Int Immunol* 18, 1405-1411.
86. Schmidt-Suppran, M., Courtois, G., Tian, J., Coyle, A.J., Israel, A., Rajewsky, K., and Pasparakis, M. (2003). Mature T cells depend on signaling through the IKK complex. *Immunity* 19, 377-389.
87. Haxhinasto, S., Mathis, D., and Benoist, C. (2008). The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells. *J Exp Med* 205, 565-574.
88. Sauer, S., Bruno, L., Hertweck, A., Finlay, D., Leleu, M., Spivakov, M., Knight, Z.A., Cobb, B.S., Cantrell, D., O'Connor, E., *et al.* (2008). T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7797-7802.
89. Liu, G., Burns, S., Huang, G., Boyd, K., Proia, R.L., Flavell, R.A., and Chi, H. (2009). The receptor S1P1 overrides regulatory T cell-mediated immune suppression through Akt-mTOR. *Nat Immunol* 10, 769-777.
90. Harada, Y., Elly, C., Ying, G., Paik, J.H., DePinho, R.A., and Liu, Y.C. (2010). Transcription factors Foxo3a and Foxo1 couple the E3 ligase Cbl-b to the induction of Foxp3 expression in induced regulatory T cells. *J Exp Med* 207, 1381-1391.

91. Ouyang, W., Beckett, O., Ma, Q., Paik, J.H., DePinho, R.A., and Li, M.O. (2010). Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol* 11, 618-627.
92. Long, M., Park, S.G., Strickland, I., Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2009). Nuclear factor-kappaB modulates regulatory T cell development by directly regulating expression of Foxp3 transcription factor. *Immunity* 31, 921-931.
93. Yamamoto, M., Sato, S., Saitoh, T., Sakurai, H., Uematsu, S., Kawai, T., Ishii, K.J., Takeuchi, O., and Akira, S. (2006). Cutting Edge: Pivotal function of Ubc13 in thymocyte TCR signaling. *J Immunol* 177, 7520-7524.
94. Zheng, Y., Josefowicz, S., Chaudhry, A., Peng, X.P., Forbush, K., and Rudensky, A.Y. (2010). Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature* 463, 808-812.
95. Ruan, Q., Kameswaran, V., Tone, Y., Li, L., Liou, H.C., Greene, M.I., Tone, M., and Chen, Y.H. (2009). Development of Foxp3(+) regulatory t cells is driven by the c-Rel enhanceosome. *Immunity* 31, 932-940.
96. Tam, W.F., Wang, W., and Sen, R. (2001). Cell-specific association and shuttling of IkappaBalpha provides a mechanism for nuclear NF-kappaB in B lymphocytes. *Mol Cell Biol* 21, 4837-4846.
97. Watts, C. (2008). Location, location, location: identifying the neighborhoods of LPS signaling. *Nat Immunol* 9, 343-345.
98. Kagan, J.C., Su, T., Horng, T., Chow, A., Akira, S., and Medzhitov, R. (2008). TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol* 9, 361-368.
99. Geisler, C. (2004). TCR trafficking in resting and stimulated T cells. *Crit Rev Immunol* 24, 67-86.
100. Naramura, M., Jang, I.K., Kole, H., Huang, F., Haines, D., and Gu, H. (2002). c-Cbl and Cbl-b regulate T cell responsiveness by promoting ligand-induced TCR down-modulation. *Nat Immunol* 3, 1192-1199.
101. Yao, Z., Kanno, Y., Kerenyi, M., Stephens, G., Durant, L., Watford, W.T., Laurence, A., Robinson, G.W., Shevach, E.M., Moriggl, R., *et al.* (2007). Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3. *Blood* 109, 4368-4375.

102. Tone, Y., Furuuchi, K., Kojima, Y., Tykocinski, M.L., Greene, M.I., and Tone, M. (2008). Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat Immunol* 9, 194-202.
103. Yamashita, M., Fatyol, K., Jin, C., Wang, X., Liu, Z., and Zhang, Y.E. (2008). TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF-beta. *Mol Cell* 31, 918-924.
104. Sorrentino, A., Thakur, N., Grimsby, S., Marcusson, A., von Bulow, V., Schuster, N., Zhang, S., Heldin, C.H., and Landstrom, M. (2008). The type I TGF-beta receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. *Nat Cell Biol* 10, 1199-1207.
105. Ouyang, W., Beckett, O., Ma, Q., and Li, M.O. (2010). Transforming growth factor-beta signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development. *Immunity* 32, 642-653.

## 第六章 図表

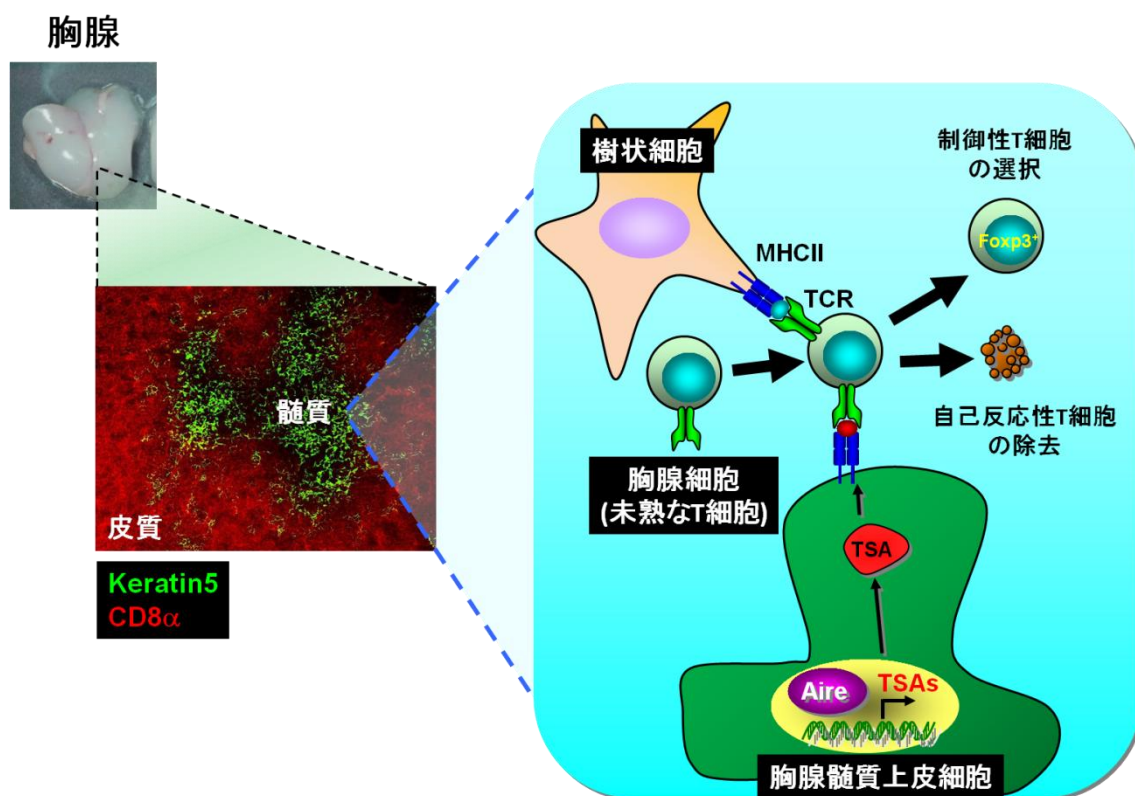


図 1 胸腺髄質における自己反応性 T 細胞の除去と制御性 T 細胞の選択

胸腺は皮質(CD8αを発現する細胞の多い領域)と、髄質(Keratin5 陽性の胸腺髄質上皮細胞が局在し、CD8αを発現する細胞の少ない領域)に分かれる。T 細胞は胸腺内を皮質から髄質へ移動しながら分化する。

髄質では胸腺髄質上皮細胞が分化途中の胸腺細胞に組織特異的抗原(tissue specific antigen: TSA)を提示し、それらに反応する自己反応性 T 細胞を除去する。TSA の一部は Autoimmune regulator (Aire)によって発現が制御されている。樹状細胞も何らかの機構で TSA を提示すると考えられているが、詳細は明らかではない。

胸腺髄質では自己反応性 T 細胞の除去とともに、Aire 依存的に自己抗原を認識する Foxp3 陽性の制御性 T 細胞が選択されることが示唆されている。

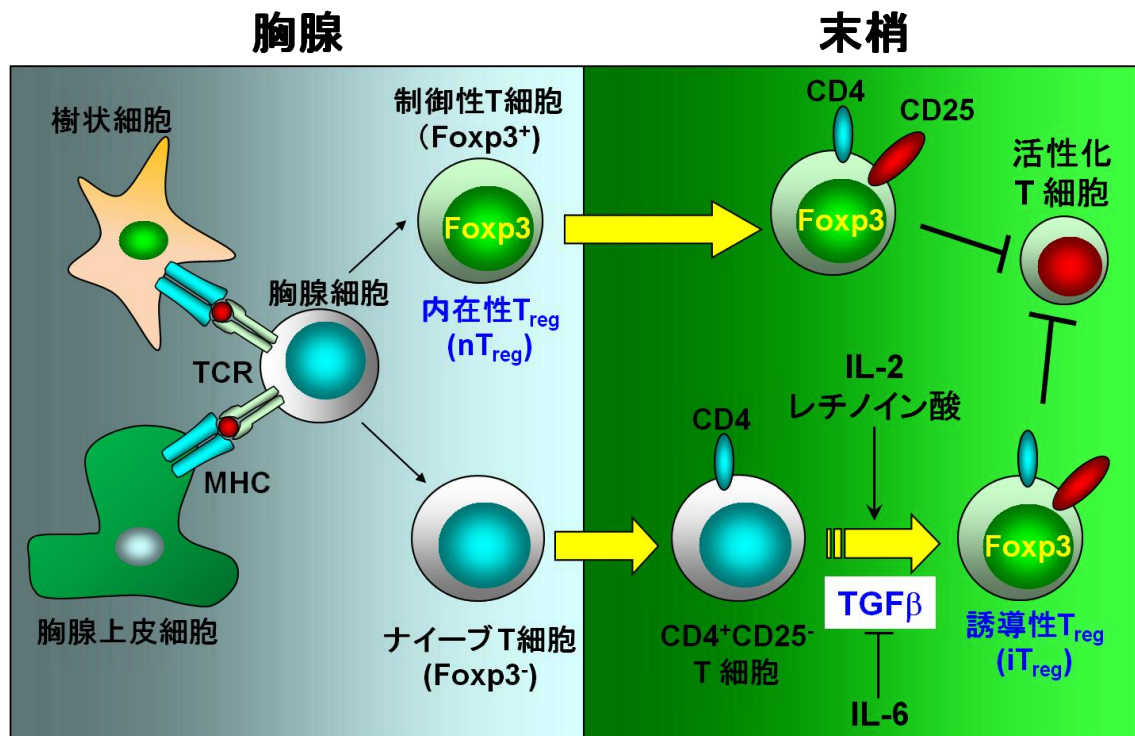


図 2 胸腺および末梢組織における制御性 T 細胞分化

制御性T細胞は分化する場所に応じて内在性と誘導性に分類される。内在性T<sub>reg</sub> (nT<sub>reg</sub>)は胸腺内で分化し、自己に対する生得的な免疫寛容を担う。

末梢組織でナイーブ T 細胞から抗原刺激や TGFβ 依存的に誘導される誘導性T<sub>reg</sub> (iT<sub>reg</sub>)は、抗原特異的な獲得性免疫寛容を担う。iT<sub>reg</sub> の分化は IL-2 やレチノイン酸で促進され、IL-6 によって阻害される。



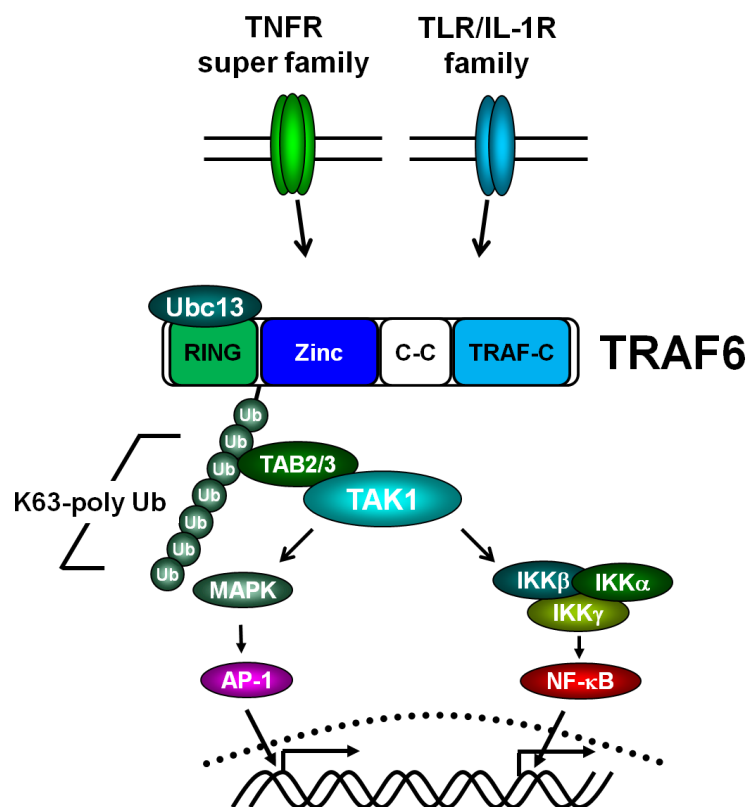


図 3 TRAF6 によるシグナル制御機構

TRAF6 は TNFR super family や TLR/IL-1R family からのシグナルを伝達し NF- $\kappa$ B や AP-1 の活性化を誘導する。

TRAF6 は N 末端から RING finger、Zinc finger、coiled-coil、TRAF-C ドメインを有する。coiled-coil および TRAF-C ドメインを介して受容体と結合し、RING、Zinc finger を介して下流のシグナルを活性化することで細胞増殖や細胞分化を制御する。

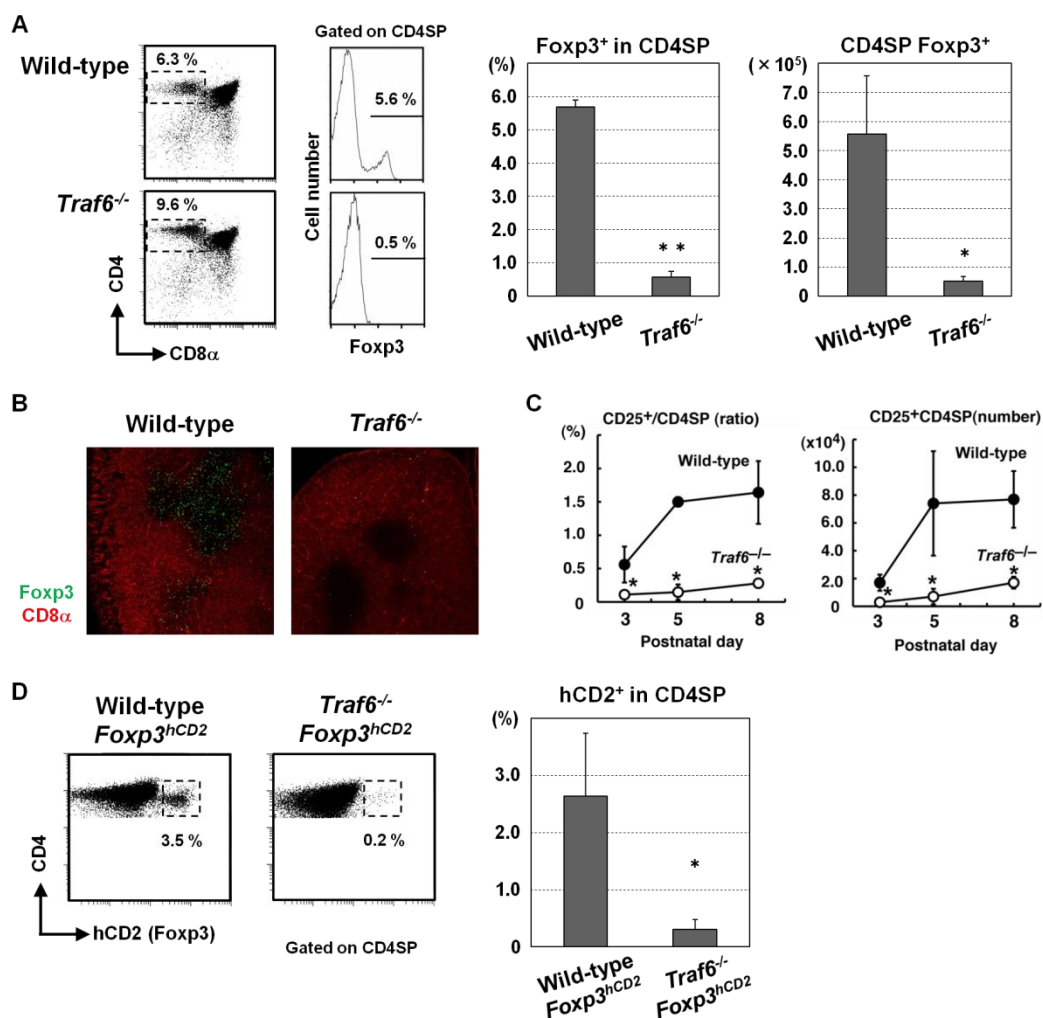


図 4 TRAF6 は制御性 T 細胞の胸腺内分化に必要である

A. 2 週齢の Wild-type および *Traf6*<sup>-/-</sup> マウスの胸腺内の細胞を抗 CD4、CD8 $\alpha$ 、Foxp3 抗体で染色し、フローサイトメトリーで解析した。CD4SP 細胞中の Foxp3<sup>+</sup> 細胞の比率(左)と CD4SP Foxp3<sup>+</sup> 胸腺細胞の絶対数(右)を示す。

(Wild-type; n = 3, *Traf6*<sup>-/-</sup>; n = 3) \*; p < 0.05, \*\*; p < 0.001

B. 野生型および *Traf6*<sup>-/-</sup> マウスの胸腺の組織切片を抗 Foxp3 (green)、CD8 $\alpha$  (red) 抗体で染色した。

C. 生後 3~8 日齢の Wild-type および *Traf6*<sup>-/-</sup> マウスの胸腺内の細胞を抗 CD4、CD8 $\alpha$ 、CD25 抗体で染色し、フローサイトメトリーで解析した。CD4SP 細胞中の CD25<sup>+</sup> 細胞の比率(左)と CD4SP CD25<sup>+</sup> 胸腺細胞の絶対数(右)を示す。 (Wild-type; n = 3, *Traf6*<sup>-/-</sup>; n = 3) \*; p < 0.05

D. 胎齢 15 日の Wild-type および *Traf6*<sup>-/-</sup> マウス (*Foxp3*<sup>hCD2</sup> バックグラウンド) の胸腺を 8 日間器官培養した。胸腺内の細胞を抗 CD4、CD8 $\alpha$ 、hCD2 抗体で染色し、フローサイトメトリーで解析した。CD4SP 細胞中の hCD2<sup>+</sup> 細胞の比率を示す。

(Wild-type *Foxp3*<sup>hCD2</sup>; n = 3, *Traf6*<sup>-/-</sup> *Foxp3*<sup>hCD2</sup>; n = 3) \*; p < 0.05

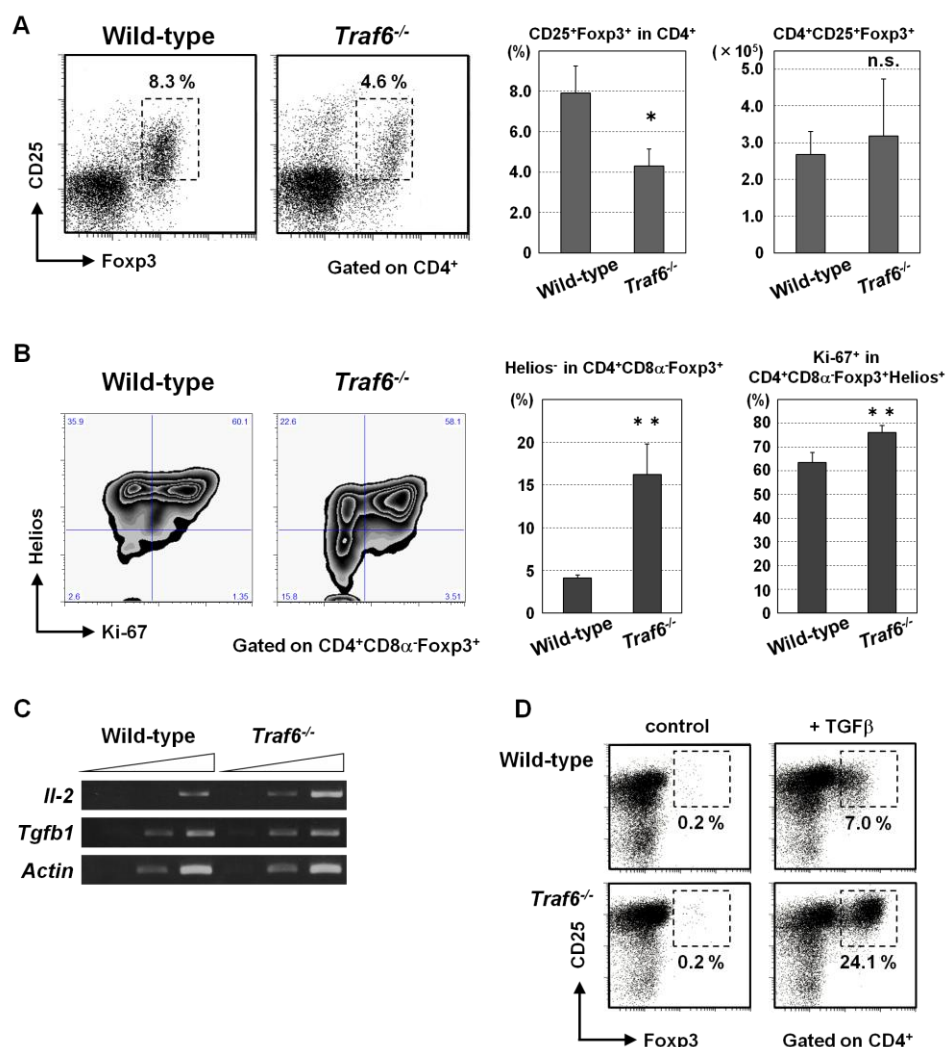


図 5 TRAF6 欠損マウスの末梢組織には野生型と匹敵する数の制御性 T 細胞が存在する

A. Wild-type および *Traf6*<sup>-/-</sup> マウスの脾細胞を抗 CD4、CD25、Foxp3 抗体で染色し、フローサイトメトリーで解析した。CD4<sup>+</sup>細胞中の CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞の比率(左)と絶対数(右)を示す。(Wild-type ; n = 3, *Traf6*<sup>-/-</sup>; n = 3) \*; p < 0.05, n.s.; not significant

B. Wild-type および *Traf6*<sup>-/-</sup> マウスの脾細胞を抗 CD4、CD8α、Foxp3、Helios、Ki-67 抗体で染色し、フローサイトメトリーで解析した。CD4<sup>+</sup>CD8αFoxp3<sup>+</sup>細胞中の Helios<sup>-</sup>細胞の比率(左)と CD4<sup>+</sup>CD8αFoxp3<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup>細胞中の Ki-67<sup>+</sup>細胞の比率(右)を示す。(Wild-type ; n = 4, *Traf6*<sup>-/-</sup>; n = 4) \*\*; p < 0.01

C. Wild-type および *Traf6*<sup>-/-</sup> マウスの脾臓から RNA を抽出し、IL-2、TGFβ1、β-actin の発現量を半定量的な RT-PCR で解析した。

D. Wild-type および *Traf6*<sup>-/-</sup> マウスの脾臓から CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を分離し、TGFβと IL-2 の存在下で抗 CD3/CD28 抗体を用いて刺激した。3 日後の細胞を抗 CD4、CD25、Foxp3 抗体で染色し、フローサイトメトリーで解析した。CD4<sup>+</sup>細胞中の CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞の比率を示す。

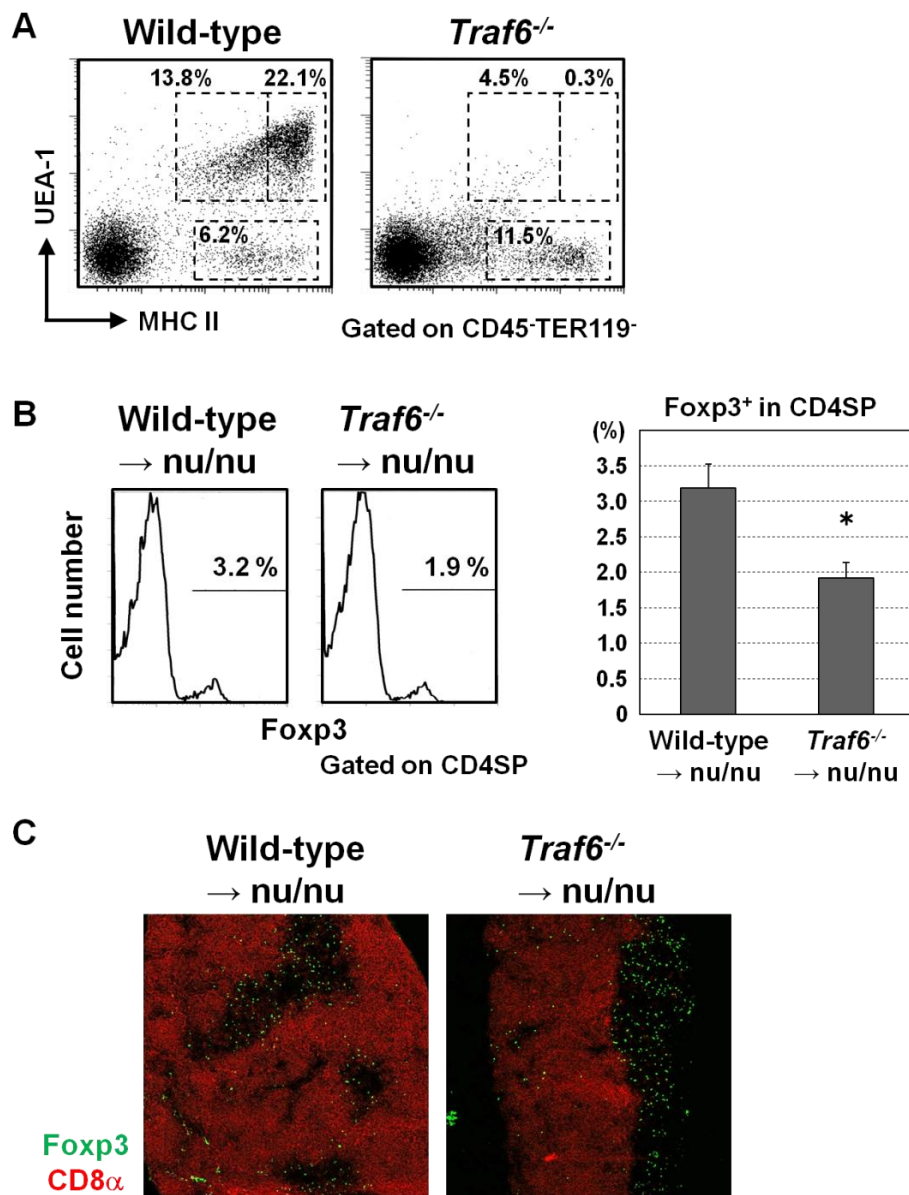


図 6 胸腺ストローマにおける TRAF6 は制御性 T 細胞分化に寄与するが、必須ではない

A. Wild-type および *Traf6*<sup>-/-</sup> マウスの胸腺をコラゲナーゼ処理し、抗 CD45、TER119、MHC class II 抗体、UEA-1 で染色した。CD45<sup>-</sup>TER119<sup>-</sup> ストローマ細胞における MHC class II と UEA-1 の発現を示す。

B. 胎齢 14 日の Wild-type および *Traf6*<sup>-/-</sup> 欠損マウスの胸腺を 2-DG 処理してリンパ球を除去後、ヌードマウスに移植した。8 週間後に移植した胸腺内の細胞を抗 CD4、CD8α、Foxp3 抗体で染色し、フローサイトメトリーで解析した。CD4SP 細胞中の Foxp3<sup>+</sup> 細胞の比率を示す。(Wild-type → nu/nu; n = 3、*Traf6*<sup>-/-</sup> → nu/nu; n = 3) \*; p < 0.05

C. B の胸腺の組織切片を抗 Foxp3 (green)、CD8α (red) 抗体で染色した。

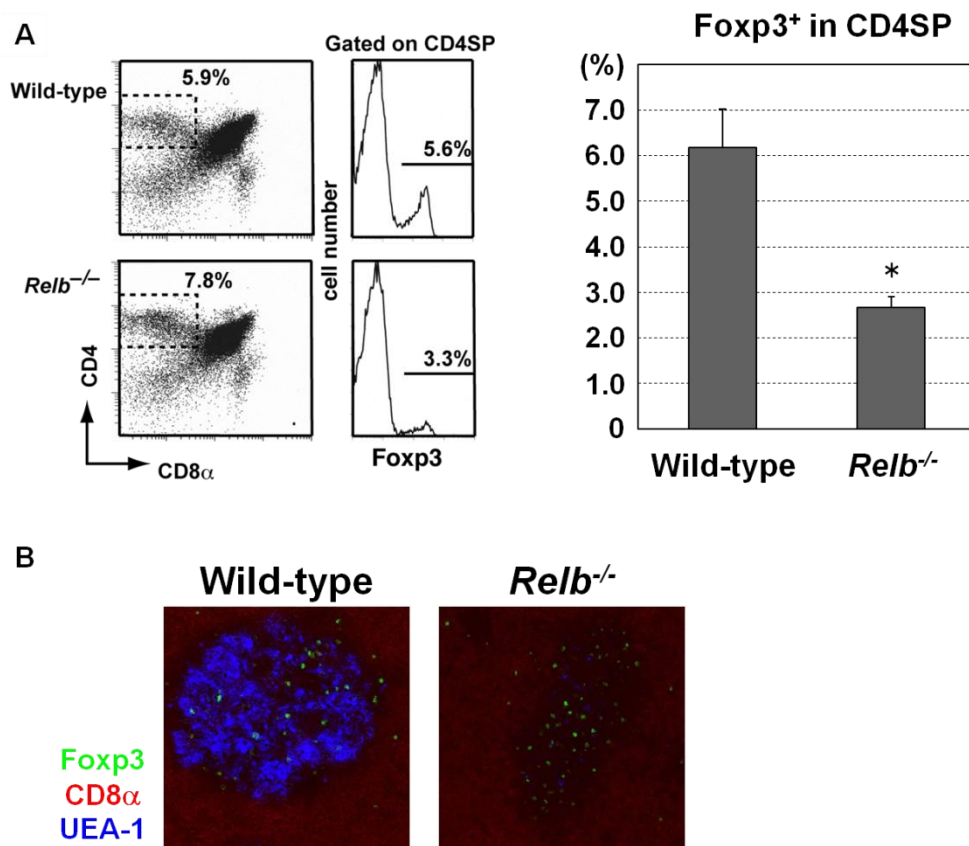


図 7 *RelB* 欠損マウスの胸腺における制御性 T 細胞分化

A. Wild-type および *Relb*<sup>-/-</sup> マウスの胸腺内の細胞を抗 CD4、CD8 $\alpha$ 、Foxp3 抗体で染色し、CD4SP 細胞中の Foxp3<sup>+</sup> 細胞の比率を解析した。

(Wild-type ; n = 3、*Relb*<sup>-/-</sup> ; n = 3) \*; p < 0.05

B. Wild-type および *Relb*<sup>-/-</sup> マウスの胸腺の組織切片を抗 Foxp3 (green)、CD8 $\alpha$  (red) 抗体と UEA-1 (blue) で染色した。

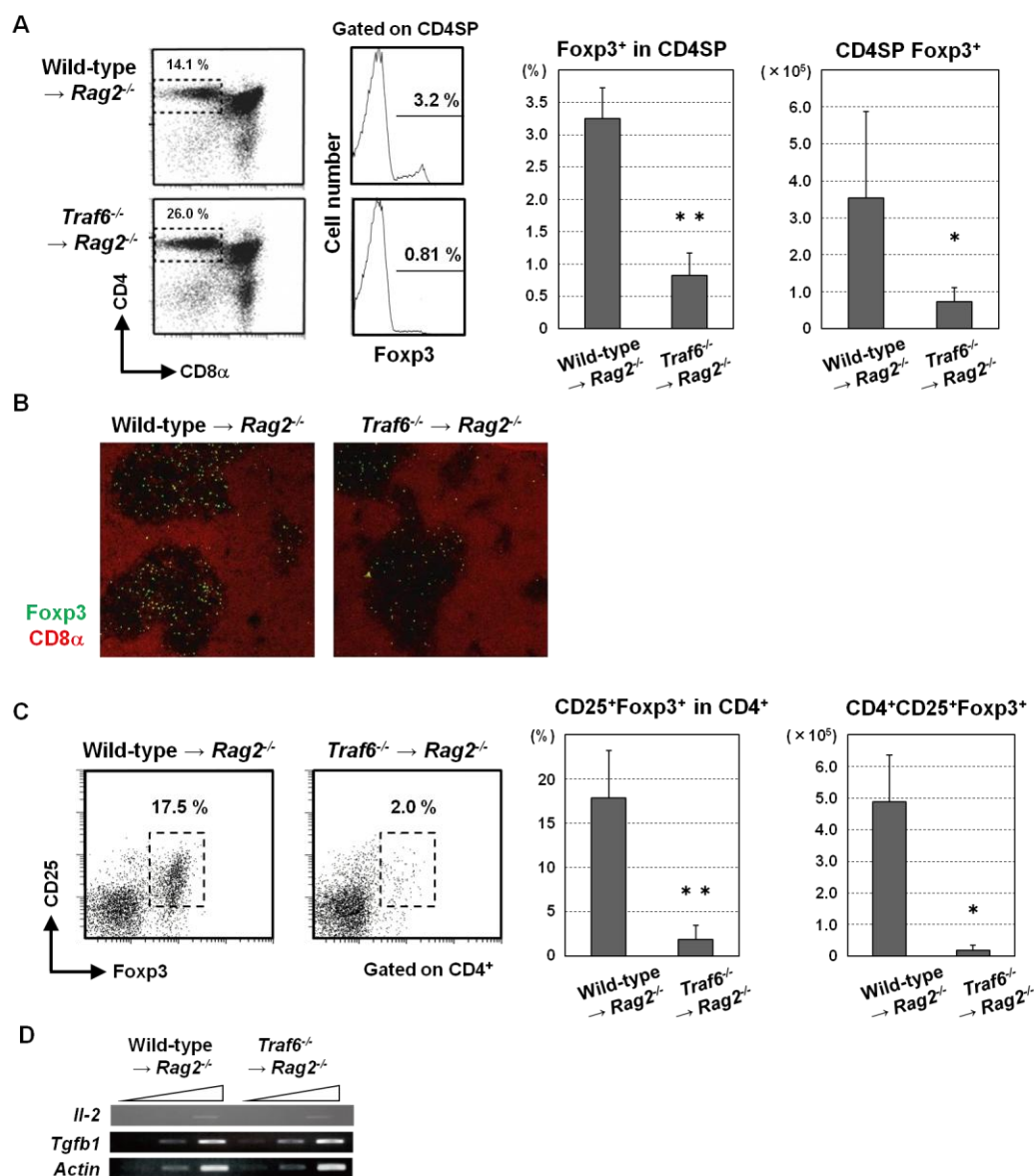


図 8 胎仔肝臓細胞由来の細胞における TRAF6 欠損により制御性 T 細胞の分化異常は生じる

A. Wild-type および *Trafb6*<sup>-/-</sup>胎仔肝臓細胞キメラマウスの胸腺内の細胞を抗 CD4、CD8 $\alpha$ 、Fxp3 抗体で染色し、フローサイトメトリーで解析した。CD4SP 細胞中の Fxp3<sup>+</sup>細胞の比率(左)と CD4SP Fxp3<sup>+</sup>胸腺細胞の絶対数(右)を示す。

(Wild-type  $\rightarrow$  Rag2<sup>-/-</sup>; n = 6、*Trafb6*<sup>-/-</sup>  $\rightarrow$  Rag2<sup>-/-</sup>; n = 6) \*; p < 0.05, \*\*; p < 0.01

B. A の胸腺の組織切片を抗 Fxp3 (green)、CD8 $\alpha$  (red) 抗体で染色した。

C. Wild-type および *Trafb6*<sup>-/-</sup>胎仔肝臓細胞キメラマウスの脾細胞を抗 CD4、CD25、Fxp3 抗体で染色し、フローサイトメトリーで解析した。CD4<sup>+</sup>細胞中の CD25<sup>+</sup>Fxp3<sup>+</sup>細胞の比率(左)と絶対数(右)を示す。

(Wild-type  $\rightarrow$  Rag2<sup>-/-</sup>; n = 3、*Trafb6*<sup>-/-</sup>  $\rightarrow$  Rag2<sup>-/-</sup>; n = 4) \*; p < 0.05, \*\*; p < 0.01

D. Wild-type および *Trafb6*<sup>-/-</sup>胎仔肝臓細胞キメラマウスの脾臓から RNA を抽出し、IL-2、TGF $\beta$ 1、 $\beta$ -actin の発現量を半定量的な RT-PCR で解析した。



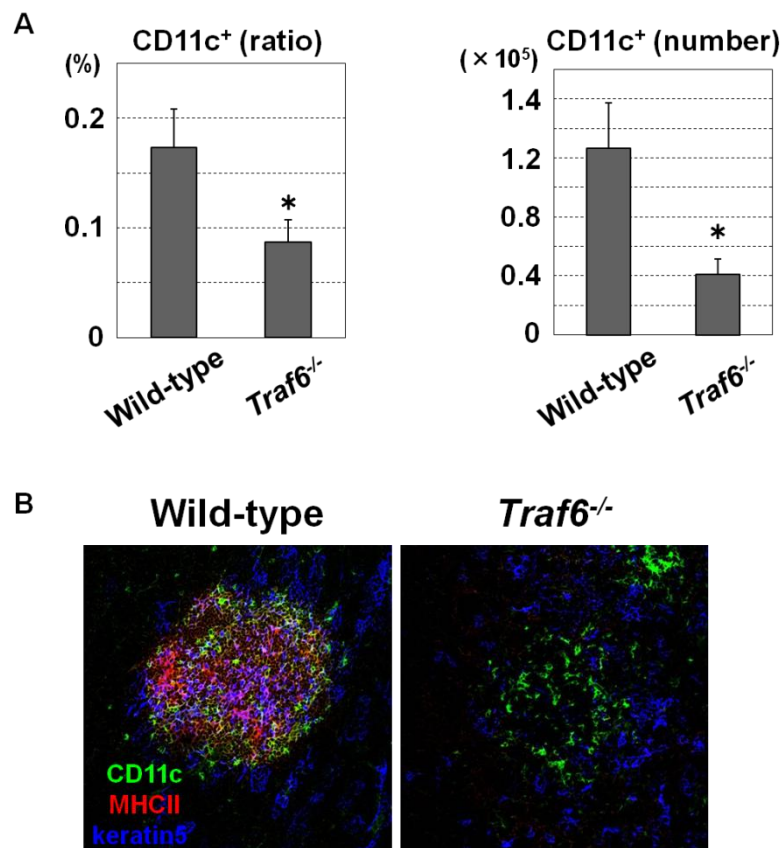


図 9 TRAF6 欠損による胸腺内の樹状細胞の減少

A. Wild-type および *Traf6*<sup>-/-</sup> マウスの胸腺をコラゲナーゼ処理後に抗 CD11c 抗体で染色し、フローサイトメトリーにより解析した。CD11c<sup>+</sup> 細胞の比率(左)と絶対数(右)を示す。

(Wild-type; n = 3、*Traf6*<sup>-/-</sup>; n = 3) \*; p < 0.05

B. Wild-type および *Traf6*<sup>-/-</sup> マウス胸腺の組織切片を抗 CD11c (green) 、MHC class II (red) 、Keratin5 (blue) 抗体で染色した。

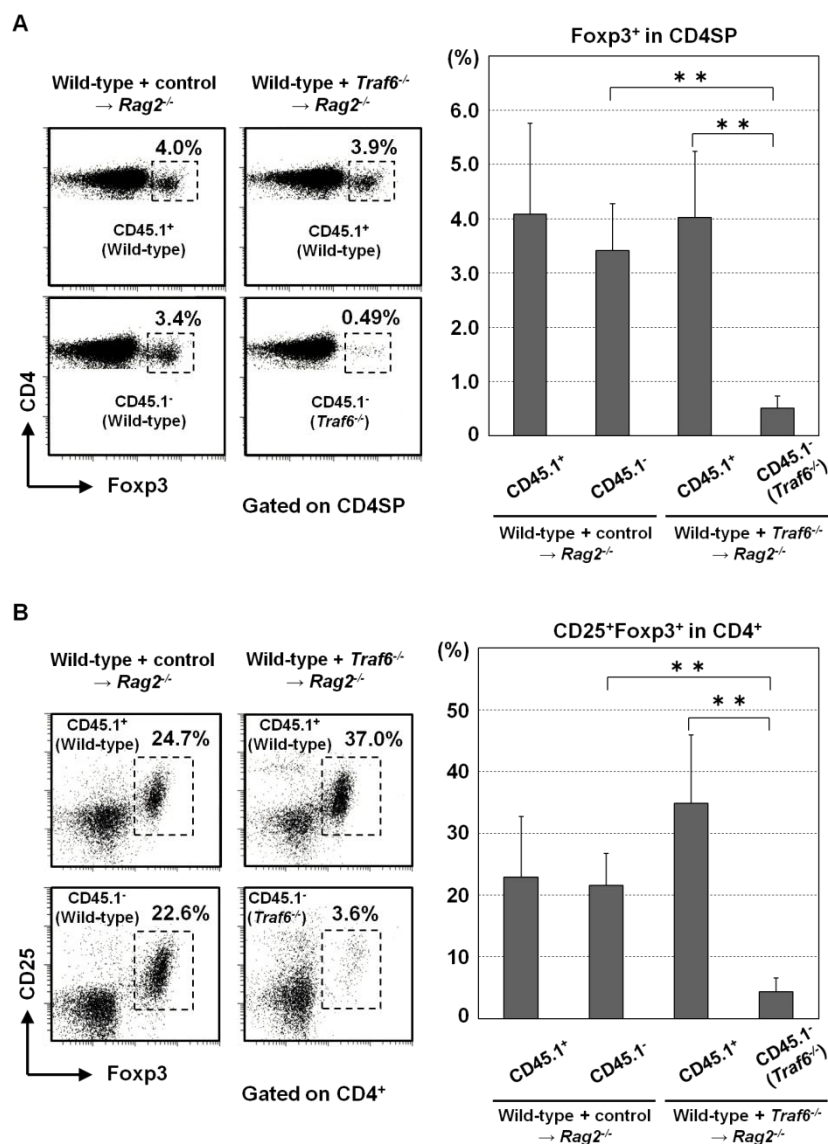


図 10 TRAF6 は胸腺細胞内で機能して制御性 T 細胞への分化を誘導する

Wild-type、*Traf6*<sup>+/-</sup> (control)および *Traf6*<sup>-/-</sup>胎仔肝臓細胞(CD45.2<sup>+</sup>)を congenic な Wild-type の胎仔肝臓細胞(CD45.1<sup>+</sup>)と混合し、*Rag2*<sup>-/-</sup>マウスに移植した。4~6 週間後に胸腺内の細胞と脾細胞を解析した。

A. 胸腺内の細胞を抗 CD45.1、CD4、CD8 $\alpha$ 、Foxp3 抗体で染色し、フローサイトメトリーで解析した。CD4SP (CD45.1<sup>+</sup>あるいは CD45.1<sup>-</sup>)細胞中の Foxp3<sup>+</sup>細胞の比率を示す。

(Wild-type + control  $\rightarrow Rag2^{-/-}$ ; n = 7、Wild-type + *Traf6*<sup>-/-</sup>  $\rightarrow Rag2^{-/-}$ ; n = 5) \*\*, p < 0.01

B. 脾細胞を抗 CD45.1、CD4、CD25、Foxp3 抗体で染色し、フローサイトメトリーで解析した。CD4<sup>+</sup> (CD45.1<sup>+</sup>あるいは CD45.1<sup>-</sup>)細胞中の CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞の比率を示す。

(Wild-type + control  $\rightarrow Rag2^{-/-}$ ; n = 9、Wild-type + *Traf6*<sup>-/-</sup>  $\rightarrow Rag2^{-/-}$ ; n = 5) \*\*, p < 0.01



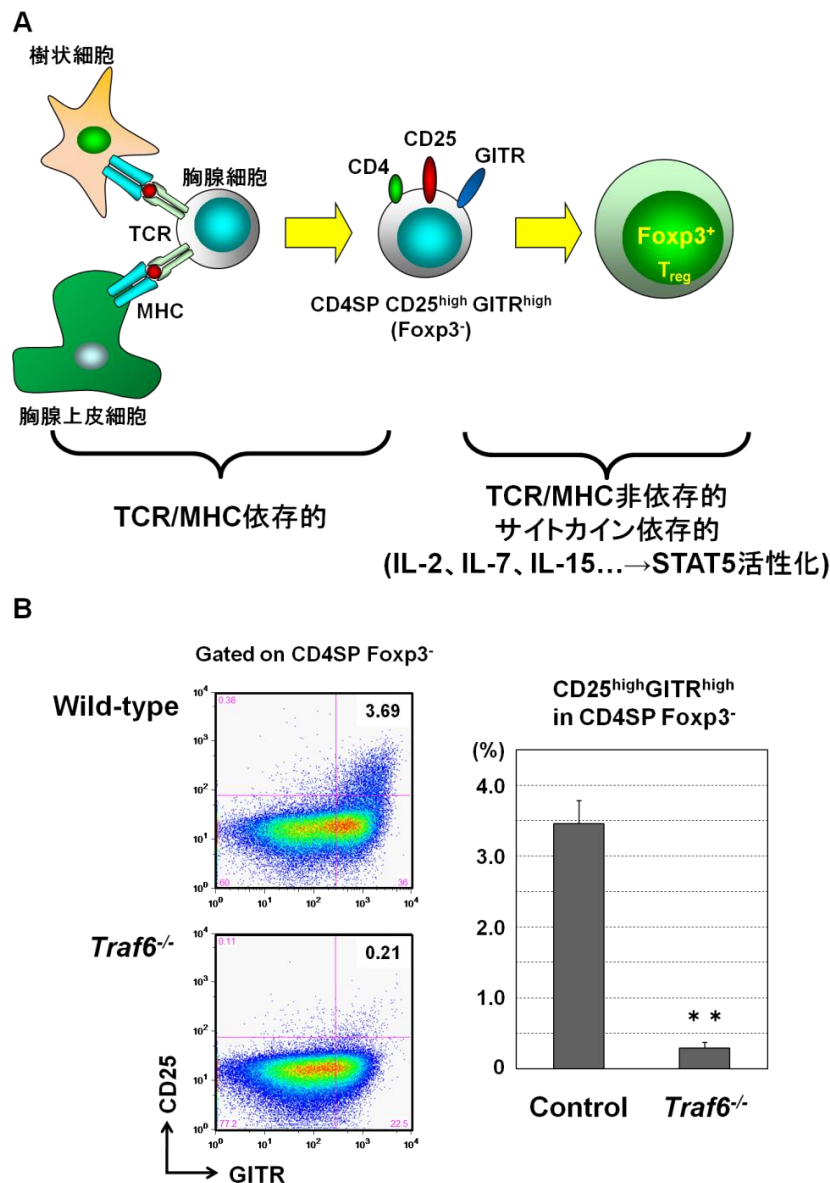


図 11 TRAF6 欠損マウスの胸腺では制御性 T 細胞の前駆細胞が大幅に減少する

A. 制御性 T 細胞の胸腺内分化のモデル。制御性 T 細胞の胸腺内分化は 2 段階で誘導されると考えられている。1 段階目では TCR/MHC 相互作用依存的に CD4SP CD25<sup>high</sup> GITR<sup>high</sup> Foxp3<sup>-</sup> 胸腺細胞が産生される。2 段階目でこの制御性 T 細胞の前駆細胞が、STAT5 を活性化する IL-2 などのサイトカインの刺激を受けることで Foxp3 を安定に発現し、分化が完了すると考えられている。

B. Wild-type、*Traf6*<sup>+/+</sup> (control) および *Traf6*<sup>-/-</sup> マウスの胸腺内の細胞を抗 CD4、CD8α、CD25、GITR、Foxp3 抗体で染色し、フローサイトメトリーにより解析した。CD4SP Foxp3<sup>-</sup> 胸腺細胞における CD25 と GITR の発現を解析し、CD25<sup>high</sup> GITR<sup>high</sup> の比率を測定した。

(Control; n = 3、*Traf6*<sup>-/-</sup>; n = 3) \*\*; p < 0.001

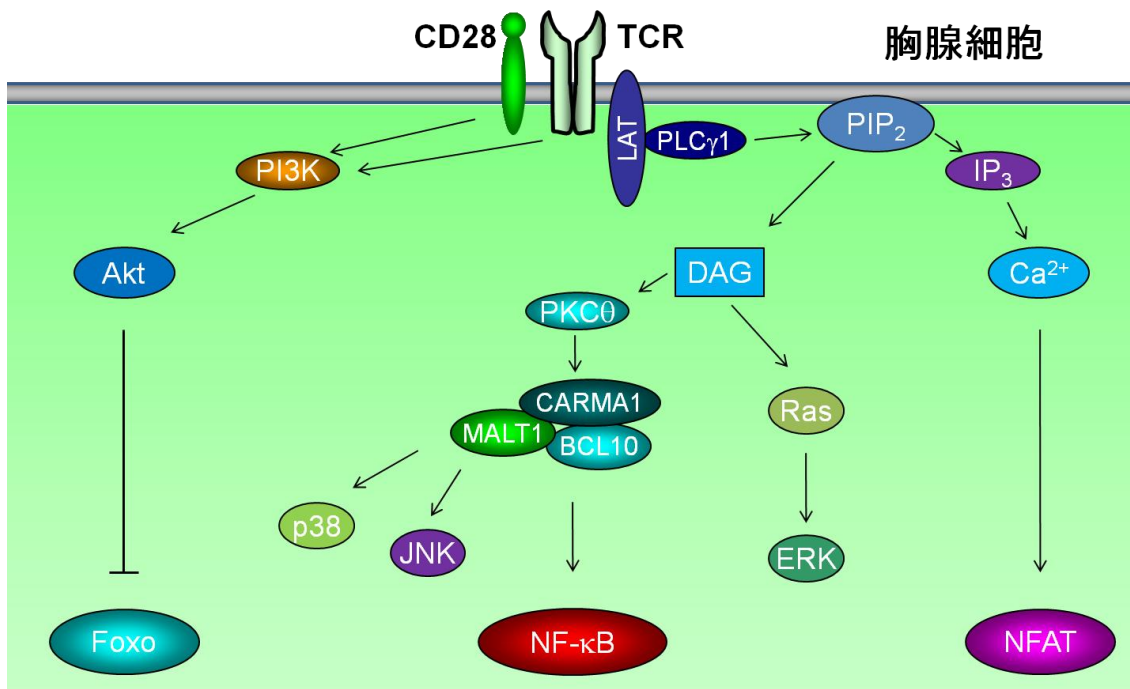


図 12 TCR の下流で活性化するシグナル

TCR 刺激依存的に受容体近傍の linker for activation of T cells (LAT) がリン酸化される。そのリン酸化部位に phospholipase C (PLC) $\gamma$ 1 が結合する。そして、活性化した PLC $\gamma$ 1 が phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) から inositol-1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) と diacylglycerol (DAG) を産生し、それぞれ Ca<sup>2+</sup> シグナルの活性化と extracellular signal-regulated kinase (ERK) などの MAP kinase 経路の活性化を誘導する。これらのシグナルは CD4SP 胸腺細胞の産生 (positive selection) に必要である。一方で、TCR 下流の p38 と c-Jun N-terminal kinase (JNK) の活性化は negative selection の誘導に寄与する。

TCR 下流の NF- $\kappa$ B の活性化には、PKC $\theta$  から CARMA1-BCL10-MALT1 complex (CBM complex) を介した IKK の活性化が必須である。

TCR の下流では PI3K-Akt の経路も活性化する。この経路の下流では、転写因子 Foxo が抑制的に制御されている。

TCR 下流で活性化するシグナルのうち、これまでに PKC $\theta$ -CBM complex-NF- $\kappa$ B、Ca<sup>2+</sup>-NFAT、PI3K-Akt-Foxo の経路は制御性 T 細胞の胸腺内分化に必要であることが明らかになっている。

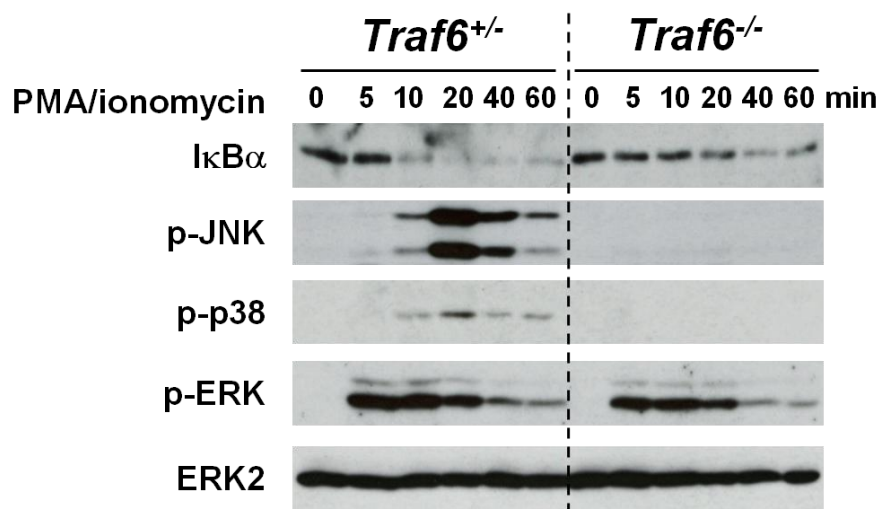


図 13 TRAF6 は PMA/ionomycin 刺激による NF- $\kappa$ B、JNK、p38 の活性化に必要である

Wild-type および *Traf6*<sup>-/-</sup> 胸腺細胞を PMA/ionomycin で刺激後にサンプルを回収し、抗 I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-JNK、p-p38、p-ERK、ERK2 抗体を用いてウェスタンブロッティングにより解析した。

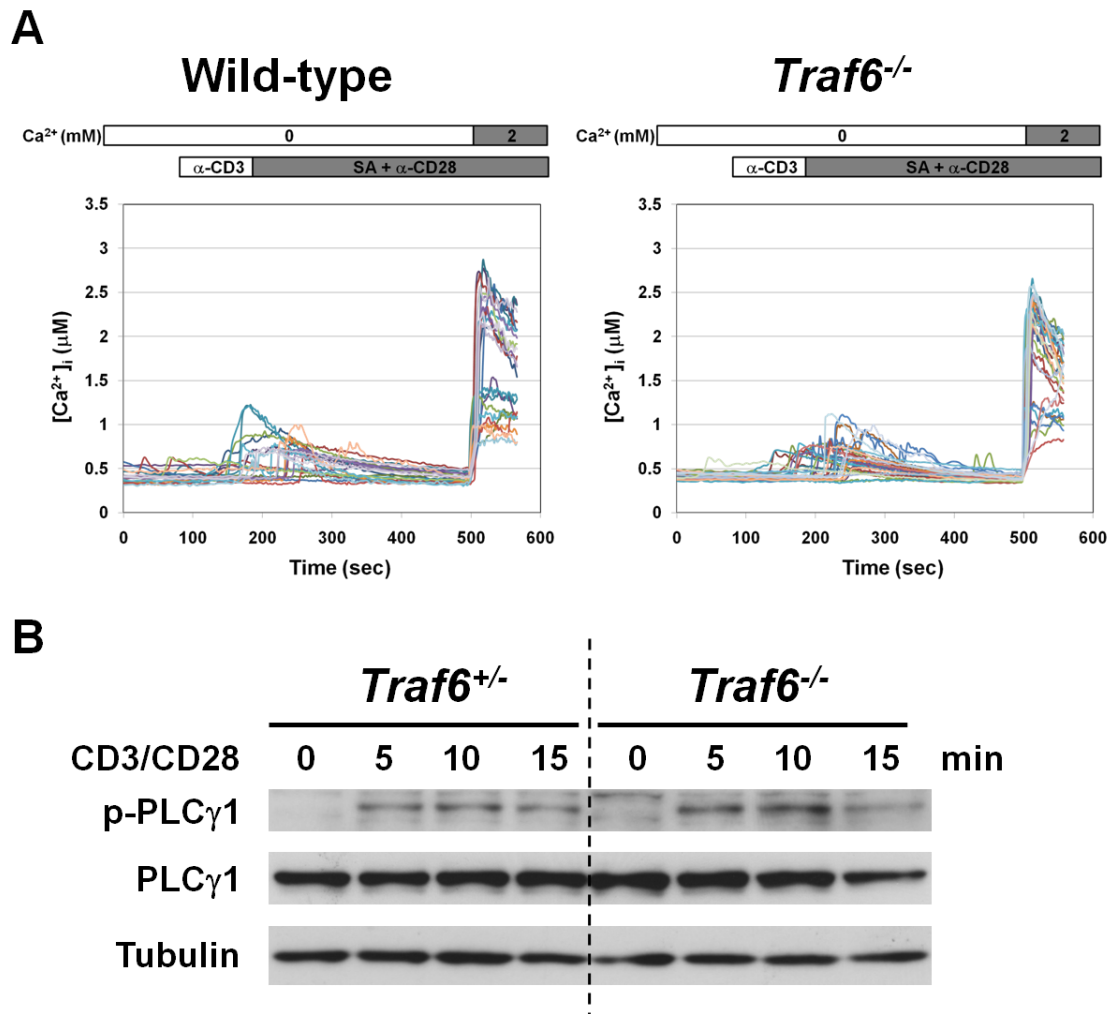


図 14 TRAF6 は TCR 刺激による  $\text{Ca}^{2+}$  の流入と PLC  $\gamma$ 1 のリン酸化には必要ない

A. Wild-type および *Traf6*<sup>-/-</sup> 胸腺細胞を抗 CD3/CD28 抗体で刺激し、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を解析した。

B. Wild-type および *Traf6*<sup>-/-</sup> 胸腺細胞を抗 CD3/CD28 抗体で刺激し、抗 p-PLCγ1、PLCγ1、Tubulin 抗体を用いてウェスタンブロッティングにより解析した。

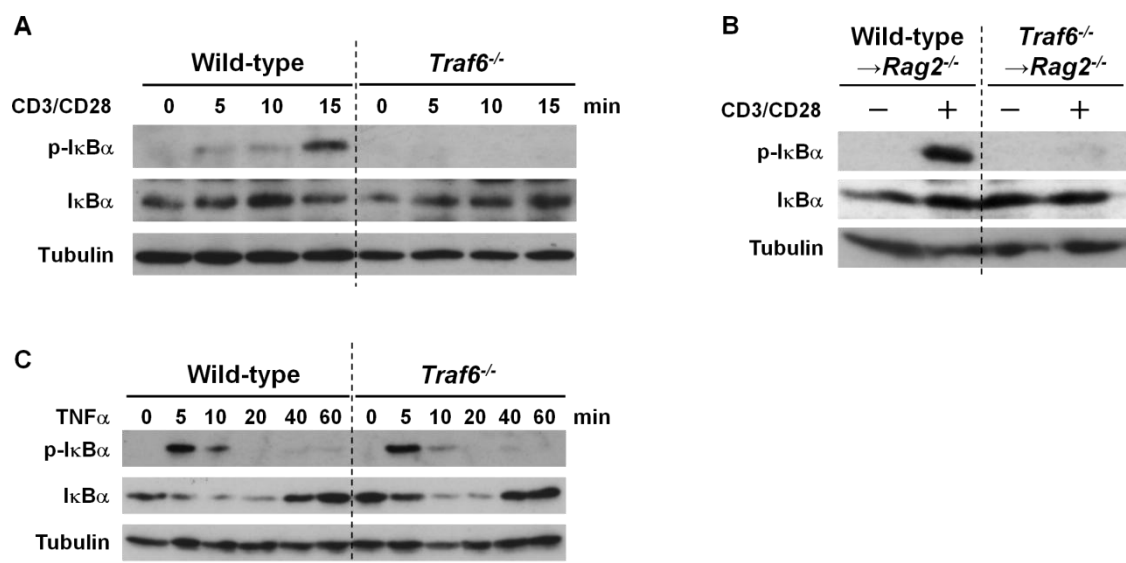


図 15 TRAF6 は TCR の下流で NF- $\kappa$ B の活性化を制御する

A. Wild-type および *Traf6*<sup>-/-</sup> 胸腺細胞を抗 CD3/CD28 抗体で刺激後にサンプルを回収し、抗 p-IκBα、IκBα、Tubulin 抗体を用いてウェスタンブロッティングにより解析した。

B. Wild-type および *Traf6*<sup>-/-</sup> 胎仔肝臓細胞キメラマウスの胸腺細胞を抗 CD3/CD28 抗体で 10 分間刺激後にサンプルを回収し、抗 p-IκBα、IκBα、Tubulin 抗体を用いてウェスタンブロッティングにより解析した。

C. Wild-type および *Traf6*<sup>-/-</sup> 胸腺細胞を TNFα で刺激後にサンプルを回収し、抗 p-IκBα、IκBα、Tubulin 抗体を用いてウェスタンブロッティングにより解析した。

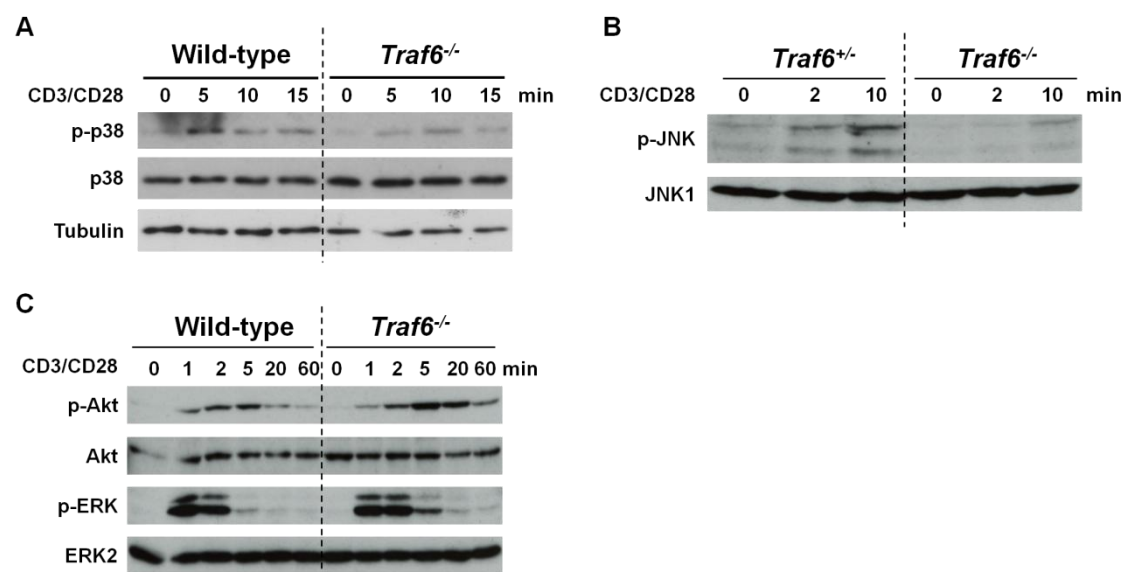


図 16 TRAF6 は TCR の下流で p38 と JNK の活性化を誘導し、Akt と ERK の活性化を抑制する

- A. Wild-type および *Traf6*<sup>-/-</sup> 胸腺細胞を抗 CD3/CD28 抗体で刺激後にサンプルを回収し、抗 p-p38、p38、Tubulin 抗体を用いてウェスタンブロッティングにより解析した。
- B. *Traf6*<sup>+/-</sup> および *Traf6*<sup>-/-</sup> 胸腺細胞を抗 CD3/CD28 抗体で刺激後にサンプルを回収し、抗 p-JNK、JNK、Tubulin 抗体を用いてウェスタンブロッティングにより解析した。
- C. Wild-type および *Traf6*<sup>-/-</sup> 胸腺細胞を抗 CD3/CD28 抗体で刺激後にサンプルを回収し、抗 p-Akt、Akt、p-ERK、ERK2 抗体を用いてウェスタンブロッティングにより解析した。

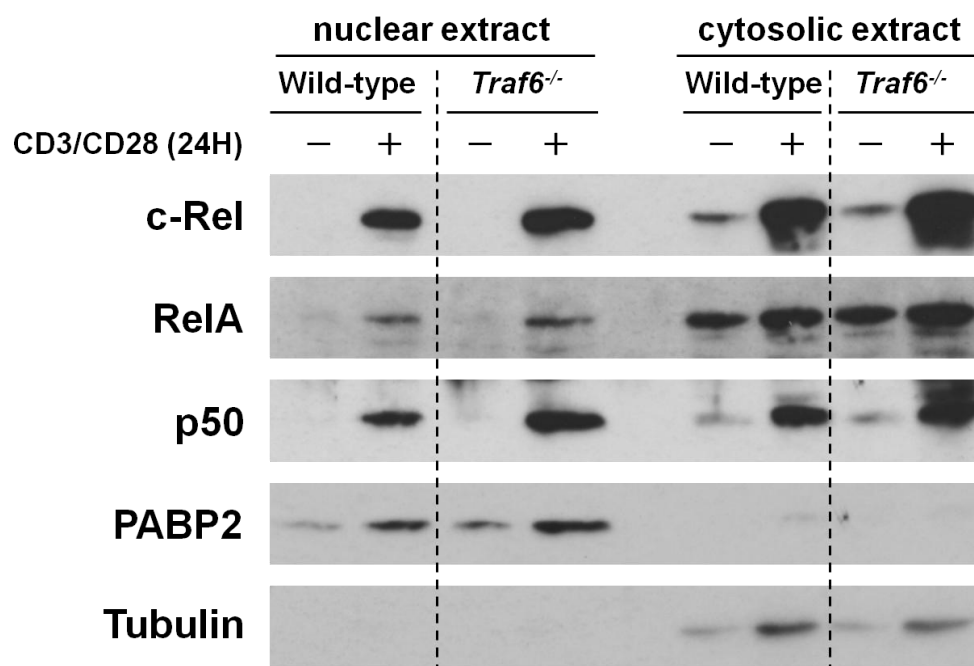


図 17 TRAF6 は持続的な NF- $\kappa$ B の活性化には必要ない

Wild-type および *Traf6*<sup>-/-</sup>CD4SP 胸腺細胞を分離し、抗 CD3/CD28 抗体で刺激した。24 時間後に細胞質溶液と核抽出液を回収し、抗 c-Rel、RelA、p50、polyA binding protein 2 (PABP2)、Tubulin 抗体を用いてウェスタンブロッティングにより解析した。

PABP2 は核、Tubulin は細胞質タンパクの loading control として用いた。

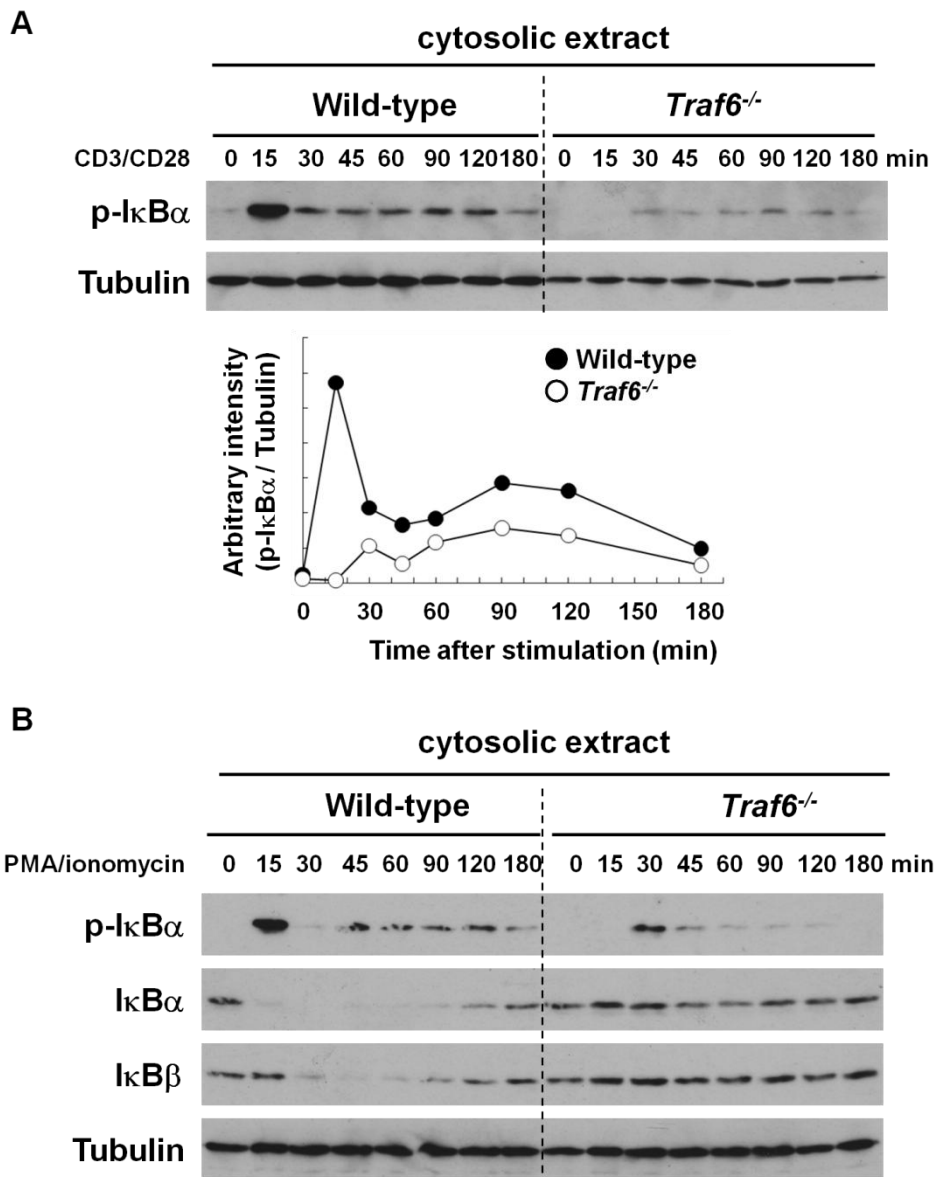


図 18 TRAF6 は TCR 刺激による NF- $\kappa$ B の迅速な活性化の誘導に必要である

A. Wild-type および *Traf6*<sup>-/-</sup> 胸腺細胞を抗 CD3/CD28 抗体で刺激後に細胞質溶液を回収し、抗 p-IκBα、Tubulin 抗体を用いてウェスタンブロッティングにより解析した。グラフは、p-IκBα および Tubulin のバンドの濃さを測定し、Tubulin に対する p-IκBα を定量した。

B. Wild-type および *Traf6*<sup>-/-</sup> 胸腺細胞を PMA/ionomycin で刺激後に細胞質溶液を回収し、抗 p-IκBα、IκBα、IκBβ、Tubulin 抗体を用いてウェスタンブロッティングにより解析した。



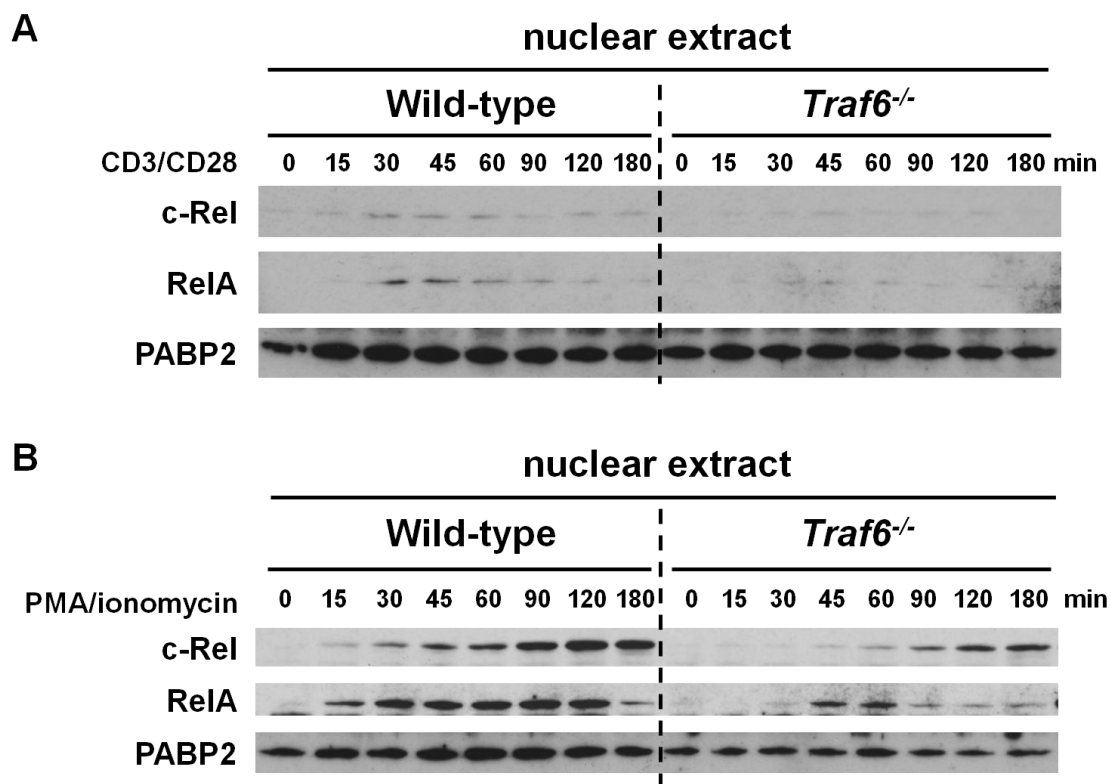


図 19 TRAF6 は TCR の下流における c-Rel と RelA の迅速な活性化に必要である

A. Wild-type および *Traf6*<sup>-/-</sup> 胸腺細胞を抗 CD3/CD28 抗体で刺激後に核抽出液を回収し、抗 c-Rel、RelA、PABP2 抗体を用いてウェスタンブロッティングにより解析した。

B. Wild-type および *Traf6*<sup>-/-</sup> 胸腺細胞を PMA/ionomycin で刺激後に核抽出液を回収し、抗 c-Rel、RelA、PABP2 抗体を用いてウェスタンブロッティングにより解析した。

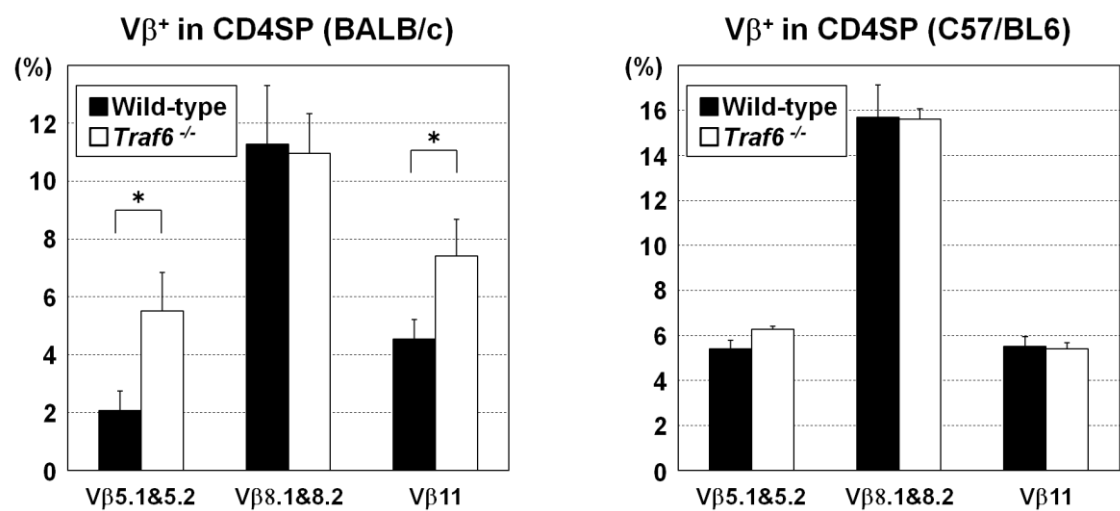


図 20 TRAF6 欠損マウスの胸腺では negative selection の異常が生じる

BALB/c (左)、C57/BL6 (右)バックグラウンドの Wild-type および *Traf6*<sup>-/-</sup>マウスにおける胸腺内の細胞を抗 CD4、CD8α、TCR Vβ抗体で染色しフローサイトメトリーで解析した。CD4SP 胸腺細胞中の Vβ陽性細胞の比率を示す。

BALB/c (Wild-type; n = 3、*Traf6*<sup>-/-</sup>; n = 3), C57/BL6 (Wild-type; n = 3、*Traf6*<sup>-/-</sup>; n = 3)

\*; p < 0.05

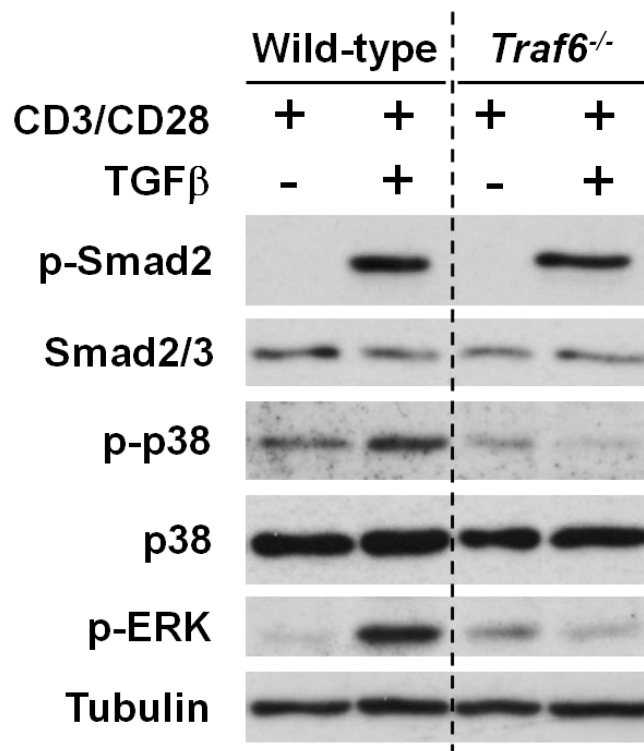


図 21 TRAF6 は TGFβ 刺激による Smad 非依存的な MAP kinase の活性化を制御する

Wild-type および *Traf6*<sup>-/-</sup> 胸腺細胞を TGFβ の存在下で、抗 CD3/CD28 抗体で刺激した。2 時間後にサンプルを回収し、抗 p-Smad2、Smad2/3、p-p38、p38、p-ERK、Tubulin 抗体を用いてウェスタンブロッティングにより解析した。

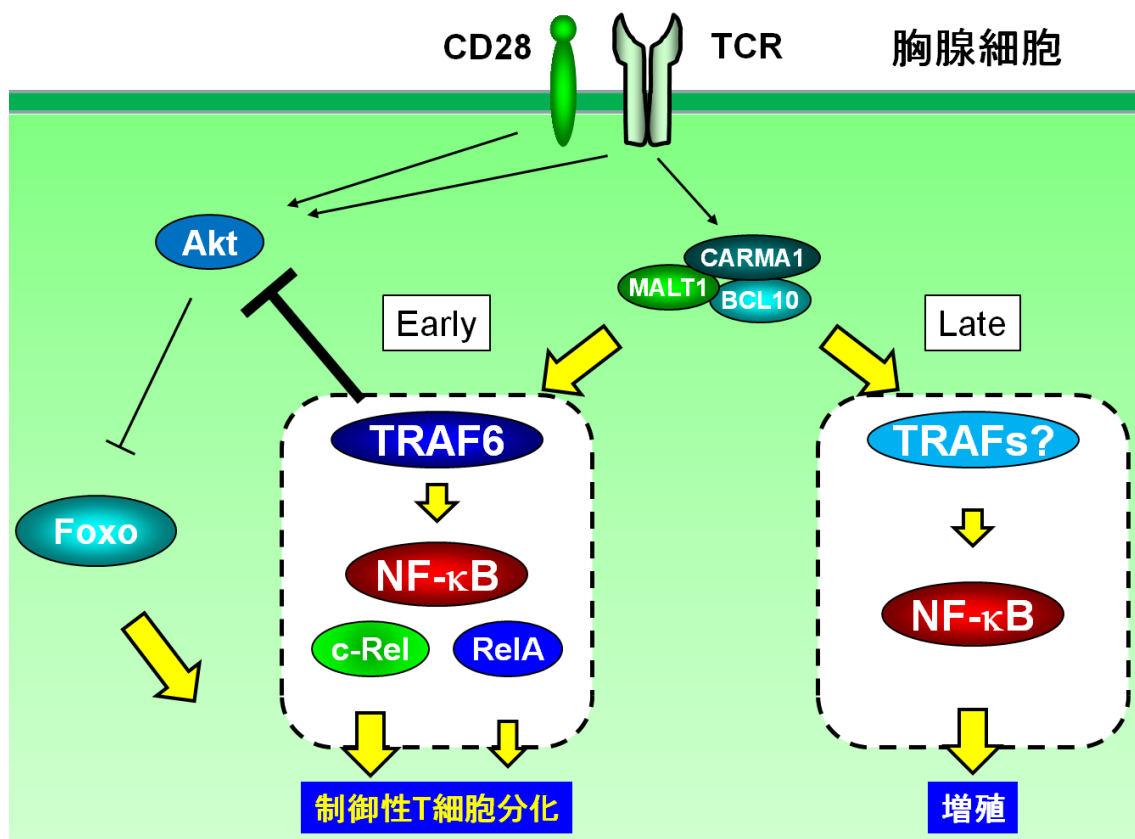


図 22 胸腺細胞内で制御性 T 細胞への分化を決定する TRAF6 依存的なシグナルのモデル

TRAF6 は胸腺細胞内で機能して制御性 T 細胞への分化を誘導する。TRAF6 は TCR の下流で Akt の活性化を抑制すると共に、NF- $\kappa$ B の迅速な活性化を誘導する。また、TCR 下流の NF- $\kappa$ B の活性化は TRAF6 依存性の異なる 2 つの経路に分かれており、TRAF6 依存性の低い後期の活性化は細胞増殖に十分である。一方で、c-Rel と RelA の迅速な核移行を誘導する TRAF6 依存性の非常に高い初期の活性化は制御性 T 細胞の胸腺内分化に必要である。分化途中の胸腺細胞内で、TCR シグナルが上記のように TRAF6 依存的に調節されることで、制御性 T 細胞への分化が決定されることが示唆された。

表1 TRAF6欠損がTCRシグナルに与える影響

Molecules and status	Ca <sup>2+</sup> influx	p-PLC $\gamma$ 1	p-I $\kappa$ B $\alpha$ (<15 min)	p-p38	p-JNK	p-Akt	p-ERK
Compared with control	→	→	↓↓↓	↓	↓↓	↑	↑

→, Normal; ↓, slightly affected; ↓↓, modestly affected; ↓↓↓, severely affected

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、多くの皆様より格別のご指導・ご支援を頂きました。  
ここに心より感謝の意を表します。

東京大学 医科学研究所 分子発癌分野

教授 井上 純一郎 博士

准教授 秋山 泰身 博士

助教 合田 仁 博士

助教 山口 憲孝 博士

早稲田大学 理工学術院 先進理工学部 生命医科学科

教授 仙波 憲太郎 博士

理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター

免疫恒常性研究ユニット

ユニットリーダー 堀 昌平 博士

また、日々の研究生活の中で数多く議論し、ご助言・激励を頂きました分子発癌分野の先輩・秦 俊文 博士、金野 弘靖 博士、石川 公輔 博士、松村 隆之 博士、伊藤 道恭 博士、田口 祐 博士、秋山 伸子 博士、山崎 孔輔 博士、仁科 隆史 博士、茂木 秀彦 博士、同期の大島 大輔 君、柴田 佑里 さん、呉羽 拓 君、山本 瑞生 君、後輩の皆様、そして実験の補助をして頂いた技術補佐員の箭内 洋見 さんに心よりお礼申し上げます。さらに、不肖な息子を常に暖かく見守ってくれた両親に深く感謝いたします。

最後に、本研究のために尊い犠牲となったマウスの存在をここに明記すると共に、深く哀悼の意を表します。