

# 自己免疫疾患を回避する免疫系のシステムを解明

-健康人に存在する CD4 陽性制御性 T 細胞が自己免疫反応を抑える-

## <概要>

大阪大学免疫学フロンティア研究センターの前田優香博士、西川博嘉特任准教授、坂口志文教授らの研究グループは、CD4 陽性制御性 T 細胞が自己免疫反応(自己免疫疾患)を回避するために自己に反応する CD8 陽性 T 細胞に安定的な免疫不応答状態(アネルギー)を誘導することを明らかにしました。また従来フェノタイプが明らかにされてこなかったアネルギー細胞が持つ特徴的なフェノタイプを明らかにし、健康人の体内に自己に反応する CD8 陽性 T 細胞がアネルギー状態で存在し、自己免疫応答を抑制していることを同定しました(図)。

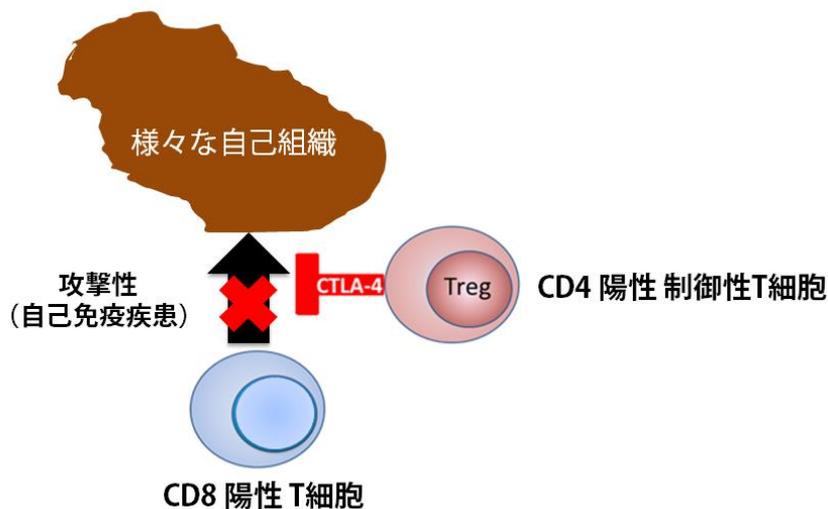


図 制御性 T 細胞がアネルギー状態(=自己への免疫寛容)を保つ

## <研究の背景>

免疫系は、ウイルスなどの外来抗原に対して反応し排除しますが、自己に対しては免疫応答を起こしません(免疫自己寛容)。自己に対して免疫応答を起こさないという免疫系の原則は、胸腺での自己に対して反応する T 細胞の排除(中枢性免疫寛容)と末梢での自己に対する T 細胞に対する免疫不応答性(アネルギー)の誘導(末梢性免疫寛容)によって成り立っています。制御性 T 細胞 (Naturally occurring regulatory T cells)は、自己に反応する T 細胞の活性化を抑制することで自己免疫応答(自己免疫疾患)が起こるのを阻止しています。しかしながら、制御性 T 細胞がどのように自己に反応する T 細胞を安定的に長期間にわたり抑制しているか、またそれらの抑制された細胞は生体内でどのような特徴を持っているのかなど不明な点が多く残されていました。

## ＜研究の成果＞

本研究成果により、制御性 T 細胞が自己に反応する CD8 陽性 T 細胞に免疫不応答(アネルギー)状態を誘導し、長期間にわたる免疫寛容を成立させることが示されました。また自己免疫疾患ではこれらの自己反応性の CD8 陽性 T 細胞のアネルギー状態が破綻していました。よって、制御性 T 細胞を用いて自己に反応する CD8 陽性 T 細胞にアネルギー状態を付与することで自己免疫疾患に対する新たな治療法開発につながると考えられます。加えてアネルギー状態を克服する手法を開発することでがん免疫療法など広範な免疫治療にも応用可能であると考えられます。

## ❖ 用語解説

### アネルギー状態

アネルギー状態とは免疫不応答状態を指します。T 細胞が抗原からの刺激に対して活性化せず反応できない状態です。自己に対する T 細胞が活性化して自己免疫疾患を発症することを防ぐ上で重要な働きをしています。一方、がん免疫においては多くのがん抗原が自己抗原であるためにエフェクター細胞(がん抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞)の不応答は有効ながん治療の妨げになります。今まで、現象としてアネルギー状態の細胞が存在することは *in vitro* で明らかになっていましたが、*in vivo*(生体内)での詳細なフェノタイプや特徴は未だ明らかになっていませんでした。

### 免疫寛容:

抗原分子に対して免疫応答が誘導されない状態。自己抗原に対する免疫寛容が破綻した場合、自己免疫応答を引き起こす。

### 自己反応性 CD8 陽性 T 細胞:

自己抗原に特異的に反応する CD8 陽性 T 細胞。通常ではアネルギー状態と呼ばれる抗原刺激に対して無反応の状態になっています。

### 制御性 T 細胞 (Regulatory T cell :Treg) :

様々な免疫応答を負に制御する T 細胞。とくに自己抗原に対する免疫応答を抑制することで、免疫系の恒常性の維持で重要な働きをしています。

### CTLA-4(Cyto Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4):

T細胞上に発現する免疫抑制性分子。免疫共刺激分子である CD28 と競合することにより過剰な免疫応答を抑制しています。

### CCR7(C-C chemokine receptor type 7):

ケモカインレセプターの一つ。リンパ節へのホーミングに重要なケモカインです。

## ❖ 掲載論文・雑誌

Yuka Maeda, Hiroyoshi Nishikawa, Daisuke Sugiyama, Danbee Ha, Masahide Hamaguchi, Takuro Saito, Megumi Nishioka, James B. Wing, Dennis Adeegbe, Ichiro Katayama and Shimon Sakaguchi

“Detection of self-reactive CD8+ T cells with an anergic phenotype in healthy individuals”

**Science** 2014年12月19日(金)オンライン掲載 (米国東部: 12月18日)

## <詳しい解説>

研究グループは、まず制御性 T 細胞がメラノサイト自己抗原(Melan-A)特異的 CD8 陽性 T 細胞活性化時にどのような影響を与えるかを健康人末梢血単核球(以下 PBMC)を用いて *in vitro* で検討した。健康人ドナー由来の PBMC から CD8 陽性 T 細胞、CD25 強陽性 CD4 陽性制御性 T 細胞および T 細胞除去 PBMC(抗原提示細胞(以下 APC))を分離した。CFSE ラベルした CD8 陽性 T 細胞と自己抗原(Melan-A)を提示させた APC を共培養し、Melan-A 特異的 CD8 陽性 T 細胞を誘導した。制御性 T 細胞を様々な比率で添加したところ、制御性 T 細胞の存在比率に依存して Melan-A 特異的 CD8 陽性 T 細胞誘導率が低下した。さらに重要なことに、誘導された Melan-A 抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞は、細胞分裂が 1 回で停止することを見出した(図 1)。

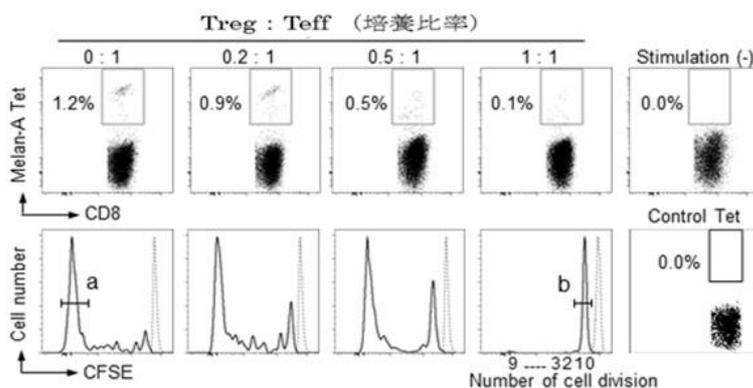
また、制御性 T 細胞により抑制され、細胞分裂が 1 回で停止した細胞群は、制御性 T 細胞非存在下で誘導した活性化 Melan-A 特異的 CD8 陽性 T 細胞に比べて、Melan-A 抗原に対する T 細胞レセプターが low-affinity であった。また2次的抗原刺激に対してサイトカイン産生や細胞増殖を示さず、アネルギー状態であった(図 2)。

次にアネルギー状態の Melan-A 特異的 CD8 陽性 T 細胞の分子発現を網羅的に解析したところ、特徴的なフェノタイプを有していることが明らかになった。特に細胞表面分子発現に着目したところ、ナイーブフェノタイプ(CCR7+CD45RA+)でありながら、免疫抑制分子(CTLA-4+ PD-1+)を発現し、特に CTLA-4+CCR7+により厳密に定義されることが示された(図 3)。

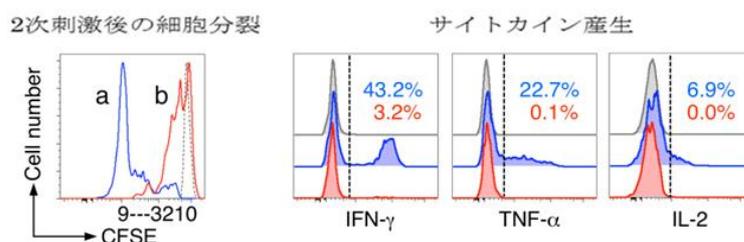
さらに、健康人の末梢血中にも自己抗原に対してアネルギー状態の自己反応性 CD8 陽性 T 細胞が存在するのかを *ex vivo* で検討した。メラノサイト自己抗原 Melan-A に対する反応が過剰に活性化している自己免疫疾患、白斑症の検体を用いることで本メカニズムの免疫自己寛容での重要性を検討した。健康人においては自己反応性 CD8 陽性 T 細胞がアネルギー状態で存在していたが、白斑症患者では CTLA-4+CCR7+ フェノタイプを示す細胞が認められなくなり、アネルギー状態が破綻していることが示された(図 4)。

以上より、制御性 T 細胞は自己抗原特異的 T 細胞の反応を抑制し、特徴的なアネルギー状態に陥らせることで、長期の免疫寛容を誘導していることが明らかになった。またこれらのアネルギー状態の細胞は CTLA-4+ CCR7+により定義されることが明らかとなった。

<図の説明>

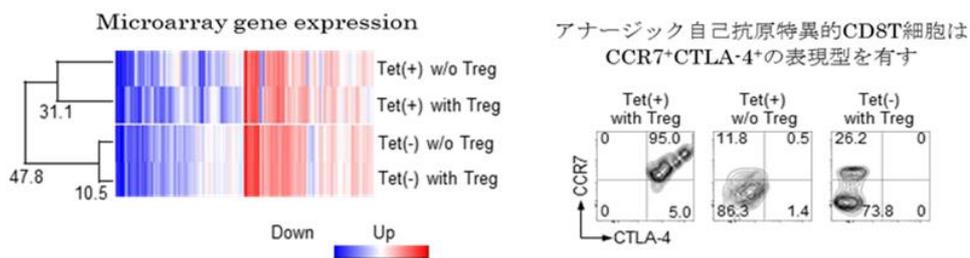


**図 1 Treg 存在下で誘導された自己抗原 Melan-A 特異的 CD8 陽性 T 細胞は細胞分裂を1回で停止する**  
 健康人 PBMC から分離した CD8 陽性 T 細胞 (Teff) に CFSE ラベルし、Treg (CD25high CD4+) を各々の比で混合し、Melan-A 抗原を提示させた APC と共培養し Melan-A 特異的 CD8 陽性 T 細胞を誘導した。Treg 非存在下では Melan-A 特異的 CD8 陽性 T 細胞が効率的に誘導され、細胞分裂を繰り返した(a)。一方、Treg 存在下では Melan-A 特異的 CD8 陽性 T 細胞誘導が低下し、細胞分裂が 1 回で停止する細胞群(b)が認められた。



**図 2 Treg 存在で誘導された Melan-A 特異的 CD8 陽性 T 細胞は low-affinity T 細胞レセプターを持ち、アネルギー状態である**

Treg の存在下で細胞分裂が 1 回で停止した Melan-A 特異的 CD8 陽性 T 細胞(b)は、Melan-A 特異的 CD8 陽性 T 細胞(a)に比較してテトラマー染色強度が低く(low affinity T 細胞レセプターを持つ)、アネルギー状態(低細胞分裂能、低サイトカイン産生能)であり、2 次刺激後もアネルギー状態を維持していた。



**図 3 アネルギー状態の Melan-A 特異的 CD8 陽性 T 細胞は特徴的なフェノタイプ(CCR7+CTLA-4+)を示す**  
 Treg 存在下で誘導された Melan-A 特異的 CD8T 細胞は、Treg 非存在下で誘導された Melan-A 特異的 CD8 陽性 T 細胞とは異なる細胞表面の表現型を示し、特に CCR7/CTLA-4 陽性で定義された。

### ここまでの In Vitro の実験で明らかになったこと

- Treg 存在下で抗原刺激を行うと抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞がアネルギー状態(Low-affinity、サイトカイン産生能低下)になる。

### 今回新たに見出したアネルギー状態の抗原特異的(自己反応性)CD8 陽性 T 細胞の特徴

- アナージック抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞は細胞分裂が 1 回で停止する。
- ナイーブ細胞の特徴である CCR7 が陽性でありながら、免疫抑制分子である CTLA-4 も陽性というユニークなフェノタイプを示す。

### 《Ex vivo での検討》

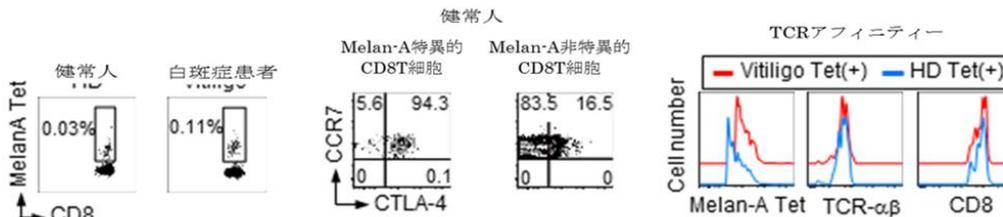


図4 健康人の末梢血において **low-affinity/CTLA-4 陽性 CCR7 陽性の自己反応性 CD8 陽性 T 細胞が存在する**

健康人 PBMC でも自己抗原 Melan-A 特異的な自己反応性 CD8 陽性 T 細胞の存在が確認された。またこの細胞群は in vitro において Treg 存在下で誘導された細胞と同じくアネルギー状態であった。メラノサイトに対する免疫寛容が破綻している白斑症(Vitiligo)患者のサンプルを用いて検討したところ、白斑症では Melan-A 特異的 CD8 陽性 T 細胞は high-affinity T 細胞レセプターを持ち、CTLA-4+CCR7+のアネルギー状態が破綻していた。

### Ex vivo での実験で明らかになったこと

- 健康人末梢血中にも自己抗原に対してアネルギー状態の抗原特異的(自己反応性)CD8 陽性 T 細胞が存在する。
- 自己免疫疾患である白斑症ではこの自己反応性 CD8 陽性 T 細胞のアネルギー状態が破綻していた。

### 以上の検討で明らかになったこと

- Treg によって自己反応性 CD8 陽性 T 細胞はアネルギー状態(CCR7 陽性 CTLA-4 陽性)に維持されていることが自己免疫疾患を防ぐ上で重要である。

### 今後の期待

本研究により、アネルギー状態の細胞が CCR7+CTLA-4+により定義されていることが示され、体内動態などをこれらのマーカーを用いて解析可能となり、免疫寛容研究が加速することが期待される。また、末梢性自己寛容での制御性 T 細胞の重要性が明確になり、これまで長年にわたり不明であった末梢性免疫寛容機構が明確に定義されていくと考えられる。