

審査の結果の要旨

氏名 森田 薫

本研究は全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) を始めとする自己免疫疾患の発症制御において、重要な役割を持つと考えられている転写因子 Early growth response gene (Egr) 2、Egr3 の機能を明らかにするために、T 細胞上で Egr2 を特異的に高発現している lymphocyte activation gene-3 (LAG3) 陽性 CD4 陽性 CD25 陰性制御性 T (LAG3⁺ Treg) 細胞に注目し解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. Egr2 は SLE の病態機序に密接に関係していることが近年報告されているが、SLE は抗 dsDNA 抗体を初めとする抗核抗体を産生し、液性免疫異常を引き起こす疾患であることより、本研究では Egr2 は液性免疫制御能を有する、つまり Egr2 を特異的に発現する LAG3⁺ Treg 細胞は液性免疫制御能を有するのではと仮説を立て実験を開始した。初めに LAG3⁺ Treg 細胞による抗体産生制御機能の有無に関して、*in vitro* で LAG3⁺ Treg 細胞及び B 細胞を抗体産生誘導下で共培養し解析を行った。その結果、LAG3⁺ Treg 細胞は B 細胞の増殖ならびに抗体産生を抑制し、GCB 細胞に特徴的な遺伝子発現も抑制した。このことより LAG3⁺ Treg 細胞は液性免疫を制御することが示唆された。
2. 次に、LAG3⁺ Treg 細胞による液性免疫制御において Egr2 の役割に関して検討を行った。Egr family の中で Egr3 も Egr2 と同様の機能を有し、Egr2 の機能を補完することも報告されていることから、LAG3⁺ Treg 細胞における Egr2 の機能を解析するために、T 細胞特異的 Egr2 コンディショナルノックアウト (Egr2 CKO) マウスおよび T 細胞特異的 Egr2、Egr3 ダブルコンディショナル (Egr2^{fl/fl} Egr3^{fl/fl} CD4-Cre⁺; Egr2/3 DKO) マウスを作製した。
3. Egr2/3 DKO マウスは Egr2 CKO マウスと比較して早期より SLE に特徴的な病態を呈し、さらに SLE の典型的な罹患臓器以外の広範囲な臓器への炎症細胞浸潤も認めた。このことより、T 細胞上の Egr2 発現、並びに Egr3 による Egr2 の機能補完作用は SLE を初めとする自己免疫疾患の発症制御において重要であると考えられた。
4. T 細胞における Egr2、Egr3 欠損の影響に関して二次リンパ組織内の T 細胞、B 細胞に関して解析を行った。その結果、Egr2 CKO マウスおよび Egr2/3 DKO マウスでは野生型 (wild type: WT) マウスと比較して、濾胞 T (follicular helper T: Tfh) 細胞および胚中心 B (germinal center B: GCB) 細胞の過形成を認め、Egr2/3 DKO マウスにおいてより強い傾向を認めた。こ

のことより T 細胞における Egr2、Egr3 発現は胚中心形成制御において重要な役割を果たしていることが示唆された。

5. Egr2/3 DKO マウスの胚中心形成異常が LAG3⁺ Treg 細胞の機能低下に依るものかどうか検討するために、WT マウスの LAG3⁺ Treg 細胞を Egr2/3 DKO マウスに養子移入し、胚中心過形成の抑制効果に関して解析を行った。その結果、養子移入群では Tfh 細胞、GCB 細胞の過形成が有意に抑制された。この結果より、Egr2/3 DKO マウスでは LAG3⁺ Treg 細胞における機能異常が過剰な胚中心応答を導くと考えられた。
6. LAG3⁺ Treg 細胞の抑制性因子につきマイクロアレイにて遺伝子の網羅的解析を行った結果、*Tgfb3* (transform growth factor-beta 3) 遺伝子が特異的に高発現することが判明した。さらにタンパクレベルにおいても LAG3⁺ Treg 細胞は TGF-β3 を大量に産生することが ELISA にて明らかとなった。TGF-β3 及び液性免疫制御との関係は不明であったため、TGF-β3 による液性免疫制御に関して解析を行ったところ、TGF-β3 は *in vitro* において GCB 細胞の分化を抑制し、また Tfh 細胞の機能を抑制することが明らかとなった。
7. LAG3⁺ Treg 細胞における Egr2、Egr3 の機能および TGF-β3 との関係について解析を行った結果、LAG3⁺ Treg 細胞は Egr2、Egr3 依存性に TGF-β3 を分泌することが明らかとなった。また、pCAGGS-Tgfb3 プラスミドベクターを用いて TGF-β3 を Egr2/3 DKO マウスに導入した結果、Egr2/3 DKO マウスの GCB の過形成の抑制を認めた。このことより Egr2/3 DKO マウスにおける過剰な胚中心応答は Egr2、Egr3 を欠損した LAG3⁺ Treg 細胞の TGF-β3 産生障害が要因の一つであると考えられた。
8. 最後に、Egr2、Egr3 による TGF-β3 産生機序に関して解析を行った。LAG3⁺ Treg 細胞は Egr2、Egr3 を欠損しても *Tgfb3* mRNA の低下を認めず、Egr2、Egr3 は TGF-β3 の転写に直接関与せず、異なる機序で TGF-β3 の産生を制御していると考えられた。一方、latent TGF-β binding protein (LTBP) family は TGF-β と細胞内で結合し、細胞外への輸送や細胞外での貯蔵・活性化に働くタンパク質であるが、LTBP family のなかで LAG3⁺ Treg 細胞では *Ltbp3* mRNA の発現上昇を認め、Egr2、Egr3 欠損によりその発現は低下した。さらに *Ltbp3* siRNA によって、LAG3⁺ Treg 細胞の LTBP-3 発現をノックダウンしたところ、TGF-β3 分泌は顕著に低下した。これらの結果より、TGF-β3 の細胞外への分泌は LTBP-3 が必須であり、Egr2、Egr3 は LTBP-3 発現を誘導することで LAG3⁺ Treg 細胞における TGF-β3 分泌を制御していると考えられた。

以上、本研究は Egr2、Egr3 及び自己免疫疾患との関係に関して、LAG3⁺ Treg 細胞を中心に、T 細胞特異的に Egr2、Egr3 を欠損したマウスを用いて解析した結果、LAG3⁺ Treg 細胞は Egr2、Egr3 依存性に抑制性サイトカイン TGF-β3 を分泌し、TGF-β3 を介して液性免疫制御を行うことが明らかとなった。本研究は自己免疫疾患の病態機序における T 細胞上の Egr2、Egr3 の機能を明らかにしただけでなく、末梢で誘導される Treg 細胞の中で液性免疫制御機能を有する細胞を初めて同定し、さらに免疫学においてその役割が不明であった TGF-β3 に関して液性免疫制御機能を有することを明らかにした点で大変意義深く、SLE を含む自己抗体産生機序を介する自己免疫疾患の新規治療薬開発に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。