

氏名(本籍)	やま した ゆ み (埼玉県) 山下由美(埼玉県)			
学位の種類	博士(医学)			
学位記番号	博甲第6596号			
学位授与年月日	平成25年3月25日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
審査研究科	人間総合科学研究科			
学位論文題目	新しい共刺激分子CD155によるTh1分化促進機構の解明			
主査	筑波大学教授	医学博士	住田孝之	
副査	筑波大学教授	医学博士	高橋智	
副査	筑波大学准教授	博士(医学)	楊景堯	
副査	筑波大学講師	博士(医学)	甲斐平康	

論文の内容の要旨

(目的)

ヘルパー T 細胞 (CD⁴⁺ T 細胞) は、獲得免疫応答において主要な役割を果たしている。CD⁴⁺ T 細胞は主にサイトカインの刺激によって Th1 細胞、Th2 細胞、Th17 細胞と呼ばれるエフェクター細胞に分化し、生体内ではアレルギーや自己免疫疾患など様々な疾患に関与している。CD155 (poliovirus receptor; PVR/Necl-5/Tag4) は腫瘍細胞に高発現し、NK 細胞、CD⁸⁺ T 細胞に発現する DNAM-1 との結合を介して NK 細胞、CD⁸⁺ T 細胞に細胞傷害活性を誘導する。一方 CD155 は免疫細胞にも発現している。しかし、CD155 の DNAM-1 リガンドとしての機能解明は進んでいるが、受容体としての機能は不明のままであった。本研究では、CD⁴⁺ T 細胞に高発現する CD155 の受容体としての機能を明らかにすることを目的とした。さらに、CD155 を標的としたアレルギー疾患の治療応用の可能性を探った。

(対象と方法)

- 1) CD⁴⁺ T 細胞上の CD155 の機能を解析するため、野生型 (CD155^{+/+}) C57BL/6 マウスより脾臓 CD⁴⁺ T 細胞を分離し CD3 (TCR のシグナル伝達を担う TCR 複合体のコンポーネントの一つ) と CD155 を特異抗体で刺激し、CD⁴⁺ T 細胞の分化・活性化を検討した。
- 2) CD155 を介した分化・活性化の分子メカニズムを解析するため、同様の刺激方法でシグナル伝達因子の活性化を検討した。
- 3) CD155 が生体内で生理的リガンドとの結合を介して共刺激シグナルを伝達しているか検討するため、CFSE ラベルした OT-II/CD155^{+/+}CD⁴⁺ T 細胞あるいは OT-II/CD155^{-/-}CD⁴⁺ T 細胞を DNAM-1^{+/+} レシピエントマウスに移入し、OVA を免疫して所属リンパ節での増殖を比較検討した。
- 4) CD155 を介した CD⁴⁺ T 細胞活性化を惹起する共刺激シグナルの分子メカニズムを解析するため、CD⁴⁺ T 細胞上の CD3 と CD155 を刺激し、ERK の活性化を検討した。
- 5) CD155 を介した Th1 細胞分化の分子メカニズムを解析するために、IFN- γ 受容体の下流で T-bet の発現を促進する Th1 分化の誘導に必須な STAT1 の活性化を、同様の刺激を行い検討した。
- 6) CD155 が IFN- γ の発現上昇に直接関与するか検討するために、IFN- γ を標的遺伝子の一つとする NF- κ B の

活性化について検討した。

7) Th1 疾患マウスモデルにおける CD155 の役割を検討するために、DNCB (1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン) を用いた接触性皮膚炎 (CHS) に関して、WT あるいは CD155 遺伝子欠損 (CD155^{-/-}) マウスに誘導し、病態の比較検討を行った。

8) CD4⁺ T 細胞上の CD155 の関与を検討するため、CD4⁺ T 細胞を Rag-1^{-/-} マウスに移入して CHS を誘導した。

9) CD155 の治療応用を検討するため、CHS 誘導時に抗 CD155 抗体を投与した。

10) Th2 疾患モデルにおける CD155 の役割を検討するために、好酸球性気道炎症卵白アルブミン (OVA) 特異的 TCR トランスジェニックマウスである OT-II 由来の CD4⁺ T 細胞および OVA を用いた好酸球性気道炎症について、WT あるいは CD155 遺伝子欠損 (CD155^{-/-}) マウスに誘導し、病態の比較検討を行った。

(結果)

1) CD4⁺ T 細胞上の CD3 と CD155 を特異抗体で刺激すると、CD3 単独刺激に比べ CD25、CD69 の発現上昇、増殖亢進、IL-2 産生亢進が認められた。これらのことから、CD155 が CD4⁺ T 細胞の活性化を促進する共刺激分子として機能していることが示された。

2) 1) と同様の刺激で Th1 細胞に特徴的なサイトカインである IFN- γ の産生亢進、Th1 細胞のマスターレギュレーターである T-bet の発現上昇、Th2 細胞のマスターレギュレーターである GATA-3 の発現低下が認められた。このことから、CD155 が Th1 細胞への分化を促進していることが示された。

3) OT-II/CD155^{+/+}CD4⁺ T 細胞に比べ OT-II/CD155^{-/-} CD4⁺ T 細胞の増殖が抑制されていた。レシピエントを DNAM-1^{-/-} マウスにした場合、OT-II/CD155^{+/+} CD4⁺ T 細胞においても OT-II /CD155^{-/-} CD4⁺ T 細胞と同等にまで細胞増殖が抑制された。このことから、生体内における CD155 による共刺激シグナルは DNAM-1 との結合を介して引き起こされていることが示された。

4) CD155 を刺激すると CD3 単独刺激に比べて ERK のリン酸化が増強した。このことから、CD155 を介した共刺激シグナルは、TCR シグナルの下流の ERK の活性化を増強することによって、CD4⁺ T 細胞活性化を促進していることが示された。

5) STAT1 のリン酸化・タンパク発現の増強が認められた。しかし IFN- γ 中和抗体あるいは IFN- γ 遺伝子欠損 CD4⁺ T 細胞を用いた場合には、STAT1 のリン酸化や発現の増強は認められなくなった。このことは、CD155 による STAT1 の活性化は、IFN- γ を介していることを示している。

6) CD4⁺ T 細胞上の CD3 と CD155 を特異抗体で刺激すると、CD3 単独刺激に比べて NF- κ B の活性化が亢進していた。これらのことから、CD155 は NF- κ B に作用し、IFN- γ の発現を促進して、Th1 分化誘導を促進したと考えられる。

7) CHS 病態の解析では、CD155^{+/+} マウスに比べ CD155^{-/-} マウスで病態が抑制された。

8) CD155^{+/+}CD4⁺ T 細胞移入群に比べ CD155^{-/-} CD4⁺ T 細胞移入群で CHS 病態が抑制された。これらのことから、CD4⁺ T 細胞上の CD155 が CHS の病態の増悪に関与していることが示された。

9) 抗 CD155 抗体を投与により、CHS がコントロール抗体投与群に比べて抑制された。このことから、CD155 が CHS 治療の有用な分子標的となることが示された。

10) 好酸球性気道炎症では、CD155^{+/+} マウスに比べ CD155^{-/-} マウスで病態が増悪した。この事実から、CD155 が生体内で Th2 型疾患の抑制、つまり Th2 免疫応答の抑制に関与していることが示された。

(考察)

CD155 による共刺激は、ERK のリン酸化を増強した。ERK は、ELK、c-fos といった更に下流の因子の活性化を介して IL-2 産生を惹起する。CD155 は、IL-2 受容体・鎖である CD25 の発現も上昇させるので、IL-2 の産生亢進と CD25 の発現上昇によって相乗的に CD4⁺ T 細胞の活性化を促進していると考えられる。

CD155 による NF- κ B 活性化の増強は、CD4⁺ T 細胞の活性化初期の IFN- γ の産生を促進させていると考えら

れる。CD155 の刺激によって活性化初期により多く産生された IFN- γ は、オートクリンまたは近傍の CD⁴⁺ T 細胞に作用し IFN- γ 受容体からの刺激を強め、STAT1、T-bet の発現を促進し、IFN- γ の産生をより増強する。このようなポジティブループが CD155 によって開始されることにより、Th1 分化誘導が促進していると考えられる。

疾患モデルの解析より、CD155 が Th1 疾患モデルである CHS の病態の増悪、Th2 疾患モデルである好酸球性気道炎症の病態の抑制に関与していることが明らかとなった。これは、生体内で CD155 が Th1 免疫応答を促進することによって、拮抗的に Th2 免疫応答が抑制されている結果だと考えられる。すなわち、CD155 は生体内で Th1/Th2 免疫応答を制御する共刺激分子であると言える。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、CD⁴⁺ T 細胞上に発現する CD155 分子の受容体としての機能を明らかにする事を目的とした研究である。CD155 が DNAM-1 のリガンドであるばかりでなく CD⁴⁺ T 細胞上の共刺激分子であること、CD155 分子からのシグナルは、NF- κ B を介すること、IFN- γ の産生を促して Th1 細胞への分化誘導すること、などを明らかにした。さらに、モデルマウスを用いた実験から、CD155 分子が接触性皮膚炎および好酸球性気道炎症の治療標的分子として有用となる可能性を示した。本研究の成果は、アレルギー疾患の新しい治療戦略を開発する上で重要な知見であり、一連の研究成果は国際的にも高く評価されている。

平成 25 年 1 月 9 日、博士（医学）学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。