

全身性自己免疫制御における  
自己反応性 T 細胞の新たな分化経路の解明

綾部（赤平）理紗

## 目次

要旨	1
序文	2
方法	
マウス	5
T 細胞の分離	6
マイクロアレイ	7
細胞増殖アッセイ	7
T 細胞の移入	8
共培養	8
IgG、IgM、IgA の ELISA による測定	9
OVA peptide 刺激培養	11
Flow cytometry	11
細胞ソーティング	13
組織の蛍光免疫染色	14
蛍光抗体法による抗核抗体の検出	14
RT-PCR	15
ヒト血液からのリンパ球分離	15
結果	
RDBLSf マウスの系の樹立	17
RDBLSf マウスの組織学的評価	17
RDBLSf マウスにおける自己反応性 T 細胞の出現	18
RDBLSf マウス T 細胞における Treg 細胞に特徴的な表面分子の有無	19
RDBLSf マウス T 細胞に特徴的な表面分子・転写因子の同定	20
RDBLSf マウスの T 細胞のサイトカイン産生能	21
RDBLSf マウスの T 細胞の in vitro での増殖反応	23
RDBLSf マウスの T 細胞の生体内 in vivo での増殖能	24
IL-10 欠損 RDBLSf マウスの T 細胞や組織学的評価	25
RDBLSf マウスの T 細胞の抗体産生誘導能	26
DBL マウスにおける natural Tfh 細胞の分化と自己反応性の検討	28
natural Tfh 細胞の生体内での germinal center 形成や抗体産生における役割	29
WT マウスにおける natural Tfh-like 細胞の分化	30
Bcl-6 欠損マウスでの natural Tfh 細胞の解析	32
健常ヒトにおける natural Tfh-like 細胞の解析	33
考察	34
謝辞	42
参考文献	43
図・表	51

## 要旨

膠原病では全身性自己免疫が病因に関わっており、自己反応性 T 細胞の制御機構の理解は病態解明や治療に重要である。本研究は自己反応性 T 細胞産生マウスを解析し、新たな自己反応性制御機構を検討した。その結果、既知の細胞除去と制御性 T 細胞への分化以外に、自己反応性 T 細胞が胸腺で anergic な IL21 産生 follicular helper T 細胞 (Tfh 細胞) に分化する新たな経路の存在が判明した。本細胞は従来の Tfh 細胞と比べ、自己抗原認識、CXCR5 陰性、胸腺分化の点が異なるが、多くの表面分子や転写因子は共通することから新規の natural Tfh 細胞と名付け、野生型マウスやヒトでの存在も確認した。

## 序文

生体は様々な外来抗原への反応を可能にするため、多様な T 細胞受容体および B 細胞受容体を作り出す獲得免疫を持っている。一方、そのことにより自己反応性リンパ球が同時に出現するリスクが常に内在している。しかし、自己免疫疾患を発症せずに通常いられるのは、T 細胞や B 細胞のような抗原特異的認識系を有する獲得免疫系が自己抗原に対して反応しなくなる状態、すなわちセルフトレランスを誘導、維持できているからである。トレランスは、主に胸腺における全身性自己抗原に対する中枢性 T 細胞トレランスと末梢自己抗原や食事抗原などに対する末梢性 T 細胞トレランスに分類される。これまで明らかになっているセルフトレランスのメカニズムとして、Burnet の提唱した clonal selection theory(1) として知られる自己反応性 T 細胞が胸腺において negative selection により除去される clonal deletion の機構と主に自己反応性 T 細胞と考えられている Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞(Treg 細胞)への分化とそれによる制御(2-6)が知られている。また、この他に anergy と呼ばれる抗原に対する低増殖反応性の機序も、主に in vitro の系で明らかにされている。ただし、in vivo での役割は superantigen の系などで示されているにすぎず(7, 8)、細胞機能、細胞表面マーカー、セルフトレランスにおける位置づけ、ヒトや野生型マウスでの同定や意義はほとんど明らかにはなっていない。

種々の遺伝要因や環境要因により、clonal deletion と Treg 細胞への分化というセルフトレランスの二大機序のメカニズムの破綻がおこると、免疫系による自己組織に対す

る過剰なもしくは不適切な免疫応答が生じ、自己免疫疾患を発症することが明らかになっている。

実際に、Fas の異常により clonal deletion が障害され lupus 様所見を呈する MRL/Fas<sup>lpr/lpr</sup> マウスの存在(9)や、ヒトでも Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS; 自己免疫リンパ球増殖症候群)が報告されている(10)。また、胸腺での negative selection に重要な役割を果たすと言われている AIRE の異常により、ヒトでは内分泌系の自己免疫疾患を呈する Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy (APCED; 自己免疫性多腺性内分泌疾患 I 型)の発症も知られている(11-13)。また、Foxp3 を機能的に欠失した場合は、マウスでは Scurfy マウスとなり消化管、内分泌系などあらゆる全身臓器に炎症を引き起こし致死的になり(14)、ヒトでも Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, and X-linked Syndrome (IPEX 症候群)を生じ慢性的な皮膚炎や難治性の消化器症状、内分泌系の自己免疫疾患、血球減少などを認め、早期に死亡する(15)。これらの疾患から、clonal deletion と Treg 細胞の二大機序がセルフトレランスにおいて重要であることが支持されている。実際にヒトでは全身性エリテマトーデス(SLE)、関節リウマチ、重症筋無力症、多発性硬化症、インスリン依存性の1型糖尿病などの様々な疾患で、自己反応性 T 細胞が発症、病態形成に関わっているという報告がされているが(16-22)、この二大機序の破綻や異常だけで病態、発症機序の全てを説明できるか不明である。また D.Mathis らは Foxp3 および AIRE を欠損したマウスの詳細な解析を通して未知のトレランスの機序が存在していること

を示している(23)。

そこで、本研究では、中枢性 T 細胞トレランスにおける clonal deletion と Treg 細胞への分化以外の新規経路、すなわち新たな中枢性 T 細胞トレランスの機構の有無を確認し、同時にその機構を明らかにすることを目的に実験を行った。

本研究では、まず全ての T 細胞が全身性自己抗原反応性となる遺伝子改変マウスを作製し、その T 細胞の挙動を解析することにより、新たな制御機構の有無を検討した。

その結果、自己反応性 T 細胞が胸腺において anergic だが IL-21 を産生して抗体産生誘導能を持つ follicular helper T 細胞 (natural Tfh 細胞と名付けた) に分化することが明らかになった。また本細胞は特殊な遺伝子改変マウスだけではなく、野生型マウス (WT) やヒトにおいても存在することが判明した。

従来の Tfh 細胞は外来抗原により末梢リンパ節で誘導され、表面分子として CXCR5、PD-1、CD200 を発現しており、転写因子として Bcl-6 をマスター遺伝子としている他 Helios を発現し(24, 25)、主に IL-21 を産生し Germinal Center の形成と B 細胞の抗体産生において中心的役割を担うことが知られている。一方で natural Tfh 細胞は自己抗原により胸腺で誘導され、CXCR5 が陰性である点が従来の Tfh 細胞とは異なっている。その他表面分子や転写因子は共通しており、主要サイトカインは IL-21 であり抗体産生誘導能を持つことから、Tfh 細胞類似の新たなサブセットであり、また中枢性 T 細胞トレランスにおける新規機構であると考えられた。

## 方法

### マウス

7-8 週齢のメスの BALB/c マウスは日本 SLC 社より購入した。RAG-2 欠損 BALB/c マウスと TCR $\alpha$  欠損 C57BL/6 マウスは Taconic Farms 社より購入した。また、Scurfy C57BL/6 マウス、Foxp3-GFP C57BL/6 マウス、Thy1.1 BALB/c マウス、IL-10 欠損 BALB/c マウスは The Jackson Laboratory より購入した。なお、Scurfy BALB/c マウス、Foxp3-GFP BALB/c マウス、TCR $\alpha$  欠損 BALB/c マウスは各々 Scurfy C57BL/6 マウス、Foxp3-GFP C57BL/6 マウス、TCR $\alpha$  欠損 C57BL/6 マウスと BALB/c マウスを 6 世代以上交配させて作製した。

Ld-nOVA トランスジェニックマウスは、Ld class I プロモーター、ヒト E $\mu$  エンハンサー下に核移行シグナルを付加したニワトリ卵白アルブミン(OVA)を組み込んだベクターを用いて当研究室にて作製された(26)。なお、Ld-nOVA BALB/c マウスは Ld-nOVA C57BL/6 マウスと BALB/c マウスを 8 世代以上掛け合わせて作製した(6)。

Bcl-6 欠損マウスは徳久先生（千葉大学大学院医学研究院分化制御学教室）より提供して頂いた。

すべてのマウスは Specific Pathogen Free 環境で飼育され、7-10 週の週齢のマウスを実験に用いた。本研究は東京大学第二種使用等拡散防止措置(部局承認番号 76-2)および動物実験計画（承認番号 医-P10-120）において承認を受け、東京大学のガイドラインに基づいて行った。

## T 細胞の分離

リンパ球分離は、マウスの脾臓を採取して70- $\mu$ mセルストレイナー(BD Bioscience, San Jose, CA)を用いて単細胞にしたのち、ACKバッファーにより溶血してsingle suspensionとした。CD4<sup>+</sup> T 細胞とCD19<sup>+</sup> B 細胞 はMiltenyi Biotec社のMACSシステムを用いて以下の手順により分離した。

T 細胞 はFITC標識抗CD4抗体 (GK1.5; BD PharMingen, San Diego, CA) 、PE標識抗CD25抗体 (PC61; BD PharMingen)と反応させ、洗浄後にanti-FITC microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)を結合させ、MACSシステムのMSカラム(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)を用いてポジティブセクションを行い分離した。得られたCD4<sup>+</sup> T細胞に結合しているanti-FITC microbeadsはFITC MultiSort kit(Miltenyi Biotec)により分離した。その後、anti-PE microbeadsと反応後にMSカラムを用い、CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T細胞 (Treg細胞) およびCD25<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> T細胞(Tconv細胞)を分離するため、ポジティブセクションをさらに行った。なお、Foxp3<sup>+</sup>制御性T細胞の多くはCD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T細胞であり、本研究ではFoxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>制御性T細胞をTreg細胞として扱い、一方Treg細胞を除いたT細胞をTconv細胞として扱った。

CD19<sup>+</sup> B 細胞は単細胞にした脾細胞をビオチン結合の抗CD19抗体(1D3; BD PharMingen)と反応させた後、streptavidin-microbeads(Miltenyi Biotec)と反応させ、MSカラムを用いポジティブセクションで分離回収した。



## マイクロアレイ

RDOSf マウスの脾臓から分離した  $CD4^+$  T 細胞と RDBLSf マウスの脾臓から分離した  $CD4^+$  T 細胞を Miltenyi Biotec 社にて fragmented cRNA に調製し、各々 Cy3、Cy5 の2色にラベルし Agilent Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies)のプロトコルに従い Whole Genome Oligo Microarrays にハイブリダイゼーションした。その後、Agilent's DNA microarray scanner(Agilent Technologies)で検出し、Agilent Feature Extraction software にて発現遺伝子レベルを比較解析した。

## 細胞増殖アッセイ

10 $\mu$ g/ml に希釈した抗 CD3 抗体を予め 4°Cで一晩定着させた 96well flat-bottom plate を用いて、MACS で分離した RDBLSf マウス由来の  $CD4^+$ T 細胞 (1X10<sup>5</sup>cells/well)、RDOSf マウス由来の  $CD4^+$ T 細胞 (1X10<sup>5</sup>cells/well)、野生マウス (WT) の Treg 細胞 (1X10<sup>5</sup>cells/well)、WT の Tconv 細胞 (1X10<sup>5</sup>cells/well) の刺激を行った。同様に 96well round-bottom plate で RDBLSf マウス由来の  $CD4^+$ T 細胞(3X10<sup>4</sup>cells/well)、RDOSf マウス由来の  $CD4^+$ T 細胞 (3X10<sup>4</sup>cells/well)に X 線照射した APC 細胞(1X10<sup>5</sup>cells/well)を加えて、final OVA 濃度 0.001 $\mu$ M、0.01 $\mu$ M、0.1 $\mu$ M で刺激を行った。また、96well round-bottom plate に前述の4種類の各細胞(3X10<sup>4</sup>cells/well)、さらに WT の Tconv 細胞 (3X10<sup>4</sup>cells/well)、X 線照射した APC 細胞(1X10<sup>5</sup>cells/well)、final 10 $\mu$ g/ml となるように希釈した抗 CD3 抗体を散布して、刺激を行った。以上のプレートを 48 時間 37°C5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した後、 [<sup>3</sup>H] チミジン 1 $\mu$ Ci/well のパルスで 16 時間行い、取り

込まれた $[^3\text{H}]$  チミジン量を測定し、細胞増殖能を評価した。

### T細胞の移入

Thy1.1<sup>+</sup> RDOSf マウスと Thy1.2<sup>+</sup> RDBLSf マウスの脾細胞から MACS にて分離した CD4<sup>+</sup> T 細胞を 1 対 1 で混合し、全部で  $5 \times 10^6$  cells に調製した。Carboxyfluorescein succinimidyl ester (以下 CFSE) (DOJINDO, 日本)にてラベルして Thy1.2<sup>+</sup> Ln-OVA マウスに腹腔内注射にて移入した。なお、CFSE のラベルは、 $5 \times 10^6$  cells の混合細胞を  $5 \mu\text{M}$  に希釈した CFSE 1mL と  $37^\circ\text{C}$  10 分間の条件下で反応させて行い、反応停止は  $4^\circ\text{C}$  PBS を使用した。

PD1 阻害実験においては、Thy1.1<sup>+</sup> RDOSf マウス CD4<sup>+</sup> T 細胞と Thy1.2<sup>+</sup> RDBLSf マウス CD4<sup>+</sup> T 細胞を 1 対 1 で混合し全部で  $2.5 \times 10^6$  cells に調製し、CFSE にてラベル後、Thy1.2<sup>+</sup> Ld-nOVA マウスに細胞移入時、抗 PD1 抗体( $200 \mu\text{g}/\text{mouse}$ ) (29F.1A12; Biolegend) を同時に腹腔内注射した(27)。尚、抗 PD1 抗体を加えない混合細胞のみの比較群も用意した。移入 4 日後にレシピエントマウスを解剖し、脾細胞から KJ1-26 陽性細胞を MACS にて分離し濃縮した後、CD4, KJ1-26, Th1.1, Thy1.2 と共に染色し CFSE の蛍光強度を FACS にて解析した。

### 共培養

MACSで分離したTconv細胞( $3 \times 10^4$ /well)、Treg細胞( $3 \times 10^4$ /well)、 RDBLSfマウス CD4<sup>+</sup>T細胞( $3 \times 10^4$ /well)もしくはRDOSfマウスCD4<sup>+</sup>T細胞( $3 \times 10^4$ /well)にBALB/cマウス

のB細胞( $2 \times 10^5$ /well)を加え、またRDBLSfマウスCD4<sup>+</sup>T細胞( $3 \times 10^4$ /well)においてはさらにTreg 細胞( $3 \times 10^4$ /well)を加えた群と加えない群で比較し、37度5% CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。10μg/mlに希釈した抗CD3抗体を予め4℃で一晩定着させた96well-round bottomのプレートで刺激を行い、培養液には10%FCS-RPMIを使用した。途中、培養2日目に培養中の細胞を回収し、RT-PCR（後述）にてB細胞のAID（activation induced cytidine deaminase）の発現を確認した。培養9日後には上清を回収し、IgG,IgM ,IgAの測定をELISAで行った。

#### IgG、IgM、IgAのELISAによる測定

IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgM, IgA の測定は mouse mono subclass isotyping kit (American Qualex International Inc, San Clemente, CA)を用いて行った。

0.03 M carbonate buffer (pH 9.6)で 100 倍希釈した goat capture Ab against mouse immunoglobulins を 50μl ずつ 96-well plates (Immulon4; Dynatech, Chantilly, VA)に分注し、4℃一晩静置して固相化した。

洗浄後に 1% BSA-0.05% Tween20-PBS で 2 時間ブロッキングした後、培養上清を 10%FCS-RPMI で段階希釈し 50μl/well ずつ常温、1 時間反応させた。ポジティブコントロールには Mouse Reference Serum (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX)を用いた。

一次抗体には rabbit-primary Abs against mouse IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgM, IgA (American Qualex International Inc)を用いて室温で 1 時間反応させた。二次抗体には

4000 倍希釈した HRP-secondary Abs against rabbit IgG (American Qualex International Inc) を用いて 45 分間反応、3,5,3',5'-tetramethylbenzidine (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)で発色させ、リン酸で発色を止めた後、波長 450nm で吸光度を測定した。

総 IgG と OVA 特異的 IgG の測定は mouse-IgG ELISA quantitation kit (Bethyl)を用いた。総 IgG 測定においては 0.03 M carbonate buffer (pH 9.6)で 100 倍希釈した goat anti-mouse IgG Fc affinity purified antibody 、OVA 特異的 IgG 測定においては 0.03 M carbonate buffer (pH 9.6)で 5 µg/ml に希釈した OVA を、50µl ずつ 96-well plates (Immulon4; Dynatech, Chantilly, VA)に分注し、4℃一晩静置して固相化した。洗浄後に 1% BSA-0.05% Tween20-PBS で 2 時間ブロッキングした後、各血清を PBS で段階希釈して 50µl/well ずつ常温、1 時間反応させた。ポジティブコントロールとして総 IgG には Standard IgG (Bethyl)を用い、OVA 特異的 IgG には arbitrary unit として OVA 免疫マウスの血清サンプルの希釈系列から得られた OVA 特異的 IgG の標準曲線を基準に用いた。45000 倍希釈した HRP-conjugated secondary Abs against mouse IgG (Bethyl Laboratories) に 45 分間反応、3,5,3',5'-tetramethylbenzidine (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)で発色させ、リン酸で発色を止めた後、波長 450nm で吸光度を測定した。

### OVA peptide 刺激培養

RDO マウス、RDBL マウスからの全脾細胞、また RDBL マウスから CD25 陽性細胞を MACS で除去した脾細胞を各々 OVA peptide (1 $\mu$ M)で刺激培養した。TGF- $\beta$  (2ng/mL) の有無の条件で分けて、24 well flat-bottom plate に 10%FCS-RPMI で調製した各細胞(100cells/well)を 1mL/well ずつ散布して 5 日間培養した後、培養細胞を回収・洗浄後、以下に示す方法でサイトカインの染色を行った。

### Flow cytometry

表面分子の染色は、細胞を4°Cに保ちつつ染色を行った。反応時のバッファー 3%bovine serum albumin, 0.05%NaN<sub>3</sub>-PBSを用いた。抗体添加後30分で洗浄し測定した。細胞内染色は表面分子染色後、4°Cに維持し、PE Anti-Mouse Foxp3 staining set (eBioscience)のプロトコルに従い、Fixation/Permeabilization working solution (eBioscience) に暗所にて45分間反応させた後、10倍希釈したPermeabilization Buffer (eBioscience) で洗浄し、その後、Foxp3などの転写因子に対する各抗体で染色を行った。

サイトカイン染色は、PMA(Phorbol 12-Myristate 13-Acetate)、ionomycin 、BDGolgiPlug<sup>TM</sup> containing brefeldin Aからなるleukocyte activation cocktail(BD Biosciences)で、分離した細胞を4時間刺激培養した後、表面分子染色後に室温にて Intracellular Fixation Buffer (eBioscience)で20分反応させ、その後Permeabilization Buffer

で洗浄し各サイトカインの抗体で染色を行った。使用した抗体は以下の通りである。

FITC 標識抗マウス抗体 (括弧内はクローン) : B220(RA3-6B2) BD Biosciences、  
CD3(145-2C11) BD Biosciences、CD4(L3T4, GK1.5) BD Biosciences、CD25(7D4) BD  
Bioscience、CD45RB(16A) BD Biosciences、CD90.1(OX-7) Biolegend、CD103(M290)  
BD Biosciences、CD200(OX-90) AbD Serotec、CXCR5(2G8) BD Biosciences、DO11.10  
TCR(KJ1-26) Biolegend、Helios(22F6) Biolegend

Alexa Fluor 488 標識抗マウス抗体 : Foxp3(FJK-16s) eBioscience、GL7(GL-7)  
eBioscience、IFN $\gamma$ (XMG1.2) Biolegend、IL4(11B11) Biolegend、IL10(JES5-16E3) Biolegend、  
IL17A(TC11-18H10.1) Biolegend、PD1(RMP1-30) AbD Serotec、

PE 標識抗マウス抗体 : Bcl6(GI191E) eBioscience、CD8a(53-6.7) BD Biosciences、  
CD25(PC61) BD Biosciences、CD62L(MEL-14) Biolegend、CD103(2E7) Biolegend、  
CD200(OX90) eBioscience、DO11.10TCR(KJ1-26) Biolegend、Foxp3(FJK-16s)  
eBioscience、GATA3(TWAIJ) eBioscience、GITR(DTA-1) Biolegend、Helios(22F6)  
Biolegend、ICOS(15F9) Biolegend、IL4(11B11) eBioscience、IL10(JES5-16E3) eBioscience、  
IL21(mhalx21) eBioscience、T-bet(ebio4B10) eBioscience、PD1(29F.1A12) Biolegend

TC(PE/Cy5)標識抗マウス抗体 : CD4(GK1.5) eBioscience、CD90.2(30-H12) Biolegend、  
Foxp3(FJK-16s) eBioscience、TCR $\beta$ (H57-597) eBioscience

Biotin 化抗マウス抗体 : CD3e(145-2C11) BD Biosciences、CD4(RM4-5) Biolegend、

CD8a(Ly-2 53-6.7) BD Biosciences、CD19(1D3) BD Biosciences、CD25(PC61) Biolegend、  
CD40L(MR1) BD Biosciences、CD200(OX-90) Biolegend、CXCR4(2B11/CXCR4) BD  
Biosciences、Fas (Jo2) BD Biosciences、GITR(DTA-1) Biolegend、ICOS(7E.17G9) Biolegend、  
OX40(OX-86) Biolegend、PD1(RMP1-30) Biolegend  
FITC 標識抗ヒト抗体：CD4(OKT4) Biolegend、CD25(BC96) Biolegend、Helios(22F6)  
Biolegend、PD1(EH12.2H7) Biolegend  
Alexa Fluor 488 標識抗ヒト抗体：Foxp3(150D) Biolegend  
PE 標識抗ヒト抗体：Foxp3(150D) Biolegend、Helios(22F6) Biolegend、PD1(EH12.2H7)  
Biolegend、  
PE/Cy5 標識抗ヒト抗体：CD4(OKT4) Biolegend  
PerCP/Cy5.5 標識抗ヒト抗体：CXCR5(TG2/CXCR5) Biolegend  
Biotin 化抗ヒト抗体：CD200(OX-104) Biolegend、PD1(ebioJ105) eBioscience  
その他 Streptavidin PE: BD Biosciences、Streptavidin ECD: Beckman Coulter、R-PE  
labeled pre-loaded murine CD1d tetramer: Proimmune

#### 細胞ソーティング

PD1<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞、Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞、PD1<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞を FACS  
ARIA<sup>TM</sup> II (BD Biosciences with Diva<sup>TM</sup> software)を用いて the manufacturer's protocol に  
従い分離ソートした。

### 組織の蛍光免疫染色

マウスの脾臓を OCT コンパウンド(サクラファインテック, 日本)に包埋したのち、液体窒素で急速に凍結した。これを薄切しアセトンで固定した。Protein Block serum-free(Dako, Real carpinteria, CA)で 10 分ブロッキング後、一次抗体を Antibody Diluent with Background Reducing Components(Dako)で 5 $\mu$ g/ml に希釈し室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、Dylight488 標識または Dylight594 標識または rhodamine でラベルされた 2 次抗体(Jackson laboratories, Baltimore, PA)と反応させた。二重染色では二次抗体の蛍光色を変えて同様の過程をもう一度行った。その後、Vectashield(Vector laboratories, Burlingame, CA)を用いて封入し、蛍光顕微鏡で観察した。なお、染色には抗 CD4 (RM4-5)抗体, 抗 Foxp3(FJK-16S)抗体, 抗 PD-1 抗体 (RMP1-30), PNA (Rhodamine labeled, Vector laboratories, Burlingame, CA)を用いた。

### 蛍光抗体法による抗核抗体の検出

抗核抗体の検出には、フルオロ HEPANA Test Kit (Medical and Biological Laboratories, Nagoya, Japan)内の HEp-2 細胞基質スライドを用いた。PBS を用いてマウス血清を段階希釈し、器質スライドの各 well に 40 $\mu$ l ずつ 30 分間反応させた。その後 PBS で洗浄し、二次抗体として 2 $\mu$ g/ml に希釈した anti-mouse IgG-Alexa 488 を 40 $\mu$ l ずつ遮光下で 30 分間反応させた。反応後に PBS で洗浄し、蛍光顕微鏡で観察した。



## RT-PCR

リンパ球サブセットを分離した後、RNeasy mini kit(QIAGEN, Valencia, CA)を用いて RNA を精製し、SuperScript™ III Reverse Transcriptase(Invitrogen, Carlsbad, CA)をプロトコルに従って cDNA を作成した。PCR では Primer として

GAPDH-forward:5'-GAAGGTCGGTGTGAACGGA-3',

GAPDH-reverse:5'-GTTAGTGGGGTCTCGCTCCT-3',

AID- forward:5'-GACTTCGGCCACCTTCGCAACA-3'

AID-reverse:5'-TGACGCGGTAACACCGGCCC-3'

Bcl-6-forward:5'-GCCCCACTGACCCGAAAGCC-3',

Bcl-6-reverse:5'-GCCTGCCAGGGACCTGTTCAC-3',

IL-21-forward:5'-ATCCTGAACTTCTATCAGCTCCAC-3',

IL-21-reverse:5'-GCATTAGCTATGTGCTTCTGTTC-3',

Helios-forward:5'-TAAGCTCAGCTTATTCTCAGGTCTATCA-3',

Helios-reverse:5'-ATGTTGTTTTTCGTGACTATCAGATGTT-3'

を用い、denature : 94℃30秒、annealing : 61℃30秒、elongation : 72℃45秒を1 cycle としたPCRを行った。

## ヒト血液からのリンパ球分離

同意の得られたヒトより採血しPBSにて2倍希釈した血液をプロトコルに従いFicoll

Hypaque (Amersham Biotech. Uppsala, Sweden)に重層し、その後、室温にて遠心し、比重勾配により中間層に分離されるリンパ球を回収した。

## 結果

### RDBLSf マウスの系の樹立

中枢性 T 細胞トレランスにおいて自己反応性 T 細胞の分化経路が clonal deletion や Treg 細胞以外に存在するかどうかを調べるために、以下のように RDBLSf マウスの系を樹立した。Rag2 を欠き TCR 改変が生じず自己反応性 T 細胞が非自己反応性 T 細胞に回避する経路が遮断され、かつ Foxp3 陽性制御性 T 細胞への分化経路が遮断された場合、出現してくる CD4<sup>+</sup>T 細胞の解析をすることで中枢性 T 細胞トレランスにおける新規分化経路を検討することが可能となる（図 1）。そこで、Rag2 を欠き TCR 改変が生じず、機能的 Foxp3 も欠く条件下で、全身性に核内に自己抗原 OVA を発現する Ld-nOVA トランスジェニックマウスと OVA 反応性 TCR 発現 DO11.10 トランスジェニックマウスを交配し、Treg 細胞への分化経路がない全ての CD4<sup>+</sup>T 細胞が全身性抗原に反応する系を樹立した(表 1)。

仮に自己反応性 T 細胞において clonal deletion と Treg 細胞への分化経路以外の機序がないとすれば、RDBLSf マウスではトレランスが失われているか、CD4<sup>+</sup>T 細胞が分化してこないことが想定されるため、次に示す RDBLSf マウスの組織学的評価や T 細胞の解析により新規分化経路の存在を検討することができる。

### RDBLSf マウスの組織学的評価

RDBLSf マウスは、出現してくる T 細胞は全て自己抗原反応性 T 細胞であり、機能的 Foxp3 も欠いているが、皮膚以外に臓器障害を来すことなく長期間生存できること

が本研究で明らかになった。

各代表的な臓器を HE 染色にて光学顕微鏡で観察したところ、唾液腺、肺、腎臓、胃、小腸、大腸などの臓器において炎症は認めなかった(図 2A)。

RDOSfマウスの皮膚は肉眼的にも顕微鏡的にも異常がないのに対して(図 2B 上段)、RDBLSfマウスの皮膚は肉眼的にも脱毛や炎症所見を認め顕微鏡で観察しても真皮に炎症細胞の浸潤を認め(図 2B 下段)、皮膚に関しては Treg 細胞の存在が重要であると推察された。以上より、RDBLSf マウスでは自己反応性の IL-21 産生 PD-1<sup>+</sup>CD200<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞が末梢に出現しているにもかかわらず、皮膚を除く各臓器でトレランスが保たれていることが分かった。

#### RDBLSf マウスにおける自己反応性 T 細胞の出現

RDBLSf マウスでは皮膚以外はトレランスが維持されていたにもかかわらず、RDBLSf マウスの胸腺と末梢にも、RDO マウス、RDBL マウス、RDOSf マウスと同様に、CD4 single positive T 細胞の出現が確認された (図 3A 上中段)。脾臓における CD4<sup>+</sup>T 細胞数は 4 回行った同様の実験結果を平均化すると RDBLSf マウスが  $4.3 \times 10^5$  個/匹、RDOSf マウスが  $4.2 \times 10^6$  個/匹、RDBL マウスが  $1.2 \times 10^6$  個/匹、RDO マウスが  $7.4 \times 10^6$  個/匹であった。尚、WT マウスの脾臓における CD4<sup>+</sup>T 細胞は平均  $1.2 \times 10^7$  個/匹であった。また、Treg 細胞に関しては RDBLSf マウスでは予想通り RDBL マウスと対照的に消失していた (図 3A 下段)。RDBLSf マウスの胸腺と末梢に出現してくる

CD4 single positive T 細胞は全て自己抗原反応性の T 細胞であり、機能的 Foxp3 を欠く状態でも、CD4<sup>+</sup>T 細胞は残存している clonal deletion の機構により減少しているものの分化してきていることが明らかになった。さらに組織学的には皮膚以外でトレランスが維持されており、中枢性 T 細胞トレランスにおいて clonal deletion や Treg 細胞への分化以外に新たな分化経路が存在することが示された。

しかし、RDBLSf マウスで分化してきている CD4<sup>+</sup>T 細胞が自己抗原を認識せずに存在している可能性も否定はできないため、抗原認識のマーカーを確認したところ RDBLSf マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞は CD45RB<sup>low</sup>CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup> の発現パターンであることから antigen-experienced の細胞であり、ignorant ではなく自己抗原を認識し反応性を有しながら選択されて末梢に出現していることが判明した(図 3B 左・中央)。

自己抗原反応性 T 細胞であることは RDOSf マウス、RDBLSf マウスにおいて核内 OVA 抗原に対する TCR クロノタイプを認識する抗体 KJ1-26 でモニタリングできるが、RDOSf マウス、RDBLSf マウスにおいて KJ1-26 陽性の T 細胞、すなわち自己抗原反応性 T 細胞が 90%以上であることが確認された (図 3B 右)。CD3、KJ1-26 は十分に発現されており、anergy の機序として報告されている TCR down regulation は生じていなかった。

#### RDBLSf マウス T 細胞における Treg 細胞に特徴的な表面分子の有無

RDBLSf マウスと RDBL マウスの T 細胞を比較して、Treg 細胞特徴的な表面分子の発

現の違いを flow cytometry で検討した。機能的 Foxp3 を欠く RDBLSf マウスでは RDBL マウスに比較して CD25、GITR、CD103、OX40 といった Treg 細胞に特徴的な表面分子の発現は低かった(図 4A)。

#### RDBLSf マウス T 細胞に特徴的な表面分子・転写因子の同定

RDBLSf マウスの T 細胞に特徴的な表面マーカーや転写因子などを明らかにするため、RDOSf マウスと RDBLSf マウス各々の脾臓 T 細胞の発現遺伝子の比較をマイクロアレイにより行った。その結果、IL-21、Helios, PD-1, CD200, ICOS が RDBLSf マウスの脾臓の T 細胞で非常に強く発現しており特徴的発現遺伝子と考えられた(図 5A)。マイクロアレイから得られたマーカー候補の表面分子あるいは転写因子に関して、flow cytometry にて解析を行った結果、PD-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞が RDBLSf マウスの脾臓 T 細胞で 51.7%であったのに対し RDOSf マウスの脾臓 T 細胞では 1%であり、RDBLSf マウスで特徴的な細胞群であった。同様に、CD200<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞に関しても、RDBLSf マウスの脾臓では RDOSf マウスと比較して全体的に CD200<sup>high</sup> の分布にシフトしていた。RDBLSf マウスの脾臓 CD4<sup>+</sup>T 細胞で全体的に PD-1<sup>high</sup>CD200<sup>high</sup> の分布にシフトしており RDOSf マウスでは PD-1<sup>+</sup>CD200<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞を認めなかった。CD200<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞においても、RDBLSf マウスの脾臓では RDOSf マウスと比較して全体的に CD200<sup>high</sup>Helios<sup>high</sup> の分布にシフトしていた(図 5B)。

## RDBLSf マウスの T 細胞のサイトカイン産生能

上記のマイクロアレイより、RDBLSf マウスの T 細胞の特徴的な発現分子は IL-21 と判明したが、更に IL-21 に特に着目して RDBLSf マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞のサイトカイン産生能を蛋白レベルで検討した。

RDBLSf マウスの末梢に出現する CD4<sup>+</sup>T 細胞のサイトカイン産生を flow cytometry で検討したところ、IL-4, IL-10, IL-21, IFN- $\gamma$  の産生を認め、IL-17 の産生は認めなかった(図 6A)。PD1<sup>inter-high</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞において IL4, IL-10, IL-21, IFN- $\gamma$  の産生を認めた(図 6B)。また IL-21 の産生に関しては、特に CD200<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞で強く認めることから(図 6B)、IL-21 は PD-1<sup>+</sup>CD200<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞の産生サイトカインとして位置づけられる。

また IL-21 産生 T 細胞が他のサイトカインを同時に産生しているどうかを検討するため、IL-21 と IL-4、IL-21 と IL-10、IL-21 と IFN- $\gamma$  を各々同時染色した結果、IL-21 産生 T 細胞と IL-10 産生 T 細胞は別細胞であることが判明し、IL-21 産生細胞は一部 IL-4、IFN- $\gamma$  を産生していた(図 6C)。

RDBLSf マウスの自己反応性 T 細胞から IL-21 産生 T 細胞が出現することが判明し、また特徴的の表面分子として PD-1、CD200 を発現していたことから、従来より知られている IL-21 を産生する Tfh 細胞に類似しており、従来の Tfh 細胞に代表的な表面分子の発現を RDBLSf マウスの末梢の T 細胞を用いて flow cytometry にて検討した。その結果、RDBLSf マウスの末梢の T 細胞は CXCR5<sup>-</sup>CD40L<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>GL7<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞であることが判明し、従来の Tfh 細胞の表面分子の一部 CXCR5、CD40L は発現

していなかったが、ICOS、CXCR4、GL7 の発現は認めた(図 7A)。なお、positive control として keyhole limpet hemocyanin(KLH)の免疫にて従来の Tfh 細胞が誘導される系で、従来の Tfh 細胞すなわち ICOS<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞において CXCR5 が発現するか flow cytometry で検討したところ、予想通り CXCR5 を発現しており、RDBLSf マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞と対照的であった (図 7B)。

また、Th1 細胞、Th2 細胞、Tfh 細胞の転写因子の発現を flow cytometry にて確認したところ、Th1 細胞の転写因子 T-bet は RDBLSf マウスの末梢の CD4<sup>+</sup>T 細胞において発現は認められず(図 7C 上段左)、Th2 細胞の転写因子 GATA3 も RDBLSf マウスの末梢の PD1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞では発現を認めなかった(図 7C 上段右)。一方、従来の Tfh 細胞の転写因子である Bcl-6 は RDBLSf マウスの末梢の CD4<sup>+</sup>T 細胞において RDOSf マウスと比較して全体的に高発現になっていた(図 7C 下段)。

次に、RDBLSf マウスにおいて IL-21 産生性の PD-1<sup>+</sup>CD200<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞は IL-10 産生性の細胞と別細胞であることは判明しているが、IL-10 産生性の LAG3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Treg 細胞 (28)との相違を確認するため、RDBLSf マウスの PD-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞において flow cytometry にて検討したところ、LAG3 の発現を認めなかった(図 7D)。

また、RDBLSf マウスの胸腺の CD4 single positive の T 細胞においても、末梢同様に IL-21 産生 PD1<sup>+</sup>CD200<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞が存在するかどうか flow cytometry にて検討した。

その結果、RDBLSf マウスの胸腺では RDOSf マウスと比較して CD4single positiveT



細胞において PD-1<sup>high</sup>CD200<sup>high</sup> の分布にシフトしており(図 7E 左)、RDBLSf マウスの胸腺の CD200<sup>+</sup>CD4 single positiveT 細胞は IL-21 を産生していた(図 7E 右)。

#### RDBLSf マウスの T 細胞の in vitro での増殖反応

RDBLSf マウスは組織学的にも皮膚以外はトレランスが維持されていたことから、RDBLSf マウスに出現する CD4<sup>+</sup>T 細胞は低増殖能でかつ抑制的であると仮説を立て、RDBLSf マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞の増殖能をまず in vitro で検討を重ねた。

RDBLSf マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞と RDOSf マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞を anti-CD3 刺激で単独培養しチミジンの細胞内への取り込みの程度を測定したところ、WT マウスの Treg 細胞は増殖せず anergy であったが、RDBLSf マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞は WT マウスの Treg 細胞よりも増殖を認めていた。尚、6 回の結果の平均を標準偏差とともに棒グラフで示した(図 8A)。同様に各細胞を各々 OVA 刺激で単独培養し、各 OVA 濃度(0.001 $\mu$ M、0.01 $\mu$ M、0.1 $\mu$ M)におけるチミジンの細胞内への取り込みの程度を測定したところ、RDBLSf マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞は OVA 濃度 0.01 $\mu$ M のところで増殖能が最も高く、RDOSf マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞に比較して全濃度で増殖していた(図 8B)。

また、RDBLSf マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞、RDOSf マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞、WT マウスの Tconv 細胞、WT マウスの Treg 細胞を各々 WT マウス由来の Tconv 細胞と共に anti-CD3 刺激で培養したところ、WT マウスの Treg 細胞は抑制効果が従来通り認められたが、RDBLSf マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞は抑制効果が認められず増殖を認めた。尚、6 回の結果

の平均を標準偏差とともに棒グラフで示した（図 8C）。

#### RDBLSf マウスの T 細胞の生体内 in vivo での増殖能

In vitro では増殖能、抑制能ともに仮説に反する結果であったが、RDBLSf マウスにおいて組織学的には皮膚以外はトレランスが維持されており、in vivo では低増殖能であると推察され、また PD-1/PD-L1 の作用は in vitro と in vivo で異なることが知られており(29)、in vitro の結果は RDBLSf マウスの生体におけるリンパ球の状況と異なることから、RDBLSf マウス T 細胞では in vivo での増殖能の検討が必要と考えられた。

RDBLSf マウスの T 細胞の生体内での増殖能を調べるため、免疫原性を持たない Thy1 のシステムを用いて実験を行った。Thy1.1<sup>+</sup>RDOSf マウス及び Thy1.2<sup>+</sup>RDBLSf マウス由来の OVA 反応性 TCR をもつ CD4<sup>+</sup>T 細胞を各々混合した後 CFSE ラベルし、核内に OVA を発現している Ld-nOVA マウスに移入後 4 日目に、Thy-1 アロタイプの違いを利用して分離し各々の分裂能を CFSE の蛍光強度にて評価した(図 9A)。移入後 4 日での flow cytometry による解析結果では、Thy1.2<sup>+</sup>RDBLSf マウス由来の CD4<sup>+</sup>T 細胞は Thy1.1<sup>+</sup>RDOSf マウス由来の CD4<sup>+</sup>T 細胞に比較して、CFSE の蛍光強度が高いままで分裂が進んでおらず増殖していないことが示された（図 9B）。同時に、移入した OVA 反応性 TCR をもつ T 細胞を KJ1-26 で染色し追跡したところ、Thy1.1<sup>+</sup>KJ1-26<sup>+</sup>の Thy1.1<sup>+</sup>RDOSf マウス由来の T 細胞が 91.5%であったのに対して、Thy1.1<sup>+</sup>KJ1-26<sup>+</sup>の T 細胞すなわち Thy1.2<sup>+</sup>RDBLSf マウス由来 T 細胞が 6.4%となっており、移入時は 1:1

の同率で移入していることから、in vivo で RDOSf マウス由来の T 細胞は増殖しており RDBLSf マウス由来の T 細胞は増殖能が低いことが判明した。RDBLSf マウス由来の T 細胞は、サイトカイン産生などの機能は有しているが増殖に関しては anergy である状態、すなわち split anergy であることが分かった (図 9C)。

RDBLSf マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞に発現している表面分子のうち、PD-1 は従来より抑制性分子として知られていた為(30)、Thy1.2<sup>+</sup>RDBLSf マウス由来の CD4<sup>+</sup>T 細胞と Thy1.1<sup>+</sup>RDOSf マウス由来の CD4<sup>+</sup>T 細胞を Ld-nOVA マウスに移入する際に、抗 PD-1 抗体を生体内に投与して PD-1・PD-1-Ligands (PD-L) 反応を阻害することにより anergy に変化があるか検討をした。その結果、Thy1.2<sup>+</sup>RDBLSf マウス由来の CD4<sup>+</sup>T 細胞は抗 PD-1 抗体投与により CFSE の蛍光強度が減弱したことから、PD-1 からのシグナルにより増殖反応が抑制されていることが判明した(図 9D)。

#### IL-10 欠損 RDBLSf マウスの T 細胞や組織学的評価

RDBLSf マウスでは IL-21 産生性の PD-1<sup>+</sup>CD200<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞を認め皮膚以外の臓器は正常に保たれていたが、独立して IL-10 産生性の CD4<sup>+</sup>T 細胞も存在していた。この IL-10 産生性の CD4<sup>+</sup>T 細胞が IL21 産生性の PD-1<sup>+</sup>CD200<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞の分化や RDBLSf マウスの寛容維持に関与している可能性を評価するため、IL-10 欠損(IL-10<sup>-/-</sup>)RDBLSf マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞の性質を flow cytometry で検討し、次に組織学的評価を行った。

IL-10<sup>-/-</sup>RDBLSf マウスでは、IL-10<sup>-/-</sup>RDOSf マウスと比較して IL-10<sup>+/+</sup>RDBLSf マウス

と同様に、PD1<sup>+</sup>CD200<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞を認め CD200<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞において IL-21 を産生することも確認された(図 10A)。また、IL-10 欠損 RDBLSf マウスでは、IL-10 欠損マウスで一般的に認められる腸炎の所見は HE 染色にて顕微鏡による観察で確認されたが、その他の肝臓、腎臓などの代表的な臓器には炎症を認めず(図 10C)、興味深いことに RDBLSf マウスとは異なり肉眼的にも外観の皮膚に炎症はなかった(図 10B)。

### RDBLSf マウスの T 細胞の抗体産生誘導能

RDBLSf マウスの PD-1<sup>+</sup>CD200<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞は IL-21 産生能を持ち、表面マーカーの一部と転写因子が従来の Tfh 細胞と共通していたことから、WT マウスの B 細胞と共培養して抗体産生誘導能を持つかどうか ELISA を用いて検討し、2 回実施した結果を平均化して棒グラフにて示した。RDBLSf マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞は、RDBLSf マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞、WT マウスの Tconv 細胞、WT マウスの Treg 細胞と比較しクラススイッチ後の IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgA の抗体産生誘導能が高かったが、IgM の抗体産生誘導に関しては、RDBLSf マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞は抗体産生誘導能が高い傾向にはあったが、他に比較して著明な差ではなかった (図 11A)。

また、培養 2 日目の培養細胞の遺伝子発現を RT-PCR 法により検討したところ、RDBLSf マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞と共培養した時は WT マウスの Treg 細胞や Tconv 細胞と共培養した時よりもクラススイッチ誘導に必要な AID が強く発現していた(図 11B)。

以上より、RDBLSf マウスにおいて、IL-21 産生性で抗体産生誘導能を有し、表面

マーカーの多くと転写因子が従来の Tfh 細胞と共通していること、また新規の T 細胞サブセットが胸腺由来に出現してきていることから、natural Tfh 細胞と名付けた。

本来 WT マウスなどでは、natural Tfh 細胞は Treg 細胞と共存していると考えられるため、Treg 細胞により natural Tfh 細胞の抗体産生能が制御されていると仮説をたて、RDBLSf マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞を WT マウスの B 細胞に加えて Treg 細胞と共に培養した。その結果、WT マウスの Treg 細胞を加えると IgM、IgG1、IgG2a、IgA において抗体産生が抑制されることが分かった (図 12A)。

次に、Treg 細胞が natural Tfh 細胞の IL-21 産生能を制御していると推察されたため、RDBL マウスの全脾細胞を刺激培養した場合と Treg 細胞を除いて刺激培養した場合で IL-21 産生を比較した。その結果、RDBL マウスの全脾細胞を刺激培養した場合には IL-21 産生が 2.1%で RDO マウスの全脾細胞の 0.5%に比べて高く、RDBL マウスの脾細胞から Treg 細胞を除いて刺激培養した場合には IL-21 産生がさらに 4.6%と亢進しており、Treg 細胞により natural Tfh 細胞の IL-21 産生能が制御されていることが判明した。次に Treg 細胞を除いた RDBL マウスの脾細胞の培養に、Treg 細胞を誘導しまた Treg 細胞からも分泌されると従来より考えられている TGF- $\beta$  を加えた場合、IL-21 産生が 0.6%と低下しており、TGF- $\beta$  により IL-21 産生が抑制されていることが分かった (図 12B)。

### DBL マウスにおける natural Tfh 細胞の分化と自己反応性の検討

Natural Tfh 細胞が Rag2 と機能的 Foxp3 を欠く特殊な条件下で生じてくる細胞群なのか否かを検討する為、核内自己抗原反応性 T 細胞を有するが、Rag2 が存在し TCR 改変も生じ、Treg 細胞も存在する DBL マウスで、IL-21 産生の PD-1<sup>+</sup>CD200<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞 (natural Tfh 細胞)が存在するかどうか、脾細胞を用いて flow cytometry で検討した。その結果、Treg 細胞と並行して PD-1<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞が出現し IL-21 を産生していることが分かった(図 13A 上段)。また、PD-1<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞が DBL マウスにおいても自己反応性 T 細胞由来であるかどうかを検討するために、核内 OVA 抗原に対する TCR つまり KJ1-26 で認識されるクロノタイプの発現を flow cytometry で調べた。その結果、DBL マウスで Treg 細胞も KJ1-26<sup>high</sup> の自己反応性 population から出現しているが、PD-1<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞はより KJ1-26<sup>high</sup> であり、Treg 細胞より自己反応性が強い population から出現していることが判明した (図 13B)。

更に、DBL マウスにおいて末梢同様に胸腺で CD4 single positive T 細胞に IL-21 産生細胞が存在しており (図 13C)、また DBL マウスと n/nDBL マウスを比較して胸腺を欠く n/nDBL マウスの末梢には IL-21 産生性の PD-1<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞が出現していないことから (図 13A 下段)、DBL マウスで IL-21 産生性の PD-1<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞は胸腺由来であることが判明した。

### natural Tfh 細胞の生体内での germinal center 形成や抗体産生における役割

生体内での germinal center 形成や抗体産生の評価をするには、生体内で B 細胞が存在するマウスでの解析が必要である。これまで実験で用いた Rag2 欠損マウスでは B 細胞は存在しない為、B 細胞は分化してくるにも関わらず TCR 改変は生じにくい TCR $\alpha$  欠損 DBL マウスや TCR $\alpha$  欠損 DBLSf マウスを用いて評価した。そこでまず、TCR $\alpha$  欠損 DBL マウスと TCR $\alpha$  欠損 DBLSf マウスにおける natural Tfh 細胞を評価した。TCR $\alpha$  欠損 DBLSf マウスでは TCR $\alpha$  欠損 DBL マウスに比較して、PD1<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞すなわち新規の natural Tfh 細胞が多く出現しており、Foxp3 を欠く状況でより出現しやすく、また Treg 細胞と独立して存在する細胞群であることが分かった(図 14A)。

DBL マウスと TCR $\alpha$  欠損 DBL マウスでは、どちらも Rag2 が存在するため B 細胞は出現するが、TCR $\alpha$  欠損 DBL マウスの方が TCR 改変を起こしにくく全身性自己抗原反応性 T 細胞がより多い状態である。flow cytometry の結果より、脾臓の CD200<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞は DBL マウスでは 15.4%、TCR $\alpha$  欠損 DBL マウスにおいて 20.5%、同様に PD-1<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞は DBL マウスでは 15.5%、TCR $\alpha$  欠損 DBL マウスにおいて 29%であり、PD1<sup>+</sup>CD200<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞は DBL マウスでは 6.4%、TCR $\alpha$  欠損 DBL マウスでは 18.4%であった。いずれの結果からも、natural Tfh 細胞がより自己反応性 T 細胞が多い TCR $\alpha$  欠損 DBL マウスで多く認められることが判明した(図 14B)。

Flow cytometry で germinal center を形成する B 細胞を表す GL7<sup>+</sup>Fas<sup>+</sup>B 細胞を検出した

ところ、DBL マウスでも認めるが TCR $\alpha$  欠損 DBL マウスでより多く認められた(図 15A)。組織学的に germinal center 形成を観察したところ、TCR $\alpha$  欠損 DBL マウスの脾臓で PNA 陽性として染色された germinal center 領域に PD-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞が存在することが確認され、同時に germinal center 部位には Treg 細胞は認めなかった(図 15B)。

また total IgG 及び OVA 特異的 IgG すなわち核内 OVA に反応する核内自己抗原に対する自己抗体を、TCR $\alpha$  欠損 DBL マウス、DBL マウス、TCR $\alpha$  欠損 DO マウス各々5匹について ELISA で測定し、平均・標準偏差を棒グラフで示した。TCR $\alpha$  欠損 DBL マウスにおいて最も亢進しており、次いで DBL マウス、TCR $\alpha$  欠損 DO マウスの順になっており、natural Tfh 細胞を多く有している程、産生が亢進していた(図 15C)。DBL マウスの血清では Homogeneous & Speckled nuclear staining、TCR $\alpha$  欠損 DBL マウスの血清では Homogeneous nuclear staining の抗核抗体の出現も認めていた(図 15D)。抗核抗体の力価に関しては、TCR $\alpha$  欠損 DBL マウス、DBL マウス、TCR $\alpha$  欠損 DO マウス、WT マウス各々5匹の平均・標準偏差を棒グラフで示すと、TCR $\alpha$  欠損 DBL マウスにおいて最も高く、次いで DBL マウス、TCR $\alpha$  欠損 DO マウス、WT マウスの順になっており、natural Tfh 細胞を多く有している程、抗核抗体の力価が高かった(図 15E)。

#### WT マウスにおける natural Tfh- like 細胞の分化

特殊な遺伝子改変マウスだけでなく、WT マウスにもより普遍的に natural Tfh 細胞が出現しているかどうかを flow cytometry で検討した。その結果、WT マウスの脾臓に



において  $CD200^{high}Foxp3^{-}CD4^{+}T$  細胞を 3.0%認め、 $PD-1^{+}Foxp3^{-}CD4^{+}T$  細胞は 10.5%であった。更に  $CD200^{high}PD-1^{+}$  の T 細胞は Treg 細胞群においては認められず  $Foxp3^{-}CD4^{+}T$  細胞群に認められた(図 16A)。

以上より WT マウスの末梢において  $CD200^{high}PD-1^{+}Foxp3^{-}CD4^{+}T$  細胞の出現を認め natural Tfh 細胞と同等の表面マーカーを有する細胞(natural Tfh-like 細胞)が分化していると考えられた。これまでのトランスジェニックマウスでは NKT 細胞は存在し得ない為検討の必要がなかったが、一部 PD-1 は NKT 細胞にも出現しているため(31)、WT マウスでは NKT 細胞との相違を NKT 細胞の  $V\alpha 14TCR$  に結合して認識される  $CD1d/\alpha$ -ガラクトシルセラミドの四量体分子で染色することによって確認する必要があった。その結果、 $PD-1^{+}Foxp3^{-}CD4^{+}T$  細胞と  $CD200^{+}Foxp3^{-}CD4^{+}T$  細胞どちらも  $CD1d$ -tetramer では染色されなかったことから、NKT 細胞との相違が確認でき、natural Tfh-like 細胞が WT マウスの末梢で出現していることが明らかになった(図 16B)。

また、Foxp3 を GFP にて可視化した WT マウスである Foxp3-GFP BALB/c マウスの脾臓、胸腺において Treg 細胞、PD-1 陰性の Tconv 細胞、 $PD1^{+}Foxp3^{-}CD4^{+}T$  細胞(natural Tfh-like 細胞)を flow cytometry で sorting し、RT-PCR 法により natural Tfh 細胞に特徴的である IL-21、Helios、Bcl-6 の発現を比較検討した。その結果、WT マウスの脾臓では natural Tfh-like 細胞で IL-21、Helios、Bcl-6 の発現を強く認め、一部 Treg 細胞でも Helios と Bcl-6 の発現を若干認めた。WT マウスの胸腺でも natural Tfh-like 細胞で IL-21、Helios、Bcl-6 の発現を強く認め、他 Treg 細胞や Tconv 細胞では認めなかった(図

16C)。

#### Bcl-6 欠損マウスでの natural Tfh 細胞の解析

従来の Tfh 細胞が Bcl-6 をマスター遺伝子としていることから、本研究で明らかになった新規の natural Tfh 細胞に関しても発現が確認されている Bcl-6 が重要な転写因子と考えられるため、Bcl-6 欠損マウスにおける natural Tfh 細胞を flow cytometry で解析した。

その結果、脾臓において、CD200<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞は Bcl-6WT マウスでは 9.1%、Bcl-6 欠損マウスでは 0.4%とほとんど認められず、同様に PD-1<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞は Bcl-6WT マウスでは 7.5%、Bcl-6 欠損マウスでは 0.2%とほとんど認められず、CD200<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞は Bcl-6WT マウスでは 11.2%、Bcl-6 欠損マウスでは 0.4%とほとんど認められなかった(図 17A)。尚、natural Tfh 細胞は CXCR5 の発現を認めていないことから、Bcl-6 欠損マウスの末梢にて消失していた CD200<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞における CXCR5 の発現を確認する為、Bcl-6WT マウスの脾臓を検討したところ、CD200<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞、PD-1<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞どちらにおいても CXCR5 の発現は各々 0.5%、0.2%とほとんど認めなかった(図 17C)。

また、胸腺においても Bcl-6WT マウスと比較して Bcl-6 欠損マウスでは Helios<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD4single positiveT 細胞、CD200<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD4single positiveT 細胞は著減しており、PD-1<sup>high</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD4single positiveT 細胞はほとんど消失していた (図 17B)。

### 健常ヒトにおける natural Tfh-like 細胞の解析

これまでマウスでの natural Tfh 細胞を解析し WT マウスにも natural Tfh-like 細胞が存在していることを確認したが、健常ヒトにおいても natural Tfh-like 細胞が普遍的に存在しているか flow cytometry にて検討した。

健常ヒトの末梢血より  $CD200^+Helios^+Foxp3^-CD4^+$ T 細胞を 1.1%、 $CD200^+PD-1^+$   $Foxp3^-CD4^+$ T 細胞を 2.1%認め、また  $CD200^+CD4^+$ T 細胞において CXCR5 の発現が 0.1%とほとんど認められなかった(図 18A)。また、 $CD200^+CD4^+$ T 細胞と  $CD200^-CD4^+$ T 細胞において Bcl-6 の発現の強度の差をヒストグラムにて確認したところ、 $CD200^+CD4^+$ T 細胞の方が Bcl-6 の発現が強くなっていた(図 18B)。健常ヒトの末梢でも表面分子、転写因子が一致する natural Tfh-like 細胞が存在していることが示唆された。

## 考察

従来より多くの報告が自己免疫疾患の病因や病態形成に自己反応性 T 細胞は重要な役割を担っていることを示しており(16-22)、正常個体における自己反応性 T 細胞の制御機構の解明は病態の理解や治療を考える上で重要なテーマとなっている。

本研究は、これまで明らかになっている自己反応性 T 細胞の制御機構である clonal deletion、Treg 細胞への分化とは異なる新たな経路について解析した。この中枢性 T 細胞トレランスにおける新規分化経路は、胸腺における自己反応性 T 細胞から新規サブセットである natural Tfh 細胞への分化経路であり、Treg 細胞への分化経路と独立にかつ並行して存在していることが分かった。

本研究で用いた RDBLSf マウスにおいて、定説通り自己反応性 T 細胞において clonal deletion と Treg 細胞への分化経路以外の機序がないとすれば、RDBLSf マウスではトレランスが失われているか、 $CD4^+$ T 細胞が分化してこないことが考えられる。しかし、RDBLSf マウスにおいて、トレランスも保たれ、 $CD4^+$ T 細胞も分化していれば、この2つの経路以外に新たな分化経路があると考えられた。また、特殊な遺伝子改変マウスのみで生じうる Treg 細胞に分化できずに特殊な細胞に分化してしまった wannabe Treg 細胞などが生じる可能性もあるため(32, 33)、本研究ではより一般的な DBL マウスや WT マウスでもさらに実験を行った。

本研究では、RDBLSf マウスは、機能的 Foxp3 を欠いているにもかかわらず、全ての T 細胞が全身性自己抗原反応性を有しながら、皮膚以外に臓器障害をおこすことなく長期間生存できることが判明した。このことから Treg 細胞への分化経路以外に全

身性自己反応性 T 細胞を制御する経路が存在することが示された。

この T 細胞サブセットは、従来の Tfh 細胞と比較して、PD-1 や CD200 などの表面分子と転写因子 Bcl-6(24)や Helios の発現(25)、IL-21 産生や B 細胞の抗体産生誘導能などの機能面では共通点を有しているが、自己抗原認識細胞である点、従来の Tfh 細胞の主要表面マーカーである CXCR5 が陰性である点、胸腺で分化する点が異なり、新規の T 細胞サブセットといえる (表 2)。

TCR 改変がおきず全ての T 細胞が自己反応性を有する RDBL マウスや RDBLSf マウスだけではなく、TCR 改変も生じる DBL マウスにおいても、自己反応性 T 細胞は Foxp3<sup>-</sup>PD-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞に分化していた。このことから、自己反応性 T 細胞は胸腺で正の選択を受けて Treg 細胞以外に本サブセットに分化することが示唆された。Treg 細胞も胸腺で自己反応性 T 細胞から分化することが知られているが(33)、DBL マウスの結果から自己反応性のより強い population から Foxp3<sup>-</sup>PD-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞が分化すると考えられた。また、natural Tfh 細胞は自己抗原反応性 TCR を有しているが、実際に ignorant の状態ではなく自己抗原を認識していることに関しては、CD45RB<sup>high</sup>CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup>であり antigen-experienced の T 細胞と考えられること、また Ld-nOVA マウスの末梢に DO11.10 マウス CD4<sup>+</sup>T 細胞を移入すると OVA を認識し増殖するという以前の研究(26)により確認している。

Natural Tfh 細胞は自己反応性 T 細胞から分化し自己抗原を認識しているが、増殖能に関しては split anergy の状態にあることが in vivo の移入実験により明らかになった。

マイクロアレイにおいても、RDBLSf マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞に anergy 関連分子である GRAIL、Egr family が強く発現していた(34)。RDBLSf マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞は in vitro での抗 CD3 抗体や OVA ペプチドによる刺激実験では増殖を示していることから生体における抑制シグナルの存在が示唆され、実際に PD-1・PD-1-Ligands(PD-L) の結合阻害抗体を用いた移入実験の結果から生体では PD-1 からのシグナルが anergy に重要であることが示された。尚、PD-1・PD-1-Ligands の結合阻害抗体を同時に移入した場合に RDBLSf マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞の split anergy が解除され reverse できていることから、in vivo の腹腔内への移入実験において明らかになった RDBLSf マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞の split anergy の前提として、RDBLSf マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞が RDOSf マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞に比較して血管内へ遊走性・移行性が低かったという可能性は低いと考えられた。PD-L1・L2 は炎症で upregulate されるが、PD-L1 は生体内では恒常的に血管内皮・実質臓器（膵島細胞、肝細胞など）に発現しており(35)、恒常的な natural Tfh 細胞の制御に関わっていると思われる。これまで PD-1 は抑制性分子であることが知られており(30)、PD-1 欠損マウスでは、心筋症や神経炎、胃炎、ループス様病態など、バックグラウンドで異なる自己免疫疾患を呈し(36)、PD-L1 欠損マウスではアロ抗原が異なる胎児の死亡が生じたり、実験的アレルギー性脳脊髄炎が生じやすい(37)ことから、生体における自己免疫制御、特に臓器炎症の抑制に PD-1・PD-ligands の相互作用が重要であることが示されてきた。その機序として、PD-1 自体が細胞内に抑制性モチーフを有する分子であるほか(30)、Treg 細胞の発育に重要であること、生体で

は PD-1 が樹状細胞上の PD-1-Ligands と結合し樹状細胞へ reverse signaling が入り抑制性樹状細胞となり T 細胞活性化が制御される機序などが知られている(38)。本研究の結果から natural Tfh 細胞の split anergy の維持や活性化の調節にも PD-1 が関与している可能性が考えられ、natural Tfh 細胞が PD-1 欠損マウスの自己免疫疾患にどのような関わっているのか検討することは、今後 PD-1 の役割、natural Tfh 細胞の制御を考える上で重要な課題になると考えられる。

RDBLSf マウスで分化してきた T 細胞の発現分子および機能の解析では、従来の Tfh 細胞と共通点が認められた。まず、表面分子では PD-1、CD200、ICOS、転写因子では Bcl-6、Helios の発現が従来の Tfh 細胞と共通していたが(24, 25)、表面分子で最も異なる点は CXCR5 が陰性である点であった(表 2)。

Tfh 細胞は転写因子の Bcl-6 がマスター遺伝子と考えられており(24)、本研究で明らかになった natural Tfh 細胞は Bcl-6 欠損マウスで消失していることから、natural Tfh 細胞においても Bcl-6 がマスター遺伝子であることが明らかになった。

一方、従来の Tfh 細胞では germinal center の局在に CXCR5 の発現が関与しているが、本研究で新たに発見された natural Tfh 細胞は CXCR5 の発現が認められず、germinal center に局在するためには別の分子が関与していると考えられるが、現在のところ不明である。実際に T 細胞における CXCR5 発現を欠いたマウスにおいても、胸腺依存性抗原に対する免疫応答に際して germinal center の形成は可能であり、その内部に T 細胞が出現していることが示されている(39, 40)。

RDBLSf マウスの T 細胞では、IL-21、IL-4、IFN- $\gamma$  を産生し、B 細胞と共培養するとクラススイッチを誘導し抗体産生ヘルプの機能をもつ新たな T 細胞サブセットであることが判明し、従来の Tfh 細胞と共通点が認められた(表 2)。

この RDBLSf マウスの T 細胞は IL-4 も産生しているものの、FACS やマイクロアレイにて GATA3 の発現は確認されず従来の Th2 細胞とは異なり、またマイクロアレイにおいて明らかなように IL-21 が主要な産生サイトカインといえる。これまで IL-21 は Th17 細胞または従来の Tfh 細胞から分泌されるサイトカインとしても知られているが、RDBLSf マウスで分化してきた T 細胞は IL-17 を産生しておらず Th17 細胞とは異なっていた。また、この細胞は IL-10 産生性 T 細胞とも異なる別の細胞と考えられた。IL-10 も抑制性サイトカインとして知られているが、IL-10 欠損 RDBLSf マウスにおいても IL-21 産生性の CD200<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>T 細胞が認められ、IL-10 欠損マウス(41, 42)と同様に腸炎の所見がある以外は臓器障害が認められず免疫寛容が維持されていることから、IL-10 産生性の CD4<sup>+</sup>T 細胞とは独立に IL-21 産生性の PD1<sup>+</sup>CD200<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞が寛容維持に関与しており、IL-10 産生 T 細胞による IL-21 産生 T 細胞の分化やトレランス維持への関与は少ないと考えられた。また IL-21 産生 CD200<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>T 細胞は split anergy であるが、他の細胞を積極的に抑制している制御性 T 細胞として機能しているかどうかは不明である。

以上のことから、RDBLSf マウスの T 細胞は、従来の Tfh 細胞と同様に IL-21 を産生し、表面分子マーカーと転写因子を従来の Tfh 細胞と一部共有しており、抗体産生



を誘導する細胞として機能するという Tfh 細胞の要件を満たしていると考えられた。

一方、RDBLSf マウスにおいて、従来の Tfh 細胞とは異なり、この Tfh 様の IL-21 産生性の CD200<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>T 細胞が胸腺由来であることが明らかになったことから、本細胞を natural Tfh 細胞と位置づけた(表 2) (図 19)。

さらに本研究では TCR 改変がなく機能的 Foxp3 を欠く RDBLSf マウスという特殊な状況下だけでなく、Rag が存在するため TCR 改変が生じ、機能的 Foxp3 を有するため Treg 細胞にも分化しうる DBL マウスでも、従来の中枢性 T 細胞トレランスの機序と並列に、自己反応性を有する population から natural Tfh 細胞が選択的に胸腺より分化してくることが明らかになった。また、WT マウスやヒトにも natural Tfh-like 細胞が存在しているかどうかを検討している。

Natural Tfh 細胞は増殖能において anergic だが Tfh 細胞様の機能を有しており、また本来 WT マウスなどでは natural Tfh 細胞は Treg 細胞と共存していると考えられることから、Treg 細胞による natural Tfh 細胞の抗体産生誘導能の制御を検討したところ、natural Tfh 細胞 と Treg 細胞を B 細胞と共培養した際に抗体産生低下が認められた。また Treg 細胞が存在する RDBL マウスの脾細胞から Treg 細胞を除去して培養した結果、IL-21 産生亢進が認められた。これらのことは、これまで Treg 細胞が germinal center の Bcell 領域にて直接 B 細胞を制御しクラススイッチを抑制し抗体産生を低下させるという報告(43)もあったが、B 細胞への直接的抑制作用だけではなく Treg 細胞が natural Tfh 細胞 の制御を介して過剰な免疫応答の抑制を行っている可能性を示唆し

ている。

WT マウスの胸腺・末梢にも natural Tfh-like 細胞が存在しており、遺伝子改変マウスと同様に PD-1、CD200、Helios、Bcl-6 がマーカーになりうること、及び遺伝子レベルでの IL-21 発現は確認できたが、WT マウスでは蛋白レベルで IL-21 産生を示すことができず、抗体産生誘導能を B 細胞との共培養で示すことができなかった。

この理由として WT マウスの生体内で共存している Treg 細胞により natural Tfh 細胞の機能、分化形態が異なる可能性、また特殊なトランスジェニックマウスと WT マウスでは自己末梢抗原の量も異なり natural Tfh 細胞の活性化状態が異なる可能性などが考えられるが、今後の詳細な研究が必要である。

本研究では DBL マウス、TCR $\alpha$  欠損 DBL マウスにおいて、この順に natural Tfh 細胞が増加すると同時に germinal center 形成も確認され、IgG 増加や抗核抗体産生も認められ、natural Tfh 細胞の生体における作用を検討する上で非常に興味深い。

次に、これまでの Bcl-6 欠損マウス、IL21-R 欠損マウスの知見から natural Tfh 細胞の生体的意義に関して検討する。Bcl-6 欠損マウスでは心筋、脾臓、消化管、肝臓、肺、皮膚などの多臓器に炎症を認め、一部心臓においては自己抗体も確認されている(44)。一方で、Bcl-6 欠損マウスは血清中の IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b の産生は低くなることが知られており(45)、IL21-R 欠損マウスでも血清中の IgG1, IgG2b の産生が低くなることが確認されている(46)。Natural Tfh 細胞は natural に Bcl-6、IL-21 を発現している細胞であることから、natural Tfh 細胞が自己免疫制御及び自然抗体の形成に関わ

っている可能性を示唆している。また、多臓器に炎症を引き起こす Bcl-6 欠損マウスの病態が natural Tfh 細胞の欠損と密接に関わっている可能性が考えられるが(47)、自己反応性 T 細胞の分化経路の 1 つを失い自己に炎症を生じてくるのか、natural Tfh 細胞が抑制能を有しているとすればその制御機構が消失する為に多臓器の炎症が起こるのかは不明であり、Bcl-6 欠損マウスに natural Tfh 細胞を移入して治療可能であるかどうか、今後検討することは natural Tfh 細胞の生理的意義を明らかにするための課題である。

本研究では natural Tfh 細胞がヒトでも存在していることを明らかにしたが、今後、自己免疫疾患、特に自己反応性 T 細胞が存在し多彩な全身症状を示し抗核抗体が著増する全身性自己免疫疾患における natural Tfh 細胞の病的意義の検討が必要である。例えば、これまで SLE と疾患感受性遺伝子として PD-1 との関わりが指摘され(48, 49)、SLE では特に PD-1 の発現低下が示されており(50)、本研究で明らかになった natural Tfh 細胞の機能との関係も興味深い PD-1 の発現が低下することで natural Tfh 細胞の制御が解除され自己抗体産生亢進のバランスに傾き、病的状態が惹起されている可能性も考えられる。

本研究により新たな中枢性 T 細胞トレランスの機序が解明されたが、自己免疫疾患の病態における本機構の意義を明らかにすることにより、IL-21 を標的とする薬剤(51, 52)など全身性自己免疫疾患の治療につながる新規治療の可能性も示唆された。

## 謝辞

本稿を終えるにあたり、大学院の4年間、終始温かいご指導を賜りました東京大学大学院医学系研究科アレルギー・リウマチ内科教授 山本 一彦 博士に深謝申し上げます。本研究の機会を与えてくださり、日々の実験内容や手技・研究の方向性など終始親身な御指導、御鞭撻を賜りました東京大学医学部附属病院アレルギー・リウマチ内科特任講師 川畑 仁人 博士に厚く御礼申し上げます。

本研究をまとめるにあたり、貴重な御助言を賜りました千葉大学大学院医学研究院分化制御学教授 徳久 剛史 博士に御礼申し上げます。

最後になりますが、本研究は今村 充 博士、神崎 健仁 博士、道下 和也 先生、江里 俊樹 先生、土肥 眞 博士をはじめとする研究室の先生方、および実験助手 山内 径子 氏の惜しみないご協力のもと成し得た成果であり、改めて皆様に深く感謝申し上げます。

## 参考文献

1. Burnet, F. M. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *CA Cancer J Clin* 26: 119-121. 1976.
2. Wirnsberger, G., M. Hinterberger, and L. Klein. Regulatory T-cell differentiation versus clonal deletion of autoreactive thymocytes. *Immunol Cell Biol* 89: 45-53. 2011.
3. Klein, L., and K. Jovanovic. Regulatory T cell lineage commitment in the thymus. *Semin Immunol*. 2011.
4. Sakaguchi, S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 101: 455-458. 2000.
5. Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, T. Nomura, and M. Ono. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133: 775-787. 2008.
6. Kawahata, K., Y. Misaki, M. Yamauchi, S. Tsunekawa, K. Setoguchi, J. Miyazaki, and K. Yamamoto. Generation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells from autoreactive T cells simultaneously with their negative selection in the thymus and from nonautoreactive T cells by endogenous TCR expression. *J Immunol* 168: 4399-4405. 2002.
7. Brennan, P. J., S. J. Saouaf, M. I. Greene, and Y. Shen. Anergy and suppression as coexistent mechanisms for the maintenance of peripheral T cell tolerance. *Immunol Res* 27: 295-302. 2003.

8. Ramsdell, F., T. Lantz, and B. J. Fowlkes. A nondeletional mechanism of thymic self tolerance. *Science* 246: 1038-1041. 1989.
9. Suh, C. H., J. H. Freed, and P. L. Cohen. T cell reactivity to MHC class II-bound self peptides in systemic lupus erythematosus-prone MRL/lpr mice. *J Immunol* 170: 2229-2235. 2003.
10. Wu, J., F. Xie, K. Qian, A. W. Gibson, J. C. Edberg, and R. P. Kimberly. FAS mRNA editing in human systemic lupus erythematosus. *Hum Mutat* 32: 1268-1277. 2011.
11. Perheentupa, J. Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 2843-2850. 2006.
12. Akirav, E. M., N. H. Ruddle, and K. C. Herold. The role of AIRE in human autoimmune disease. *Nat Rev Endocrinol* 7: 25-33. 2011.
13. Metzger, T. C., and M. S. Anderson. Control of central and peripheral tolerance by Aire. *Immunol Rev* 241: 89-103. 2011.
14. Ziegler, S. F. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol* 24: 209-226. 2006.
15. Bennett, C. L., J. Christie, F. Ramsdell, M. E. Brunkow, P. J. Ferguson, L. Whitesell, T. E. Kelly, F. T. Saulsbury, P. F. Chance, and H. D. Ochs. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27: 20-21. 2001.
16. Deshmukh, U. S., D. L. Sim, C. Dai, C. J. Kannapell, F. Gaskin, G. Rajagopalan, C. S.

- David, and S. M. Fu. HLA-DR3 restricted T cell epitope mimicry in induction of autoimmune response to lupus-associated antigen SmD. *J Autoimmun.* 2011.
17. de Jong, H., S. E. Berlo, P. Hombrink, H. G. Otten, W. van Eden, F. P. Lafeber, A. H. Heurkens, J. W. Bijlsma, T. T. Glant, and B. J. Prakken. Cartilage proteoglycan aggrecan epitopes induce proinflammatory autoreactive T-cell responses in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 69: 255-262. 2010.
  18. Suzuki, S., K. Tanaka, H. Yasuoka, Y. Fukuuchi, Y. Kawakami, and M. Kuwana. Autoreactive T cells to the P3A+ isoform of AChR alpha subunit in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 137: 177-186. 2003.
  19. Bahbouhi, B., S. Pettr , L. Berthelot, A. Garcia, A. Elong Ngono, N. Degauque, L. Michel, S. Wiertlewski, F. Lefr re, C. Meyniel, C. Delcroix, S. Brouard, D. A. Laplaud, and J. P. Soulillou. T cell recognition of self-antigen presenting cells by protein transfer assay reveals a high frequency of anti-myelin T cells in multiple sclerosis. *Brain* 133: 1622-1636. 2010.
  20. Oling, V., K. Geubtner, J. Ilonen, and H. Reijonen. A low antigen dose selectively promotes expansion of high-avidity autoreactive T cells with distinct phenotypic characteristics: a study of human autoreactive CD4+T cells specific for GAD65. *Autoimmunity* 43: 573-582. 2010.
  21. O'Brien, R. M., D. S. Cram, R. L. Coppel, and L. C. Harrison. T-cell epitopes on the

- 70-kDa protein of the (U1)RNP complex in autoimmune rheumatologic disorders. *J Autoimmun* 3: 747-757. 1990.
22. Arakaki, R., N. Ishimaru, I. Saito, M. Kobayashi, N. Yasui, T. Sumida, and Y. Hayashi. Development of autoimmune exocrinopathy resembling Sjögren's syndrome in adoptively transferred mice with autoreactive CD4<sup>+</sup> T cells. *Arthritis Rheum* 48: 3603-3609. 2003.
  23. Chen, Z., C. Benoist, and D. Mathis. How defects in central tolerance impinge on a deficiency in regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 14735-14740. 2005.
  24. Crotty, S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol* 29: 621-663. 2011.
  25. Serre, K., C. Bénézech, G. Desanti, S. Bobat, K. M. Toellner, R. Bird, S. Chan, P. Kastner, A. F. Cunningham, I. C. MacLennan, and E. Mohr. Helios is associated with CD4 T cells differentiating to T helper 2 and follicular helper T cells in vivo independently of Foxp3 expression. *PLoS One* 6: e20731. 2011.
  26. Kawahata, K., Y. Misaki, M. Yamauchi, S. Tsunekawa, K. Setoguchi, J. Miyazaki, and K. Yamamoto. Peripheral tolerance to a nuclear autoantigen: dendritic cells expressing a nuclear autoantigen lead to persistent anergic state of CD4<sup>+</sup> autoreactive T cells after proliferation. *J Immunol* 168: 1103-1112. 2002.
  27. Wafula, P. O., A. Teles, A. Schumacher, K. Pohl, H. Yagita, H. D. Volk, and A. C. Zenclussen. PD-1 but not CTLA-4 blockage abrogates the protective effect of



- regulatory T cells in a pregnancy murine model. *Am J Reprod Immunol* 62: 283-292. 2009.
28. Okamura, T., K. Fujio, M. Shibuya, S. Sumitomo, H. Shoda, S. Sakaguchi, and K. Yamamoto. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>LAG3<sup>+</sup> regulatory T cells controlled by the transcription factor Egr-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 13974-13979. 2009.
29. Kuipers, H., F. Muskens, M. Willart, D. Hijdra, F. B. van Assema, A. J. Coyle, H. C. Hoogsteden, and B. N. Lambrecht. Contribution of the PD-1 ligands/PD-1 signaling pathway to dendritic cell-mediated CD4<sup>+</sup> T cell activation. *Eur J Immunol* 36: 2472-2482. 2006.
30. Lechner, O., J. Lauber, A. Franzke, A. Sarukhan, H. von Boehmer, and J. Buer. Fingerprints of anergic T cells. *Curr Biol* 11: 587-595. 2001.
31. Iyoda, T., M. Ushida, Y. Kimura, K. Minamino, A. Hayuka, S. Yokohata, H. Ehara, and K. Inaba. Invariant NKT cell anergy is induced by a strong TCR-mediated signal plus co-stimulation. *Int Immunol* 22: 905-913. 2010.
32. Lin, W., D. Haribhai, L. M. Relland, N. Truong, M. R. Carlson, C. B. Williams, and T. A. Chatila. Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nat Immunol* 8: 359-368. 2007.
33. Feuerer, M., J. A. Hill, D. Mathis, and C. Benoist. Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nat Immunol* 10: 689-695. 2009.

34. Nurieva, R. I., S. Zheng, W. Jin, Y. Chung, Y. Zhang, G. J. Martinez, J. M. Reynolds, S. L. Wang, X. Lin, S. C. Sun, G. Lozano, and C. Dong. The E3 ubiquitin ligase GRAIL regulates T cell tolerance and regulatory T cell function by mediating T cell receptor-CD3 degradation. *Immunity* 32: 670-680. 2010.
35. Keir, M. E., S. C. Liang, I. Guleria, Y. E. Latchman, A. Qipo, L. A. Albacker, M. Koulmanda, G. J. Freeman, M. H. Sayegh, and A. H. Sharpe. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med* 203: 883-895. 2006.
36. Nishimura, H., T. Okazaki, Y. Tanaka, K. Nakatani, M. Hara, A. Matsumori, S. Sasayama, A. Mizoguchi, H. Hiai, N. Minato, and T. Honjo. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* 291: 319-322. 2001.
37. Sharpe, A. H., E. J. Wherry, R. Ahmed, and G. J. Freeman. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol* 8: 239-245. 2007.
38. Keir, M. E., M. J. Butte, G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 26: 677-704. 2008.
39. Arnold, C. N., D. J. Campbell, M. Lipp, and E. C. Butcher. The germinal center response is impaired in the absence of T cell-expressed CXCR5. *Eur J Immunol* 37: 100-109. 2007.
40. Fazilleau, N., L. Mark, L. J. McHeyzer-Williams, and M. G. McHeyzer-Williams.

- Follicular helper T cells: lineage and location. *Immunity* 30: 324-335. 2009.
41. Kühn, R., J. Löhler, D. Rennick, K. Rajewsky, and W. Müller. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75: 263-274. 1993.
42. Rennick, D., N. Davidson, and D. Berg. Interleukin-10 gene knock-out mice: a model of chronic inflammation. *Clin Immunol Immunopathol* 76: S174-178. 1995.
43. Lim, H. W., P. Hillsamer, A. H. Banham, and C. H. Kim. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol* 175: 4180-4183. 2005.
44. Yoshida, T., T. Fukuda, M. Hatano, H. Koseki, S. Okabe, K. Ishibashi, S. Kojima, M. Arima, I. Komuro, G. Ishii, T. Miki, S. Hirose, N. Miyasaka, M. Taniguchi, T. Ochiai, K. Isono, and T. Tokuhisa. The role of Bcl6 in mature cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 42: 670-679. 1999.
45. Ye, B. H., G. Cattoretti, Q. Shen, J. Zhang, N. Hawe, R. de Waard, C. Leung, M. Nouri-Shirazi, A. Orazi, R. S. Chaganti, P. Rothman, A. M. Stall, P. P. Pandolfi, and R. Dalla-Favera. The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat Genet* 16: 161-170. 1997.
46. Ozaki, K., R. Spolski, C. G. Feng, C. F. Qi, J. Cheng, A. Sher, H. C. Morse, C. Liu, P. L. Schwartzberg, and W. J. Leonard. A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science* 298: 1630-1634. 2002.

47. Totsuka, T., T. Kanai, S. Makita, R. Fujii, Y. Nemoto, S. Oshima, R. Okamoto, A. Koyanagi, H. Akiba, K. Okumura, H. Yagita, and M. Watanabe. Regulation of murine chronic colitis by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> programmed death-1<sup>+</sup> T cells. *Eur J Immunol* 35: 1773-1785. 2005.
48. Lee, Y. H., J. H. Woo, S. J. Choi, J. D. Ji, and G. G. Song. Association of programmed cell death 1 polymorphisms and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Lupus* 18: 9-15. 2009.
49. Liu, J. L., F. Y. Zhang, Y. H. Liang, F. L. Xiao, S. Q. Zhang, Y. L. Cheng, C. D. Yuan, Q. P. Chen, S. Yang, and X. J. Zhang. Association between the PD1.3A/G polymorphism of the PDCD1 gene and systemic lupus erythematosus in European populations: a meta-analysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 23: 425-432. 2009.
50. Kristjansdottir, H., K. Steinsson, I. Gunnarsson, G. Gröndal, K. Erlendsson, and M. E. Alarcón-Riquelme. Lower expression levels of the programmed death 1 receptor on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells and correlation with the PD-1.3A genotype in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 62: 1702-1711. 2010.
51. Sarra, M., E. Franzè, F. Pallone, and G. Monteleone. Targeting interleukin-21 in inflammatory diseases. *Expert Opin Ther Targets* 15: 695-702. 2011.
52. Yuan, F. L., W. Hu, W. G. Lu, X. Li, J. P. Li, R. S. Xu, C. W. Li, F. H. Chen, and C. Jin. Targeting interleukin-21 in rheumatoid arthritis. *Mol Biol Rep* 38: 1717-1721. 2011.

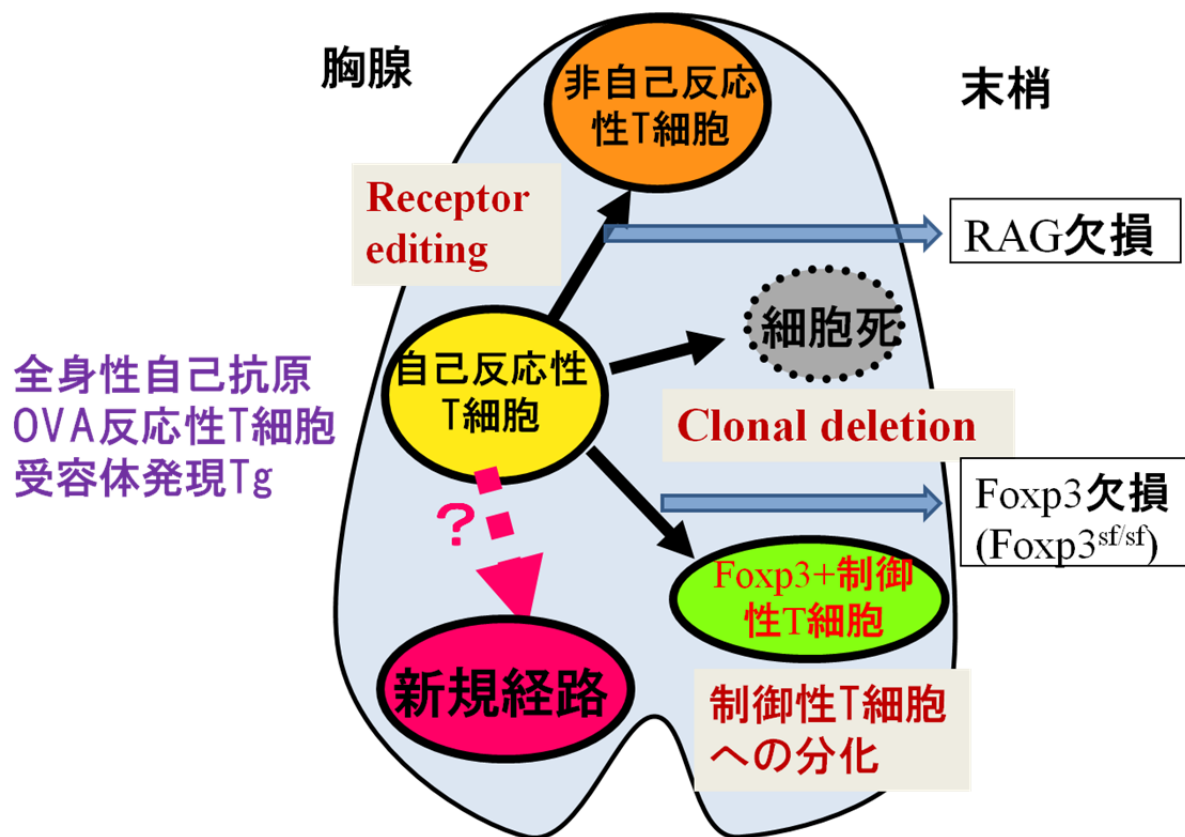


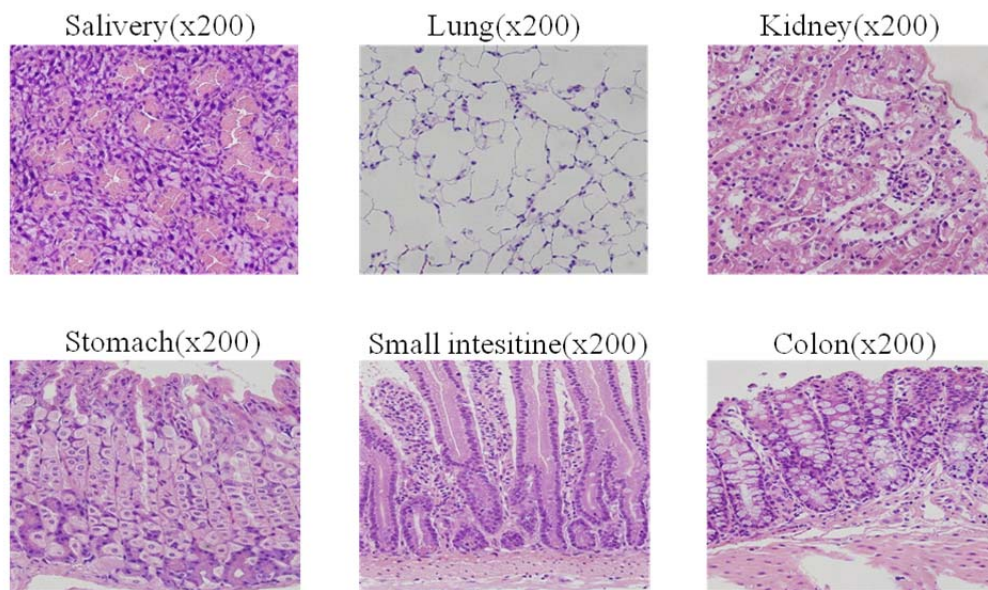
図 1. RDBLSf マウスの系の樹立

- A. Rag2 を欠き TCR 改変が生じず自己反応性 T 細胞が非自己反応性 T 細胞に回避する経路が遮断され、かつ Foxp3 陽性制御性 T 細胞への分化経路が遮断された際に出現してくる  $CD4^+$ T 細胞の解析をすることで、中枢性 T 細胞トレランスにおける新規分化経路を検討することを目的とした。

表 1

マウスの種類	記載	B 細胞	T 細胞	TCR 改変	自己反応性 TCR	Foxp3
DO11.10	DO	+	+	+	-	+
Ld-nOVA×DO11.10	DBL	+	+	+	一部+	+
TCR $\alpha^{-/-}$ DO11.10	aKODO	+	+	±	-	+
TCR $\alpha^{-/-}$ (Ld-nOVA×DO11.10)	aKODBL	+	+	±	ほとんど+	+
Rag2 $^{-/-}$ DO11.10	RDO	-	+	-	-	+
Rag2 $^{-/-}$ (Ld-nOVA×DO11.10)	RDBL	-	+	-	全て+	+
Rag2 $^{-/-}$ DO11.10 Foxp3 <sup>sf/sf</sup>	RDOSf	-	+	-	-	-
Rag2 $^{-/-}$ (Ld-nOVA×DO11.10) Foxp3 <sup>sf/sf</sup>	RDBLSf	-	+	-	全て+	-

A



B

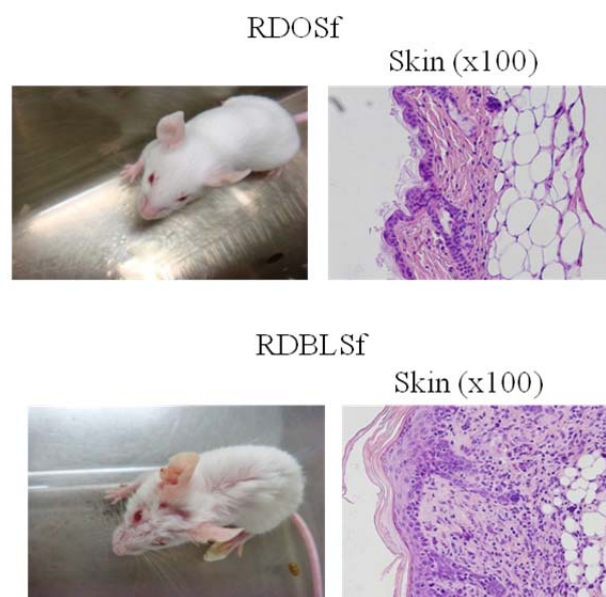


図 2. RDBLSf マウスにおける各臓器の組織所見

- A. RDBLSf マウスにおける唾液腺、肺、腎臓、胃、小腸、大腸の HE 染色の病理組織標本
- B. RDBLSf マウスと RDOSf マウスにおける肉眼的所見（外観）と皮膚の HE 染色の病理組織標本

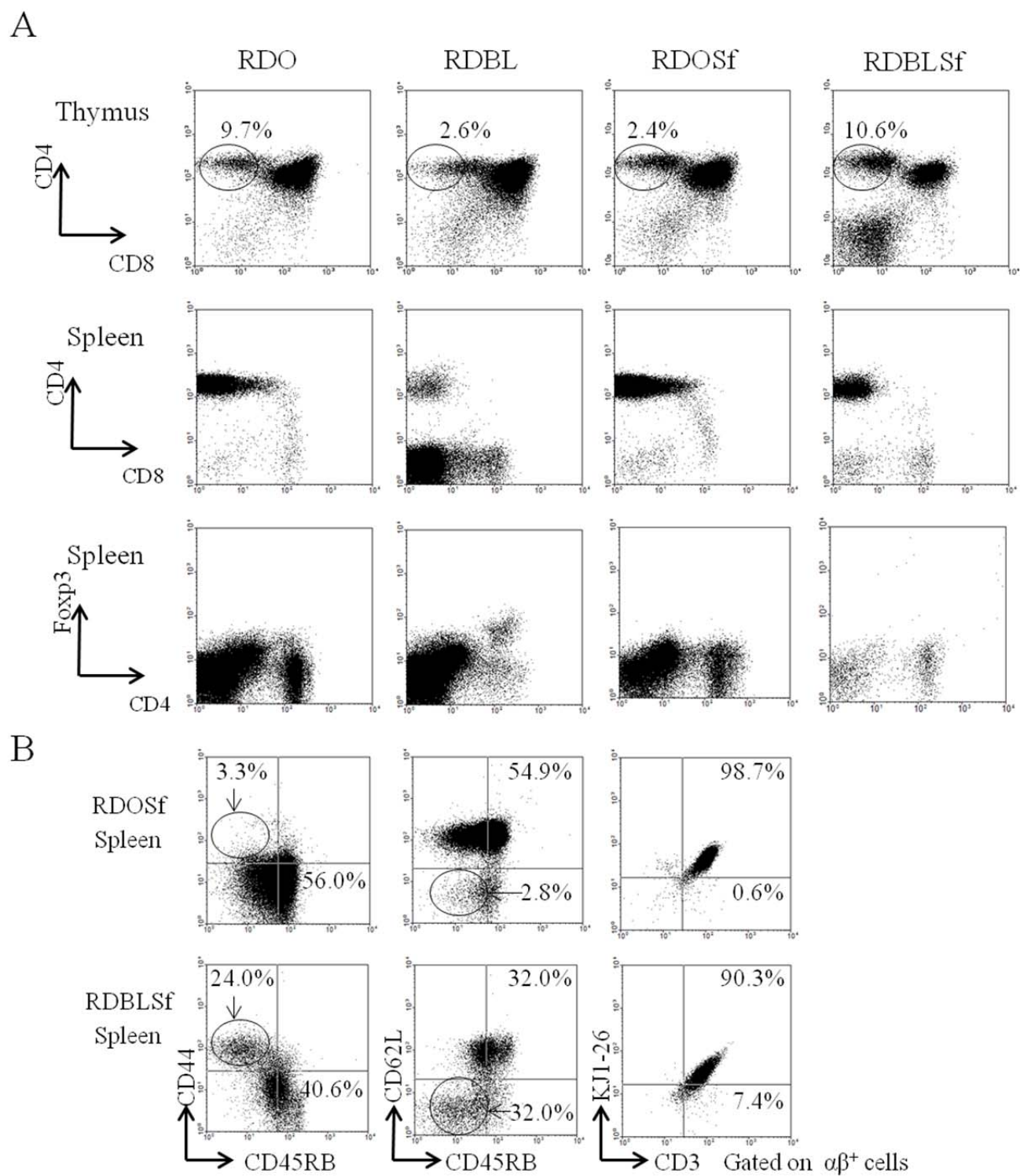


図 3. RDBLSf マウスの自己反応性 T 細胞の CD4 single positive 細胞への分化

- A. RDO マウス、RDOSf マウス、RDBL マウス、RDBLSf マウスの胸腺細胞、脾細胞を採取し、flow cytometry により CD4、CD8、Foxp3 の発現について検討した。
- B. RDOSf マウス、RDBLSf マウスの脾細胞を採取し、flow cytometry にて CD44、CD45RB、CD62L、KJ1-26、CD3 の発現について検討した。



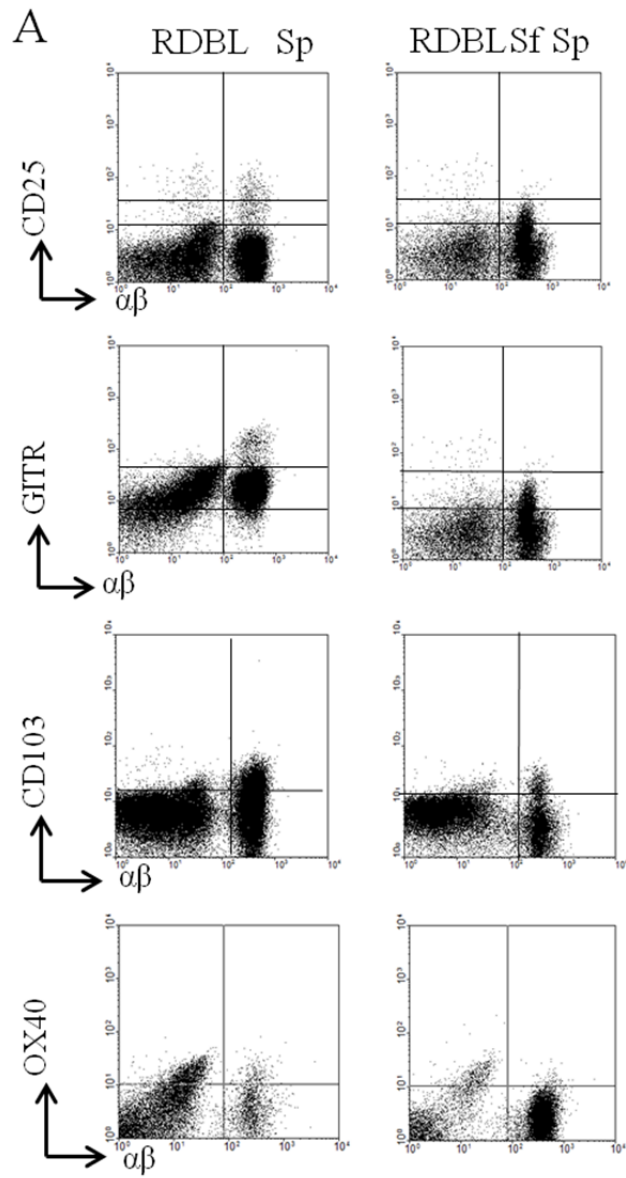


図 4. RDBLSf マウスの  $\text{TCR}\alpha\beta^+$ T 細胞における Treg 細胞特徴的 surface 分子の検討  
 A. Flow cytometry により RDBL マウスと RDBLSf マウスの脾細胞における CD25、GITR、CD103、OX40 の発現について検討した。

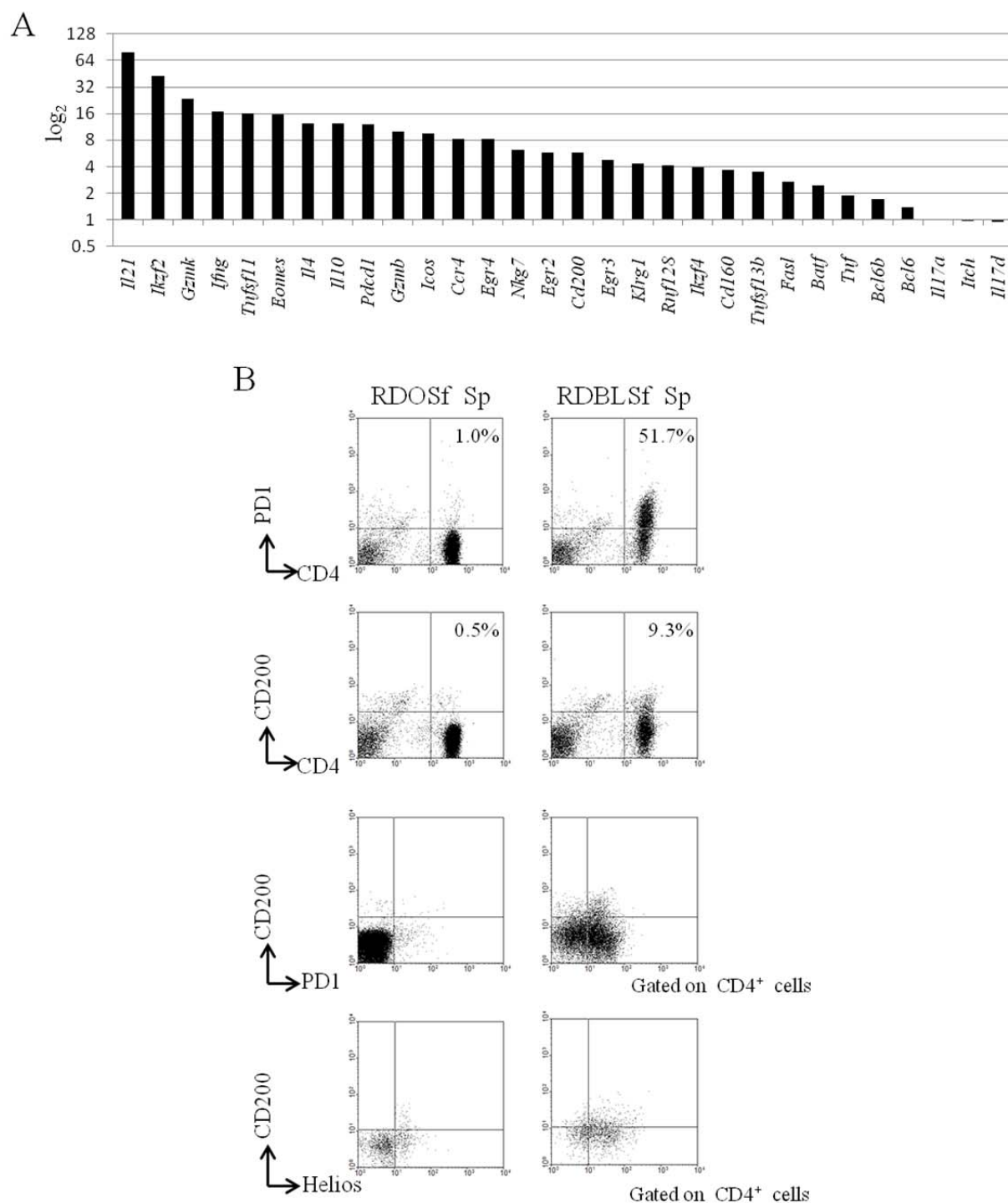


図 5. RDBLSf マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞における特徴的な表面分子・転写因子等の発現

A. RDBLSf マウスと RDOSf マウスの脾臓由来の CD4<sup>+</sup>T 細胞を比較してマイクロアレイにて遺伝子発現の差異を解析した。RDOSf マウスに対する RDBLSf マウスの脾臓由来の CD4<sup>+</sup>T 細胞に発現する遺伝子発現の比率をヒストグラムにて表した。

B. RDOSf マウスと RDBLSf マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞における PD-1、CD200、Helios の発現を flow cytometry にて検討した。

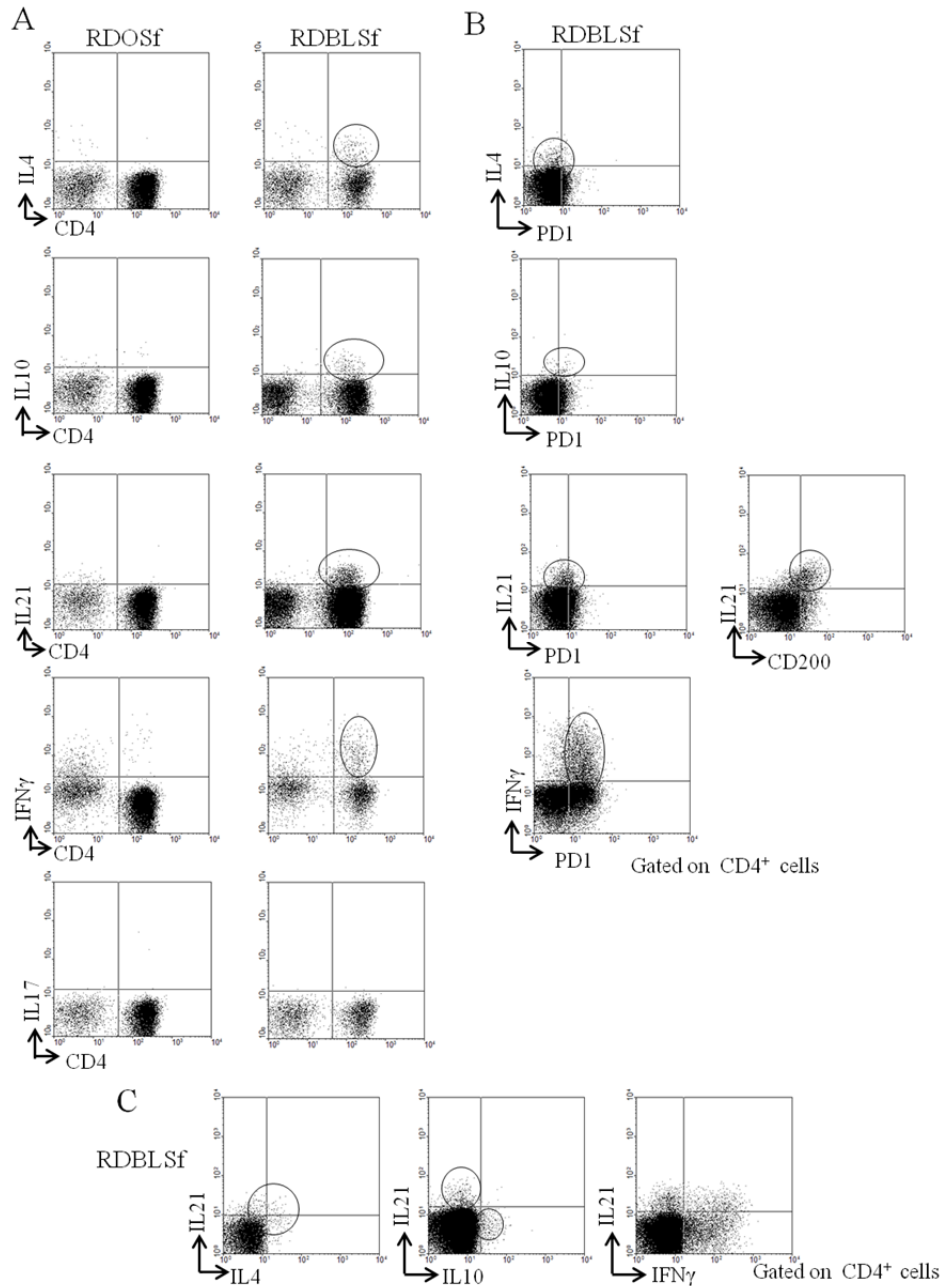


図 6. RDBLSf マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞のサイトカイン産生能

- RDOSf マウスと RDBLSf マウスの脾細胞を PMA と ionomycin で 4 時間刺激培養後に intracellular cytokine staining による染色を行った。Flow cytometry にて CD4、IL-4、IL-10、IL-21、IFN-γ、IL-21 の発現を検討した。
- RDBLSf マウスの PD1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞における IL-4、IL-10、IL-21、IFN-γ の産生を flow cytometry にて解析した。また、IL-21 産生に関しては、RDBLSf マウスの CD200<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞との検討も行った。
- RDBLSf マウスにおいて、IL-21 産生性の CD4<sup>+</sup>T 細胞のサイトカイン産生パターンを解析するため、flow cytometry にて IL-4 と IL-21、IL-10 と IL-21、IFN-γ と IL-21 の各々 2 重染色を行い検討した。

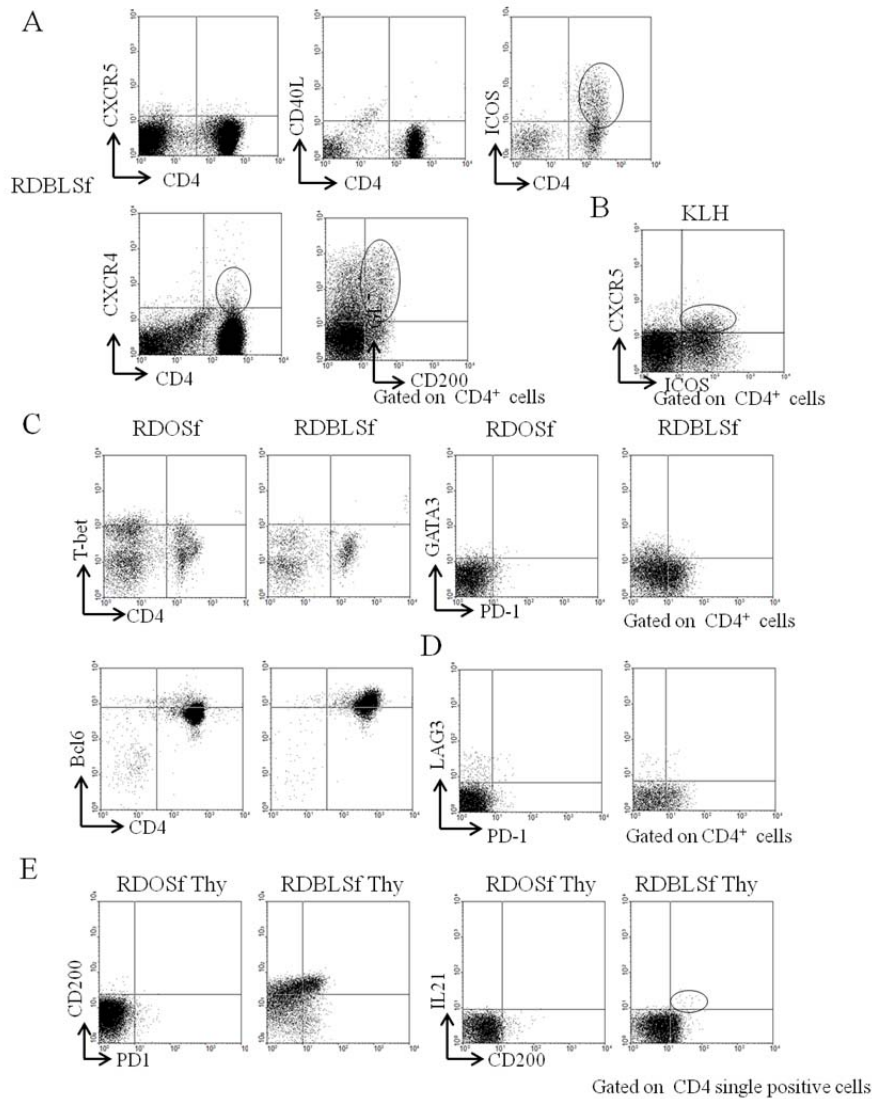


図 7. RDBLSf マウスの  $CD4^+$ T 細胞における Tfh 細胞に特徴的な表面分子、転写因子の発現

- RDBLSf マウスの末梢の  $CD4^+$ T 細胞において、従来の Tfh 細胞の表面分子、すなわち CXCR5、CD40L、ICOS、CXCR4、CD200、GL7 の発現を flow cytometry にて検討した。
- KLH で免疫し Tfh 細胞を誘導した系の  $ICOS^+CD4^+$ T 細胞において CXCR5 の発現を flow cytometry にて検討した。
- RDBLSf マウスの末梢の  $CD4^+$ T 細胞において、flow cytometry にて T-bet、GATA3、Bcl-6 の発現を検討した。
- RDBLSf マウスの末梢の  $CD4^+$ T 細胞において、LAG3 陽性 Treg 細胞の表面分子 LAG3 の発現を flow cytometry にて検討した。
- RDOSf マウスと RDBLSf マウスの胸腺の CD4 single positive T 細胞において、PD-1、CD200、IL-21 の発現を flow cytometry にて検討した。

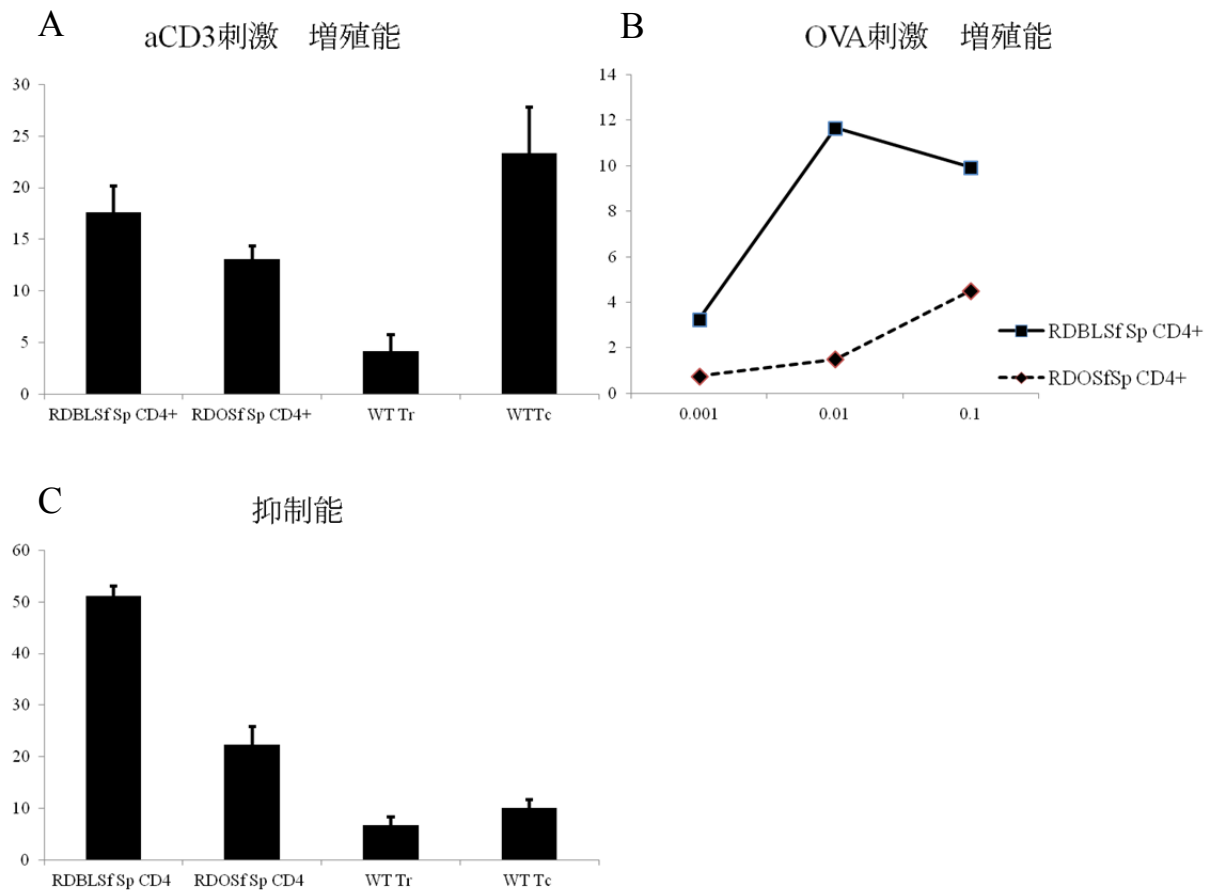


図 8. RDBLSf マウスの  $CD4^+$ T 細胞の in vitro での増殖反応

- A. RDBLSf マウスと RDOSf マウスの  $CD4^+$ T 細胞、WT マウスの  $CD25^+CD4^+$ 制御性 T 細胞(Tr)、WT マウスの  $CD25^-CD4^+$ T 細胞(Tc)各々( $3 \times 10^4$ /well) をプレート結合抗 CD3 抗体( $10 \mu\text{g/ml}$ )で刺激培養を行った。 [ $^3\text{H}$ ] チミジン  $1 \mu\text{Ci/well}$  のパルスで 16 時間行い、取り込まれた [ $^3\text{H}$ ] チミジンの量を測定し細胞増殖能を各細胞間で比較した。計 6 回の結果の平均と標準偏差を棒グラフに示した。
- B. A.で使用した RDBLSf マウスと RDOSf マウスの  $CD4^+$ T 細胞、WT マウスの Tr と Tc 各細胞( $3 \times 10^4$ /well) を X 線照射した APC 細胞( $1 \times 10^5$ /well)と共に OVA 濃度を  $0.001 \mu\text{M}$ 、 $0.01 \mu\text{M}$ 、 $0.1 \mu\text{M}$  に振って刺激培養を行った。A.と同様の条件で、 [ $^3\text{H}$ ] チミジンにより細胞増殖能を測定した。
- C. RDBLSf マウスと RDOSf マウスの  $CD4^+$ T 細胞、WT マウスの Tr と Tc 各細胞 ( $3 \times 10^4$ /well)に WT マウスの Tc ( $3 \times 10^4$ /well)、X 線照射した APC 細胞( $1 \times 10^5$ /well)を加え、抗 CD3 抗体( $10 \mu\text{g/ml}$ )で刺激培養を行った。A.と同様の条件で [ $^3\text{H}$ ] チミジンにより細胞抑制能を測定した。計 6 回の結果の平均と標準偏差を棒グラフに示した。

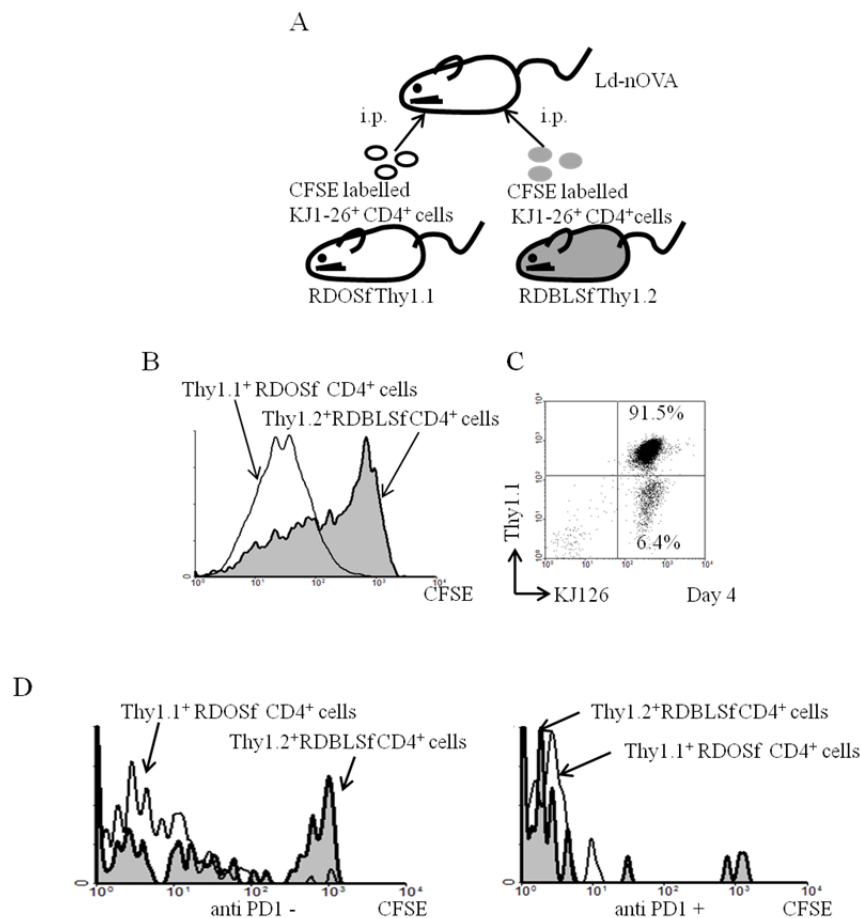


図 9. RDBLSf マウスの  $CD4^+$ T 細胞の in vivo での増殖反応

- A. Thy1.1<sup>+</sup>RDOSf マウスの  $CD4^+$ T 細胞( $2.5 \times 10^6$  cells)と Thy1.2<sup>+</sup>RDBLSf マウスの  $CD4^+$ T 細胞( $2.5 \times 10^6$  cells)を MACS にて分離し、CFSE ラベルした後 1 : 1 に混合し Ld-nOVA マウスの腹腔内に移入後 4 日目に解析を行った。
- B. 移入後 4 日目にレシピエントマウスである Ld-nOVA マウスの脾細胞を採取し、flow cytometry を用いて Thy1.1<sup>+</sup>RDOSf マウス由来の KJ1-26<sup>+</sup> $CD4^+$ T 細胞と Thy1.2<sup>+</sup>RDBLSf マウス由来の KJ1-26<sup>+</sup> $CD4^+$ T 細胞の CFSE の蛍光強度をヒストグラムにて比較検討した。
- C. B と同様、移入後 4 日目に Ld-nOVA マウスの脾細胞を採取し、flow cytometry を用いて KJ1-26 と Thy1.1 の発現を検討した。
- D. A.B と同様、MACS にて分離した Thy1.1<sup>+</sup>RDOSf マウスの  $CD4^+$ T 細胞( $1.3 \times 10^6$  cells)と Thy1.2<sup>+</sup>RDBLSf マウスの  $CD4^+$ T 細胞( $1.3 \times 10^6$  cells)を CFSE ラベルした後 1 : 1 に混合し、Ld-nOVA マウスの腹腔内に移入する際、同時に抗 PD-1 抗体 (200 $\mu$ g/mouse) の腹腔内注射するか否かの条件で比較して解析を行った。移入後 4 日目に Ld-nOVA マウスの脾細胞を採取し、flow cytometry を用いて抗 PD1 抗体の有無の各条件下で Thy1.1<sup>+</sup>RDOSf マウス由来の KJ1-26<sup>+</sup> $CD4^+$ T 細胞と Thy1.2<sup>+</sup>RDBLSf マウス由来の KJ1-26<sup>+</sup> $CD4^+$ T 細胞の CFSE の蛍光強度をヒストグラムにて比較検討した。



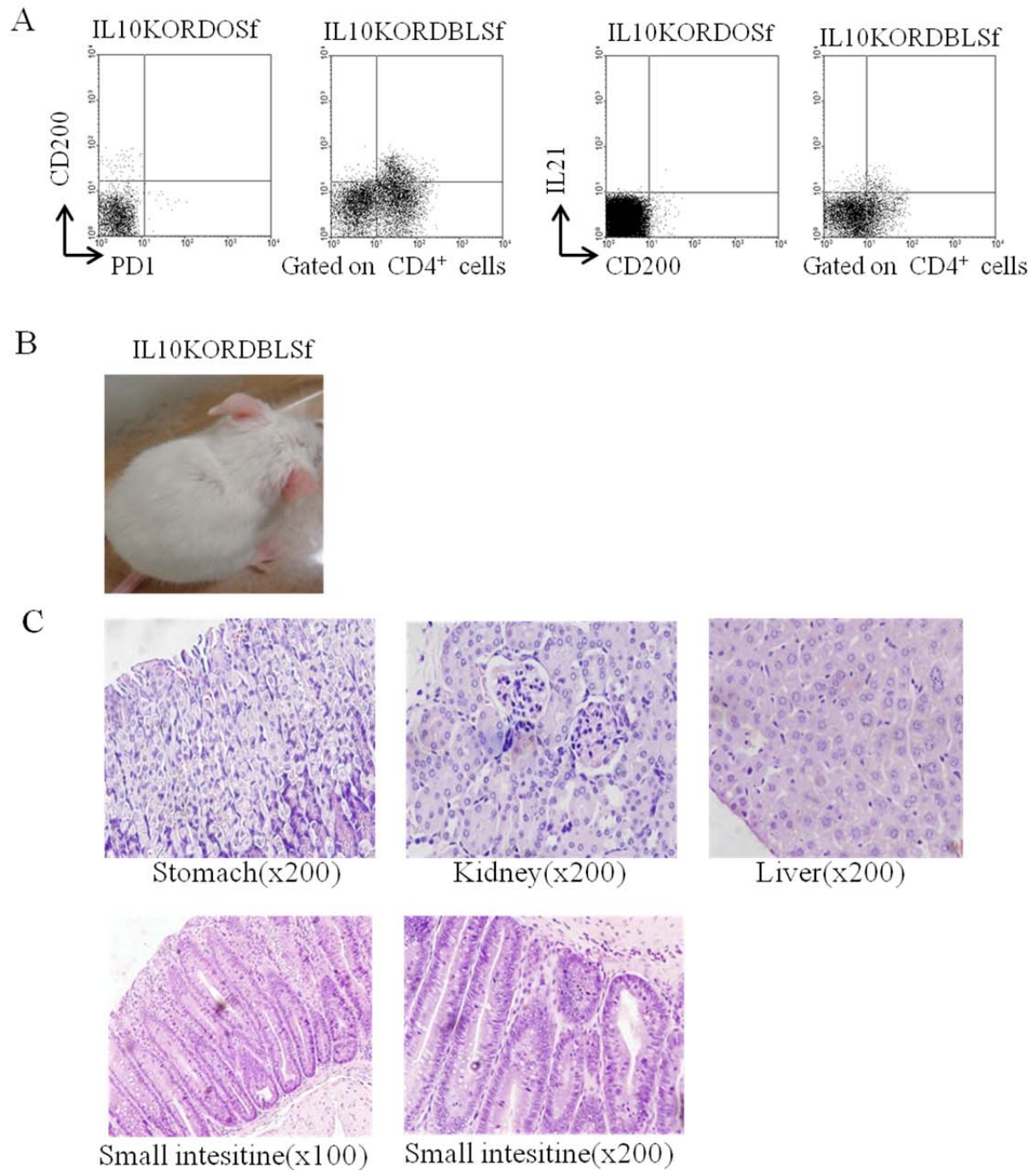


図 10. IL10 欠損 RDBLSf マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞の解析と組織所見

- A. IL10 欠損 RDOSf マウス (IL10KORDOSf) と IL10 欠損 RDBLSf マウス (IL10KORDBLSf) の脾臓から採取した CD4<sup>+</sup>T 細胞における PD-1、CD200、IL-21 の発現を flow cytometry にて比較検討した。
- B. IL10 欠損 RDBLSf マウスの肉眼的所見 (外観)
- C. IL10 欠損 RDBLSf マウスの胃、腎臓、肝臓、小腸の HE 染色の病理組織標本

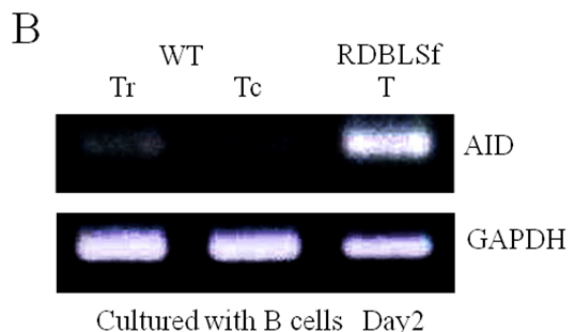
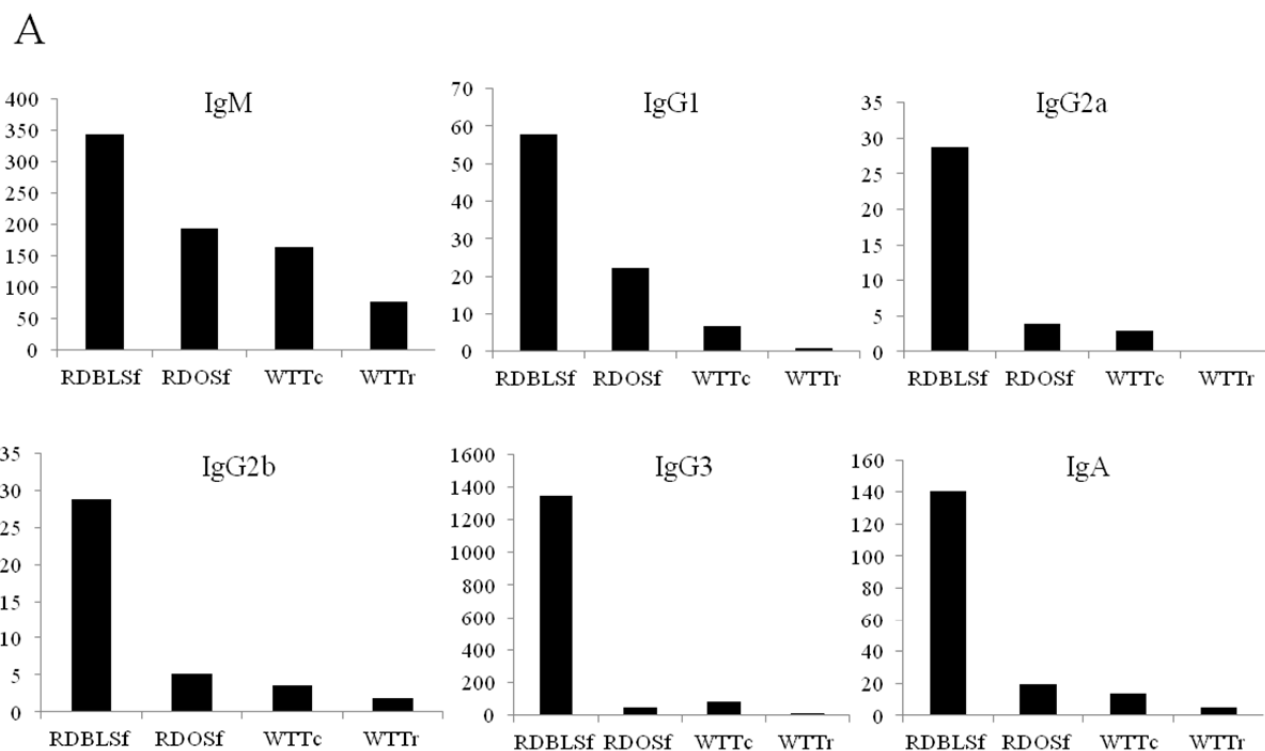


図 11. RDBLSf マウスの  $CD4^+T$  細胞の免疫グロブリン産生やクラススイッチにおけるヘルパー機能

- A. RDBLSf マウスの  $CD4^+T$  細胞( $3 \times 10^4$ )、RDOSf マウスの  $CD4^+T$  細胞( $3 \times 10^4$ )、WT マウスの  $CD25^-CD4^+T$  細胞(Tc:  $3 \times 10^4$ )、WT マウスの  $CD25^+CD4^+T$  細胞(Tr:  $3 \times 10^4$ ) を各々WT マウスの  $CD19^+B$  細胞( $2 \times 10^5$ )と共培養し抗CD3 抗体( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ )で刺激した。9 日後に上清を用いて ELISA にて免疫グロブリンの測定を行い各細胞間で比較検討した。計 2 回の結果を平均して棒グラフに示した。
- B. 培養 2 日目に培養中の細胞を回収し cDNA を作製し、PCR にて WT マウスの Tr、Tc、RDBLSf マウスの  $CD4^+T$  細胞各々と共培養した B 細胞の AID (activation induced cytidine deaminase)の発現を比較検討した。



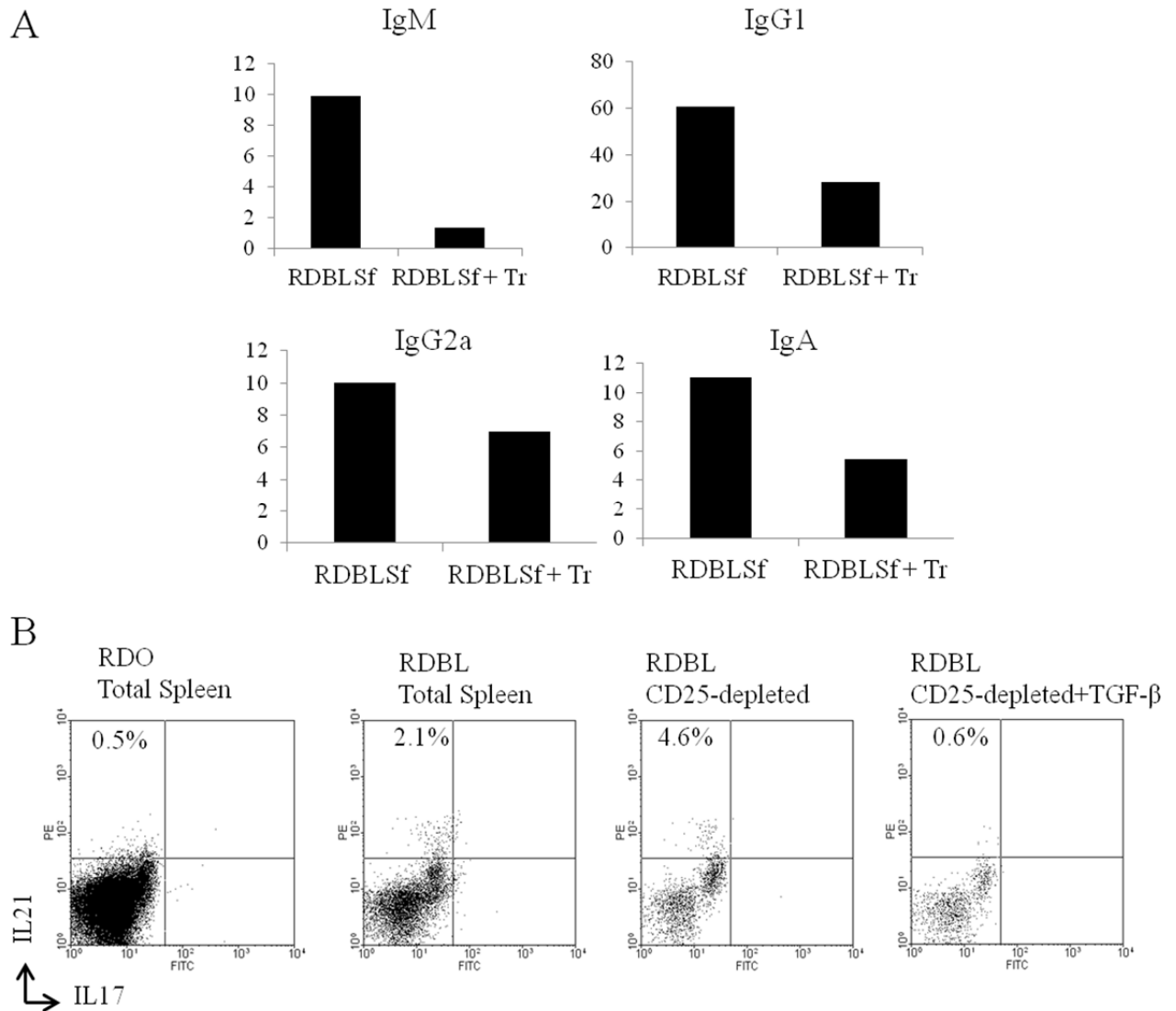


図 12. Treg 細胞による RDBLSf マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞の免疫グロブリン産生やクラススイッチにおける制御

- A. RDBLSf マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞( $3 \times 10^4$ ) と WT マウスの CD19<sup>+</sup>B 細胞( $2 \times 10^5$ )の共培養に、WT マウスの CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞(Tr:  $3 \times 10^4$ )を加えるか否かの条件で分けて、抗 CD3 抗体( $10 \mu\text{g/mL}$ )で刺激培養した。9 日後に上清を用いて ELISA にて免疫グロブリンの測定を行い比較検討した。
- B. RDO マウス、RDBL マウスの全脾細胞、RDBL マウスの脾細胞から MACS にて CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞を除いた細胞群を各々 OVA peptide( $1 \mu\text{M}$ )で 5 日間刺激培養した。また、一部 TGF $\beta$ ( $2 \text{ ng/mL}$ )を加えた条件で同様に刺激培養を行った。5 日間培養後、培養細胞を回収洗浄して、flow cytometry にて IL17、IL21 の発現を検討した。

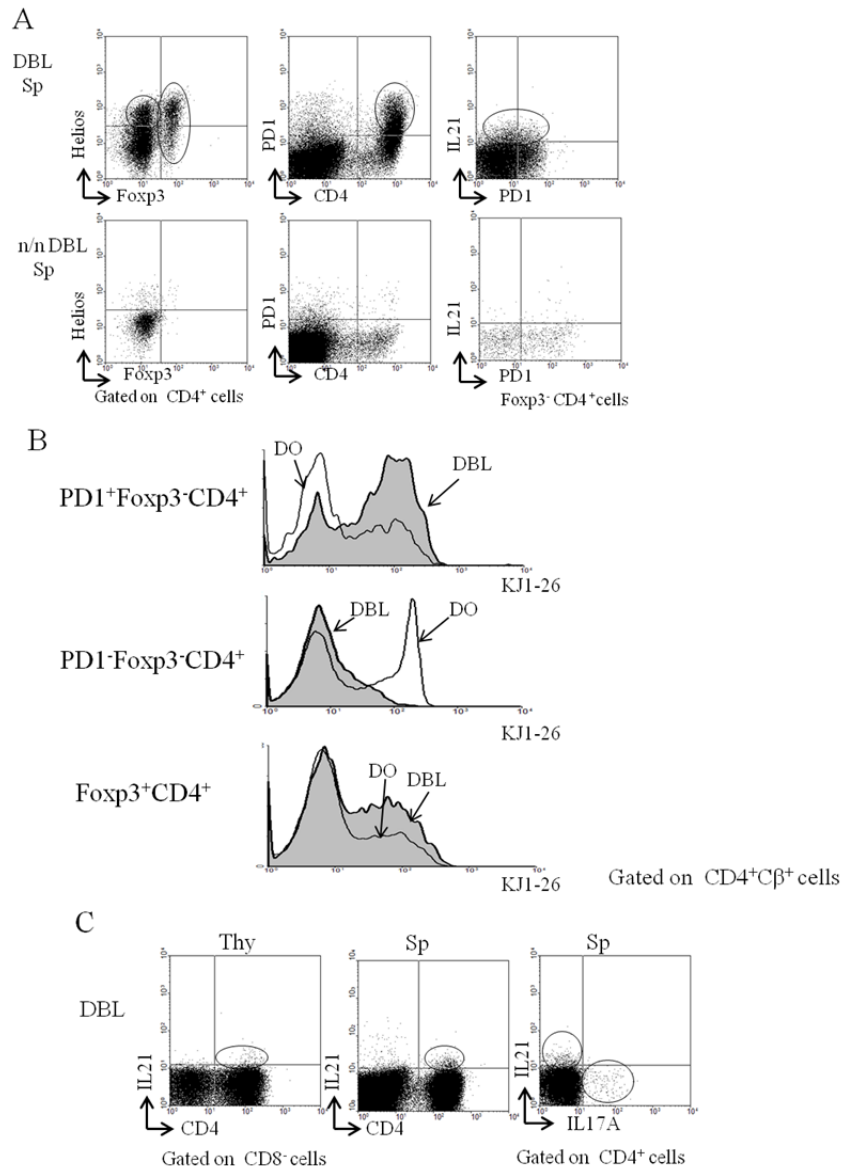
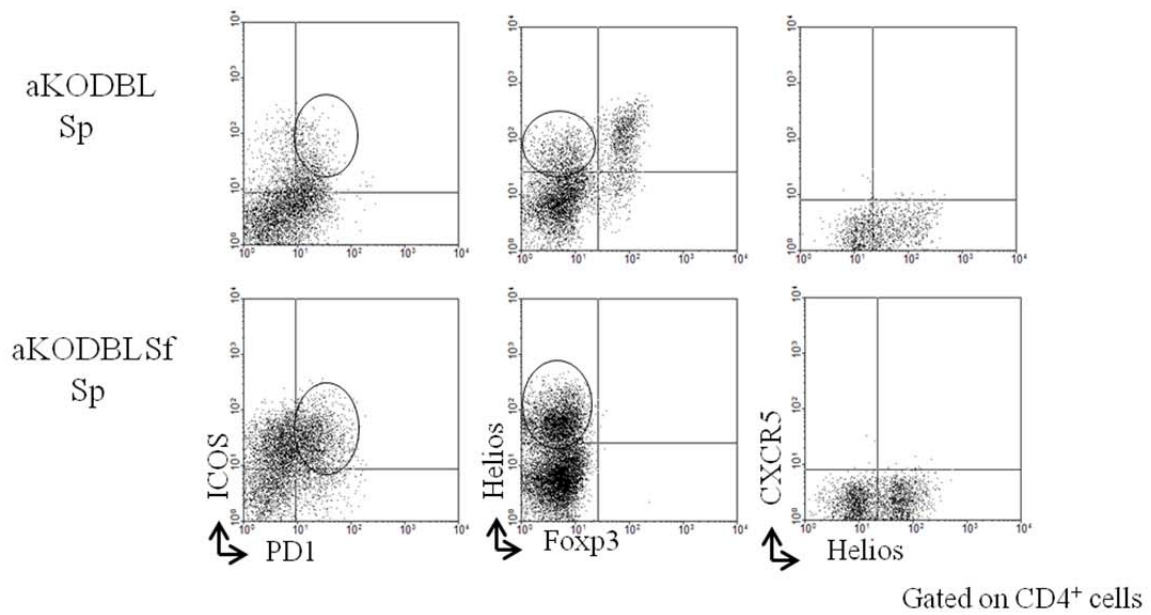


図 13. Rag2 と Treg 細胞が存在する条件下での natural Tfh 細胞の分化

- A. Rag2 と Treg 細胞が存在する DBL マウスの末梢で natural Tfh 細胞が存在しているか検討するため flow cytometry にて Foxp3、Helios、PD-1、IL-21、CD4 の発現を示した。また、胸腺のない n/nDBL マウスでも同様に flow cytometry にて Foxp3、Helios、PD-1、IL-21、CD4 の発現を検討し DBL マウスと比較した。
- B. DBL マウスにおける natural Tfh 細胞すなわち PD-1<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞の自己反応性を検討するため、DO マウスと DBL マウスの脾臓を採取し、flow cytometry にて KJ1-26、PD-1、Foxp3、CD4 を染色し、histogram にて PD-1<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞、PD-1<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞、Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞各々の KJ1-26 のクロノタイプの発現強度を比較検討した。
- C. DBL マウスの胸腺の CD8<sup>+</sup>細胞において flow cytometry にて CD4 と IL-21 の発現を検討した。また、DBL マウスの脾臓においても flow cytometry にて IL-21、IL-17A、CD4 の発現を示した。

A



B

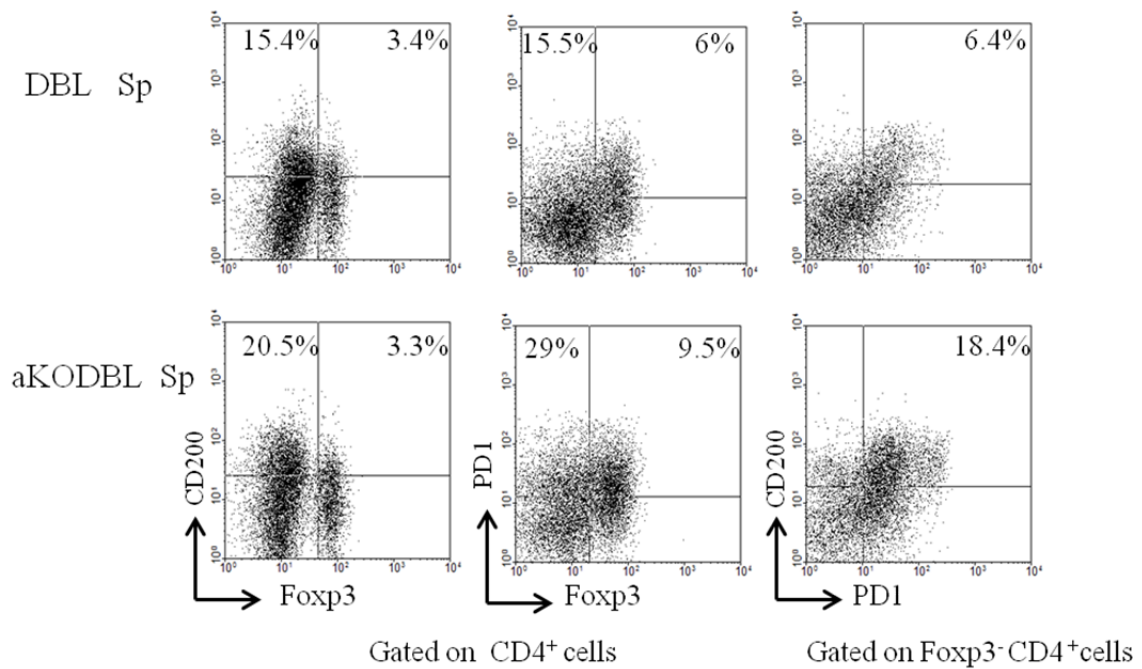


図 14. TCR $\alpha$  欠損 DBL マウス、TCR $\alpha$  欠損 DBLSf マウスにおける natural Tfh 細胞の検討

- A. TCR $\alpha$  欠損 DBL マウス(aKODBL)と TCR $\alpha$  欠損 DBLSf マウス(aKODBLSf)の脾臓を採取し、flow cytometry を用いて ICOS、PD-1、Foxp3、Helios、CXCR5、CD4 の発現について検討した。
- B. DBL マウスと TCR $\alpha$  欠損 DBL マウスの脾臓を採取し CD200、PD-1、Foxp3、CD4 の発現について比較検討した。

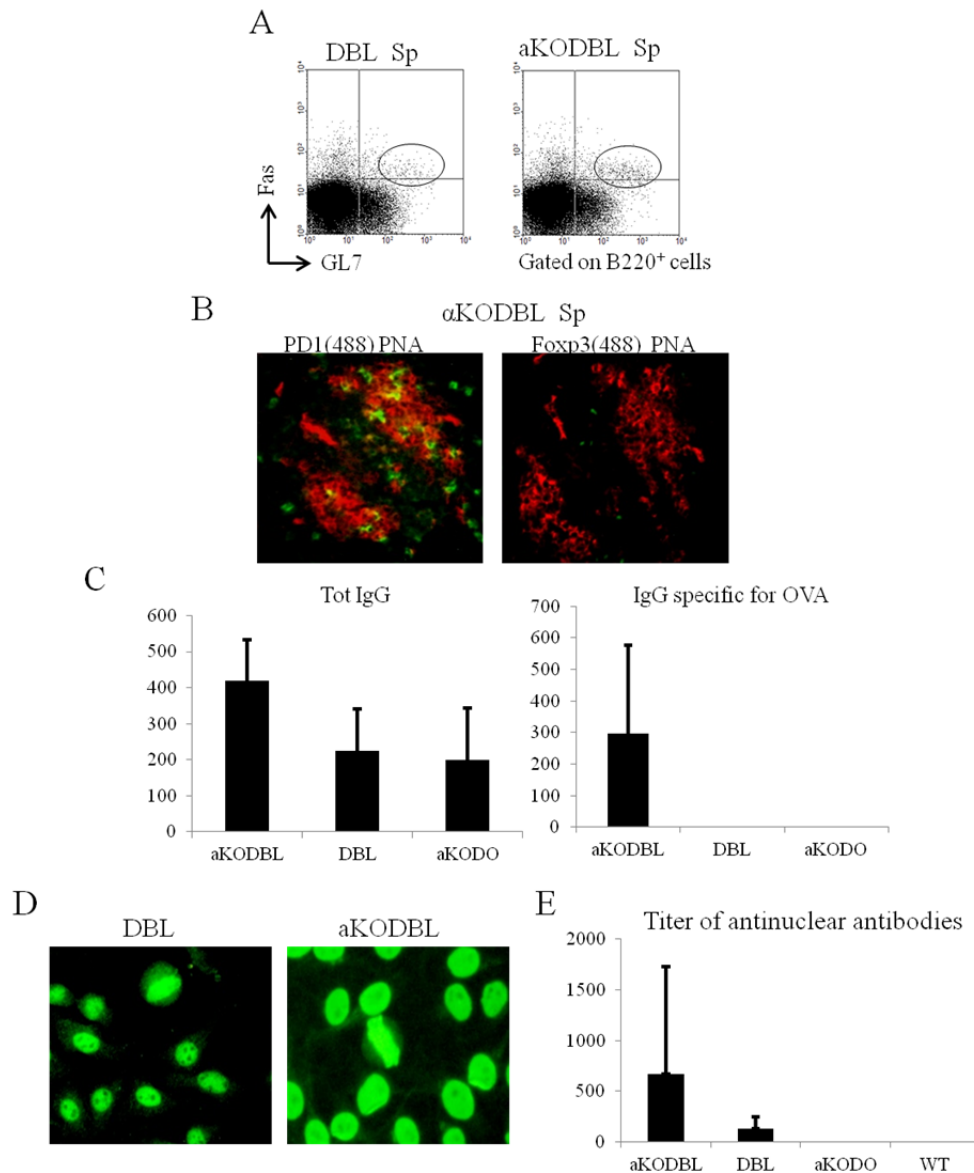


図 15. DBL マウス、TCR $\alpha$  欠損 DBL マウスにおける natural Tfh 細胞の生体内での役割

A. DBL マウス、TCR $\alpha$  欠損 DBL マウス(aKODBL)の脾臓を採取し、flow cytometry にて GL7、Fas、B220 の発現について検討した。

B. TCR $\alpha$  欠損 DBL マウスの脾臓の一部を凍結切片とし、蛍光免疫染色を行い、germinal center の形成について組織学的に評価した。

C. TCR $\alpha$  欠損 DBL マウス、DBL マウス、TCR $\alpha$  欠損 DO マウス(aKODO)の血清を採取し、各血清の総 IgG、OVA 特異的 IgG を ELISA にて測定し、比較検討した。各マウス 5 匹ずつの平均と標準偏差を棒グラフに示した。

D. DBL マウス、TCR $\alpha$  欠損 DBL マウスの血清の抗核抗体の産生を蛍光抗体法で検討した。

E. TCR $\alpha$  欠損 DBL マウス、DBL マウス、TCR $\alpha$  欠損 DO マウス、WT マウスの血清を採取し、各血清の抗核抗体価を蛍光抗体法により評価した。各マウス 5 匹ずつの平均と標準偏差を棒グラフに示した。

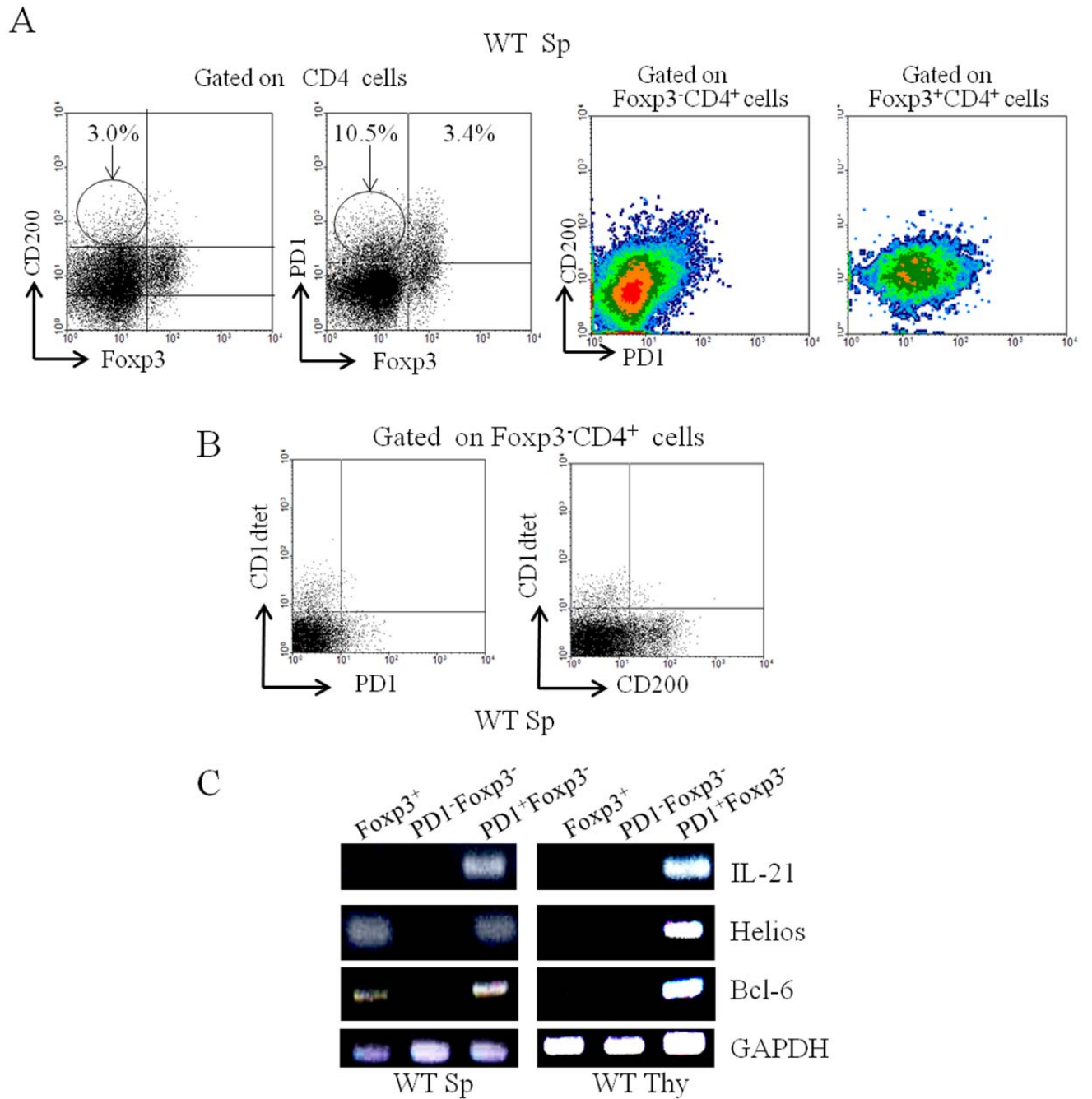


図 16. WT マウスにおける natural Tfh 細胞の検討

- A. WT マウスの脾臓において naturalTfh 細胞の存在を評価するため、flow cytometry にて Foxp3、CD200、PD-1、CD4 の発現について検討した。
- B. WT マウスの脾臓において natural Tfh-like 細胞と NKT 細胞の相違を評価するため、flow cytometry にて CD1d-tetramer、PD-1、CD200、Foxp3、CD4 で染色し検討した。
- C. WT マウスの脾臓、胸腺において Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞(Tr)、PD-1<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞(Tc)、PD-1<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞(natural Tfh-like 細胞)を flow cytometry の sorting 機能を用いて分離し、各々 RT-PCR を行い IL-21、Helios、Bcl-6 の発現を比較検討した。

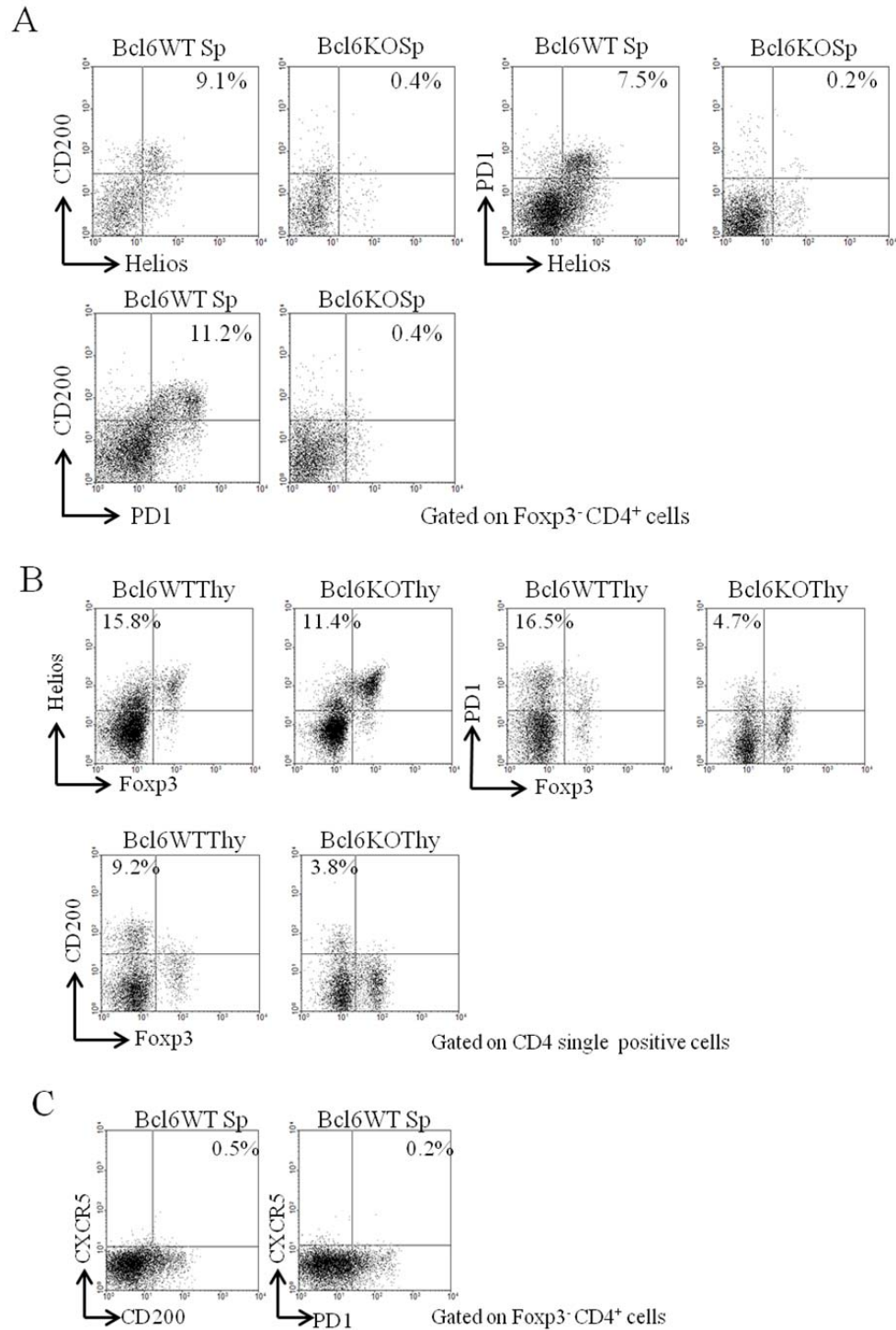


図 17. Bcl-6 欠損マウスでの natural Tfh 細胞の検討

- A. Bcl-6WT マウス(Bcl6WT)と Bcl-6 欠損マウス(Bcl6KO)の脾臓を採取し flow cytometry にて Helios、CD200、PD-1、Foxp3、CD4 の発現について比較検討した。
- B. Bcl-6WT マウスと Bcl-6 欠損マウスの胸腺を採取し flow cytometry にて Foxp3、Helios、PD-1、CD200、CD4、CD8 の発現について比較検討した。
- C. Bcl-6WT マウスの脾臓を採取し flow cytometry にて CXCR5、CD200、PD-1、Foxp3、CD4 の発現を検討した。



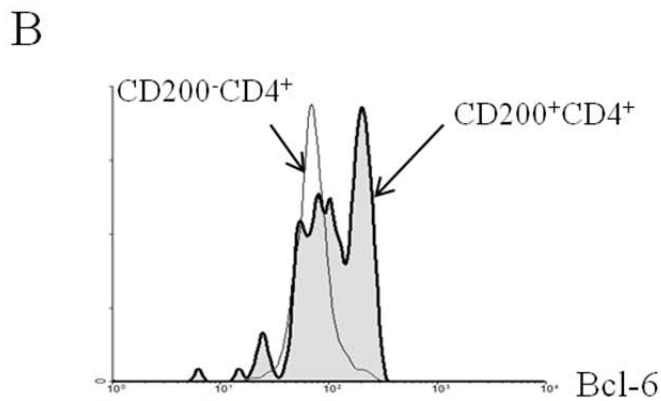
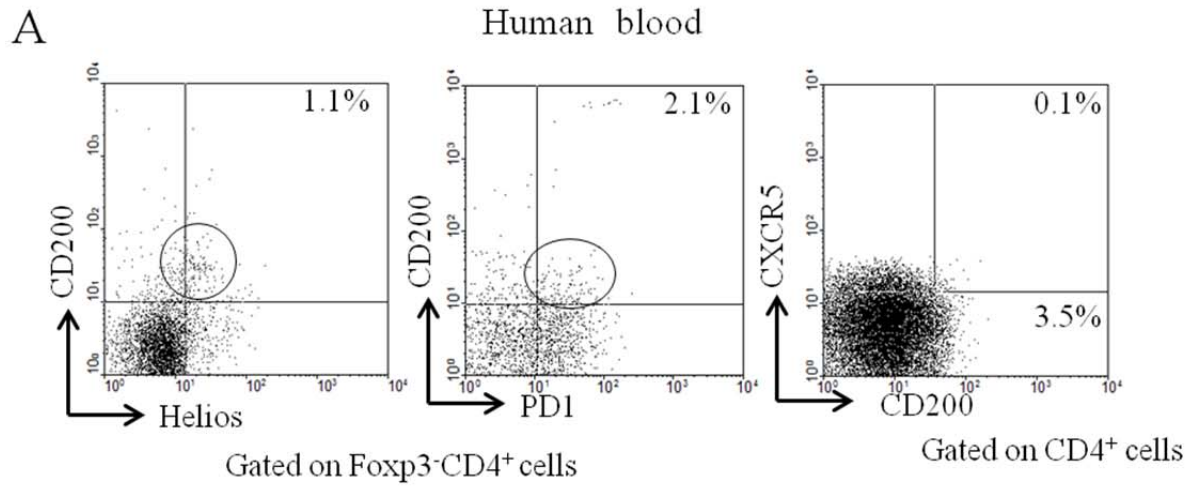


図 18. 健常ヒトにおける natural Tfh 細胞の検討

- A. 健常ヒトの血清を採取し、flow cytometry にて Helios、CD200、PD-1、CXCR5、Foxp3、CD4 の発現について検討した。
- B. 健常ヒトの血清において、flow cytometry にて CD200<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞と CD200<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞の Bcl-6 発現の強度を histogram で比較検討した。

表 2

	Natural Tfh 細胞	従来の Tfh 細胞
産生組織	胸腺	末梢リンパ組織
分化	自己抗原	外来抗原
表面分子	PD-1+, CD200+, CXCR5-, ICOS+, CXCR4+, GL-7+	PD-1+, CD200+,CXCR5+, ICOS+, CXCR4+, GL-7+
転写因子	Bcl-6+, Helios+	
主要産生サイトカイン	IL-21	
機能	B 細胞の抗体産生誘導能	
増殖能	生体内で split anergy	不明



A

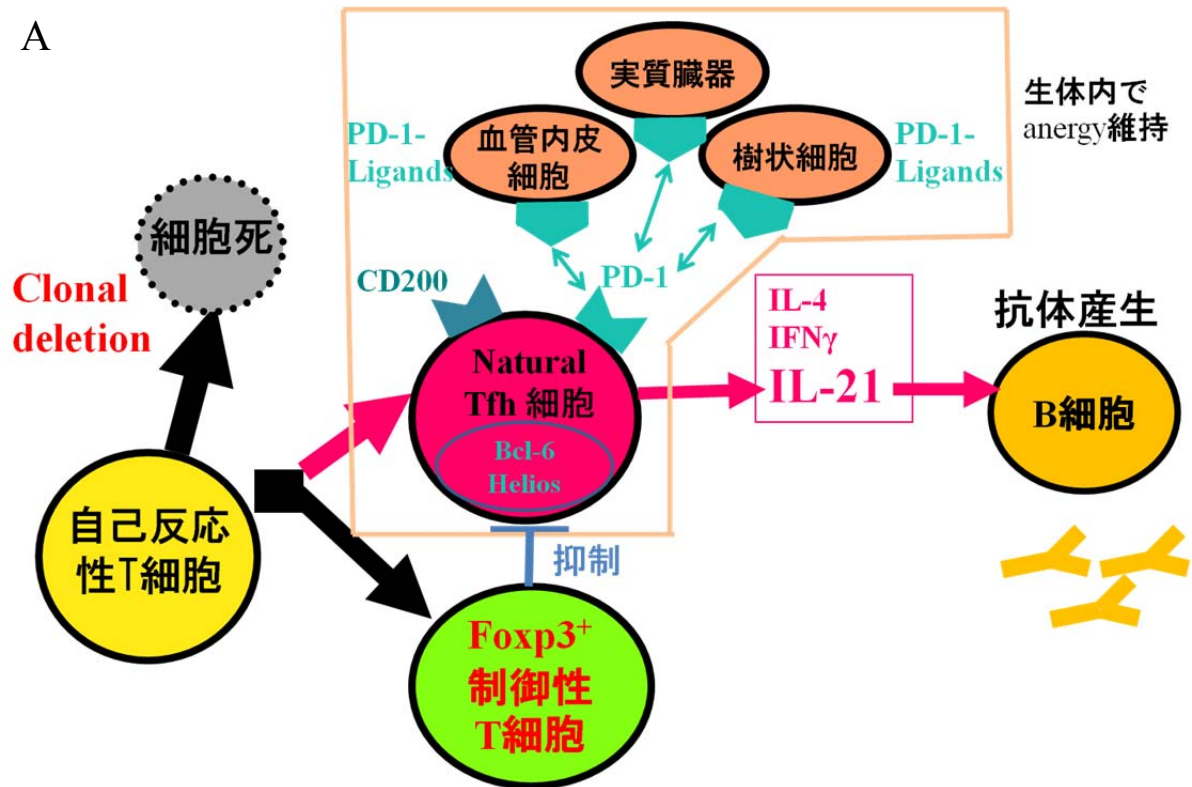


図 19. 中枢性 T 細胞トレランスにおける natural Tfh 細胞の位置づけと概念図

- A. 中枢性 T 細胞トレランスにおいて自己反応性 T 細胞は clonal deletion と Treg 細胞以外に新たな分化経路として natural Tfh 細胞への経路が存在する。natural Tfh 細胞は表面分子として CD200, PD-1、転写因子として Bcl-6, Helios を発現し、IL-21 を産生して B 細胞の抗体産生誘導能を有する細胞であった。また、増殖能においては、生体内では PD-1・PD-1Ligands との反応を通して split anergy の状態である。