

平成 21 年 4 月 6 日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2008
課題番号：19591243
研究課題名（和文） ダブルネガティブ調節性T細胞におけるCD95細胞死システムの意義
研究課題名（英文） Role of CD95-induced apoptotic system in double negative regulatory T cells
研究代表者 笠原 善仁(KASAHARA YOSHIHITO) 金沢大学・保健学系・教授 研究者番号：30204366

## 研究成果の概要：

正常ヒトダブルネガティブ(DN)T細胞は自己免疫抑制調節性機能を持つが、自己免疫性リンパ球増殖症候群（Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome: ALPS）において増加するDN T細胞ではCD95/CD95L細胞死誘導欠損により調節性T細胞(Treg)機能が低下し、自己免疫病態が拡大する。DNT細胞のTreg細胞としての特徴を正常およびALPS患者において比較解析した。

ALPSのDNT細胞の細胞表面発現はCD7、CD62L、CD45RO発現が低下、CD4+Treg細胞と同様にIL-7R陰性で、CD57、CD38、CD95、HLA-DR、CD45RO陽性であった。一方、CD4+Treg細胞の特異的転写因子FoxP3蛋白発現は認められなかった。DNT細胞の培養後細胞死比率はALPS 83%、健常人 30%と有意にALPSにおいて有意に増加していた。DNT細胞のTCRレパートワ分布解析ではALPS14症例中5例(35.7%)、正常対照40例中3例(7.5%)にTCRVβの1種類以上のあきらかな増加を認めた。CDR3 spectrum解析ではALPS11例(78.5%)、健常人全例で3種類以上のVβにoligo-clonal patternを認めた。また、ALPSの症状を有するがCD95誘導性細胞死が正常であったALPS III型と考えられていた症例4例のうち1例にモザイク型CD95変異が存在することを証明した。変異比率はDNT細胞では100%、他のリンパ球分画でも1-10%存在し、繊維芽細胞や口腔粘膜上皮細胞にも1%存在し、モザイク型の変異を初めて見出した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児免疫・アレルギー・膠原病類、細胞死、CD95、調節性T細胞

## 1. 研究開始当初の背景

CD95(Fas)細胞死誘導システムは、末梢リンパ組織にて活性化された過剰な免疫担当細胞の排除、炎症反応の終演や免疫制御に重要と考えられ、CD95、CD95リガンド(CD95L)、caspase-10の遺伝子変異によるそ

の機能的欠失は、肝脾腫、リンパ節腫大、自己免疫性血球減少、高γグロブリン血症等を示す自己免疫性リンパ球増殖症候群

(Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome: ALPS)の発症に至る。TCRαβ陽性CD4陰性CD8陰性(double negative、ダブ

ルネガティブ;DN)T細胞は正常ヒト末梢血リンパ球の1%以下と非常に少ない細胞集団であるが、ALPSにおいて3-40%と著明に増加する。ALPSのDN T細胞の特徴としてIL-10,TGF-βを強く産生しB細胞を介した自己免疫性疾患の発症への関与が指摘され、表面抗原発現からeffector/killer細胞が最終的に分化した細胞である可能性が示唆される。

正常ヒトDN T細胞の機能的意義は不明な点が多いが、近年、調節性T(Treg)細胞機能を有することが見出された。代表的Treg細胞であるCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞の解析から、Treg細胞の自己免疫疾患の発症や腫瘍免疫、自己免疫寛容への関連が示唆される。CD4<sup>+</sup>Treg細胞の調節機能の機序は、増殖性サイトカイン(IL-2)転写抑制、抑制性サイトカイン(IL-10, IL-4,TGF-β)産生に加え、perforinシステムを介した抑制機構によるとされる。一方、DN Treg細胞の調節機能の機序はヒト抗原特異的T細胞の制御やマウスアロ抗原免疫応答の制御が報告され、活性化T細胞のCD95系を介した細胞死誘導機序が主体であることが示される。これらのことからALPSにおける自己免疫発症機序にDN T細胞のTreg機能低下とそれに伴うDN T細胞の増殖拡大が関与する可能性が示唆される。

ALPSはgerm line遺伝子変異により発症するが、DN T細胞におけるCD95遺伝子somatic mutation(体細胞性変異)が見出され、ALPS類似の一部の自己免疫性疾患や原発性免疫不全症候群におけるDN T細胞増加が報告されることから、これらの疾患の病態へのDN Treg細胞の機能異常と同時にALPS関連遺伝子の体細胞性変異の存在が疑われる。

## 2. 研究の目的

正常ヒト DN T 細胞は自己免疫抑制調節機能を持つが、ALPS の DN T 細胞ではCD95/CD95L システムによる細胞死誘導欠損により Treg 機能が低下し、自己免疫病態が拡大すると推定される。しかし、正常 DN T 細胞と CD95 誘導性細胞死の機能しないALPS の DN T 細胞の詳細な Treg 機能の相違、細胞起原やその病態への関与については不明な点が多い。初年度は、調節性T細胞機能、T細胞レパートワ分布解析、TREC解析を中心に正常 DN Treg 細胞と ALPS において増加する DN T 細胞とで比較検討することで、CD95/CD95L システムの意義を明らかとすることを目的とする。次年度は、CD95 シグナル分子の germ line 変異を持たない自己免疫性疾患における DN Treg 機能および CD95 シグナル分子体細胞性変異の解析を中心に行う。これらのことから生体内における免疫調節機構、特に DN Treg 細胞の調節機構における CD95 誘導性細胞死システムの機能的意義と自己免疫性疾患の病態における CD95 システムの調節機構への関与を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

1) 調節性T細胞機能の解析;現在まで知られている Treg 機能につき正常およびALPS由来CD4<sup>+</sup>Treg, DN T細胞も用いて比較検討する。a) auto, allo CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T細胞の反応(細胞増殖、サイトカイン産生)に対する抑制機能、b)抗原特異的細胞傷害性機能の抑制、c) effector 細胞の細胞死誘導機能、d) DN T細胞自体の細胞死、e) 抗 CD3 抗体+抗 CD28 抗体刺激による細胞反応の相違、f) サイトカイン産生の相違、g) DN T細胞におけるFoxp3、細胞表面抗原発現解析について、正常対象、遺伝子診断済みのALPS患者末梢血よりCD4<sup>+</sup>Treg細胞、DN T細胞を分離し、比較検討する。

## 2) T細胞レパートワ解析

a) 正常およびALPSのDN T細胞における各TCRVβ陽性細胞比率を20種類の抗TCRVβ抗体による3-colorフローサイトメトリー法により各TCRVβ鎖陽性細胞絶対数を検討する。さらにHLA-DR、CD57,CD38, CD95, CD45RA, CD7, CD62L, CD45RO, CCR7などの抗原発現を比較検討する。同時にCD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> single positive (SP T)細胞について同様の解析を加える。

b) 抗原多様性を有するnaive T細胞では反応抗原特異性を決定するTCRVβ鎖のcomplimentary determined region 3 (CDR3)領域は多様性に富み、CDR3サイズ分布を解析すると一様にガウス分布を示す。一方、抗原特異的クローンが存在するeffector/memory T細胞集団においてCDR3は多様性を失い、限定したレパートワのみとなる。正常およびALPS患者由来のDN T細胞から抽出したmRNAを用い25種TCRVβ鎖CDR3領域をPCR法で増幅後、そのサイズ分布を解析し、多様性を解析する。

## 3) ALPS 以外の自己免疫性疾患におけるDN T細胞の解析

ALPS 以外の自己免疫性疾患、原発性免疫不全症候群においてDN T細胞の軽度増加する症例が報告され、これら疾患におけるDN T細胞のTreg機能の特徴を正常あるいはALPS DN T細胞と比較検討するとともに、DN T細胞のCD95シグナル分子遺伝子の体細胞性変異の存在の確認を行う。

## 4. 研究成果

ALPS の DNT 細胞の細胞表面発現は CD7、CD62L、CD45RO 発現が低下、CD4<sup>+</sup>Treg 細胞と同様に IL-7R 陰性で、CD57、CD38、CD95、HLA-DR、CD45RO 陽性であった。一方、CD4<sup>+</sup>Treg 細胞の特異的転写因子 FoxP3 蛋白発現は認められなかった。DN T細胞の培養後細胞死比率は ALPS 83%、健康人 30%と有意にALPSにおいて有意に増加していた。DNT細胞のTCRレパートワ分布解析ではALPS14症例中5例(35.7%)、正常対照40例中3例(75%)にTCRVβの1種類

以上のあきらかな増加を認めた。CDR3 spectrum 解析では ALPS11 例 (78.5%)、健康人全例で 3 種類以上の V $\beta$  に oligo-clonal pattern を認めた。また、ALPS の症状を有するが CD95 誘導性細胞死が正常であった ALPS III 型と考えられていた症例 4 例のうち 1 例にモザイク型 CD95 変異が存在することを証明した。変異比率は DNT 細胞では 100%、他のリンパ球ぶ分画でも 1-10% 存在し、繊維芽細胞や口腔粘膜上皮細胞にも 1% 存在し、モザイク型の変異を初めて見出した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

1. T. Wada, M. Yasui, T. Toma, Y. Nakayama, M. Nishida, M. Shimizu, M. Okajima, Y. Kasahara, S. Koizumi, M. Inoue, K. Kawa, A. Yachie. Detection of T lymphocytes with a second-site mutation in skin lesions of atypical X-linked severe combined immunodeficiency mimicking Omenn syndrome. *Blood*, 112;1872-1875, 2008. (査読有)
2. 笠原善仁. メモリーCD8+T細胞の分化と CD244(2B4). *臨床免疫・アレルギー科*. 49(5); 527-532, 2008. (査読無)
3. 笠原善仁. 自己免疫リンパ増殖症候群. *小児内科*. 40巻, 1327-1330. 2008. (査読無)
4. 荒井美奈子, 藤本学, 竹原和彦, 笠原善仁. TNF- $\alpha$  阻害薬投与中に出現した膿疱性皮膚疹の1例. *臨床皮膚科*, 62(6): 374-377, 2008. (査読無)
5. 笠原善仁, 和田泰三, 東馬智子, 徳山美香, 谷内江昭宏, 金兼弘和, 宮脇利男. 自己免疫性リンパ球増殖症候群における CD95 モザイシズム. 厚生労働省血液系疾患調査研究班 原発性免疫不全症候群分科会, 平成19年度総括・分担研究報告書, 75-80. (査読無)
6. 和田泰三, 東馬智子, 笠原善仁, 谷内江昭宏. Omenn症候群様症状を呈した非典型的X連鎖重症複合免疫不全症にみられた遺伝子変異のreversion. 厚生労働省血液系疾患調査研究班 原発性免疫不全症候群分科会, 平成20年度総括・分担研究報告書, 130-133. (査読無)
7. 小泉晶一, 笠原善仁, 太田和秀, 犀川太, 太田邦雄, 新井田要. ヘムオキシゲナーゼ1欠損と全身性慢性炎症に対する防御機構の破綻. 平成17-19年度科学研究費補助金(基盤研究B)研究成果報告書. 2008年(平成20年)4月. (査読無)
8. 平子陽子, 横澤正人, 小原敏生, 長岡由修, 渡辺祥二郎, 浅沼秀臣, 我妻嘉孝, 鈴木信寛, 畠山直樹, 山本雅樹, 笠原善仁. 診断に難渋したランゲルハンス細胞組織球症の一例. *苫小牧市立病院医誌*18(1): 11-16, 2007. (査読無)
9. Y. Tone, T. Wada, F. Shibata, T. Toma, Y. Hashida, Y. Kasahara, S. Koizumi, A. Yachie. Somatic revertant mosaicism in a patient with leukocyte adhesion deficiency type 1. *Blood*. 109(3):1182-1184, 2007. (査読有)
10. K. Ohta, M. Shimizu, T. Yokoyama, K. Ohta, A. Nakai, A. Seno, Y. Kasahara, A. Yachie, M. Fujieda S. Koizumi. Analysis of MPO-ANCA subtypes in a patient with propylthiouracil-induced vasculitis with multiple complications. *Clin Nephrology*, 68(5), 315-321, 2007. (査読有)
11. F. Shibata, T. Toma, T. Wada, M. Inoue, Y. Tone, K. Ohta, Y. Kasahara, Sano F, Kimura M, Ikeno M, S. Koizumi, A. Yachie. Skin infiltration of CD56<sup>(bright)</sup> CD16<sup>(-)</sup> natural killer cells in a case of X-SCID with Omenn syndrome-like manifestations. *Eur J Haematol*. 79(1):81-85, 2007. (査読有)
12. H. Okamoto, C. Arii, F. Shibata, T. Toma, T. Wada, M. Inoue, Y. Tone, Y. Kasahara, S. Koizumi, Y. Kamachi, Y. Ishida, J. Inagaki, M. Kato, T. Morio, A. Yachie. Clonotypic analysis of T cell reconstitution after haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in patients with severe combined immunodeficiency. *Clin Exp Immunol*. 148(3):450-460, 2007. (査読有)

[学会発表] (計 24 件)

1. 慢性活動性 EB ウイルス感染症男児例における蚊刺後の水疱内細胞成分の解析. 和田泰三, 笠原善仁, 他. 第 16 回北陸ウイルス感染症研究会. (2008. 9. 13 金沢)
2. Omenn 症候群ならびに類似疾患の遺伝子異常と特徴的病態の発症機構. 谷内江昭宏, 笠原善仁, 他. 第 20 回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2008. 6. 14 東京)
3. 種痘様水疱症で気付かれた慢性活動性 EB ウイルス感染症 (CAEBV) の 4 歳女児例. 梅暁子, 笠原善仁, 他. 第 293 回日本小児科学会北陸地方会 (2008. 6. 8 福井)
4. 急性 EBV 感染を契機に発症した全身型若年性特発性関節炎の 1 例. 横山忠史, 笠原善仁, 他. 第 111 回日本小児科学会学術集会 (2008. 4. 26 東京)
5. Omenn 症候群様症状を呈した非典型的 X-SCID にみられた遺伝子変異の復帰. 和田泰三, 笠原善仁, 他. 第 111 回日本小児科学会学術集会 (2008. 4. 25 東京)
6. 溶血性連鎖球菌感染による増悪に伴い、TCR V $\beta$ 3+CD57+ CD56+ T細胞の増殖を認めた cutaneous PN の一例. 馬瀬新太郎, 笠原善仁, 他. 第 39 回小児感染症学会学術集会 (2007. 11. 10 横浜)
7. 小児期に発症し、数十年の経過の後全身性アミロイドーシスを合併した家族性地中海熱 (familial mediterranean fever: FMF) 成人男性 2 症例. 谷内江昭宏, 笠原善仁, 他. 第 39 回小児感染症学会学術集

- 会(2007. 11. 10 横浜)
8. 「麻疹全数迅速把握事業」から判明した2007年石川県麻疹流行の現状. 笠原善仁, 他. 第39回小児感染症学会学術集会(2007. 11. 10 横浜)
  9. 小児科、耳鼻咽喉科医師における小児呼吸器感染症および小児急性中耳炎両診療ガイドラインの周知・使用の現況. 笠原善仁, 他. 第39回小児感染症学会学術集会(2007. 11. 10 横浜)
  10. TおよびNK細胞が出現しOmenn症候群様症状を呈した非典型的X連鎖重症複合免疫不全症の1例. 和田泰三, 笠原善仁, 他. 第35回日本臨床免疫学会総会(2007. 10. 20 吹田)
  11. 高サイトカイン血症における radar chart を用いた炎症性サイトカインプロファイルの解析と病態評価. 谷内江昭宏, 笠原善仁, 他. 第35回日本臨床免疫学会総会(2007. 10. 20 吹田)
  12. 自己免疫性リンパ増殖症候群(ALPS)におけるDNT細胞の表面抗原発現パターンとTCR repertoires の多様性の検討. 徳山美香, 笠原善仁, 他. 第69回日本血液学会総会・第49回日本臨床血液学会総会(2007. 10. 13 横浜)
  13. EBウイルス血液関連疾患におけるEBV感染細胞とTCRレパートワ. 笠原善仁, 他. 第69回日本血液学会総会・第49回日本臨床血液学会総会(2007. 10. 13 横浜)
  14. EBV感染NK細胞におけるサイトカイン、ケモカイン産生パターンの特徴. 西田巳香, 笠原善仁, 他. 第69回日本血液学会総会・第49回日本臨床血液学会総会(2007. 10. 12 横浜)
  15. Heme oxygenase (HO)-1 and hematopoiesis: a lesson from the first human case of HO-1 deficiency. Koizumi S, Kasahara Y, et al. 36th Annual Scientific Meeting of the ISEH-Society for Hematology and Stem Cells. (2007. 9. 28-30 Hamburg)
  16. Prediction of relapse frequency and steroid dependency in pediatric minimal change nephrotic syndrome by T-cell receptor diversity analysis. Ohta K, Kasahara Y, et al. 14th Congress of the International Pediatric Nephrology Association(2007. 8. 31-9. 4 Budapest)
  17. 小児期に発症し、数十年の経過の後、全身性アミロイドーシスを合併した家族性地中海熱成人男性2症例. 石崎顕子, 笠原善仁, 他. 第43回中部日本小児科学会(2007. 9. 2 名古屋)
  18. インスリン持続皮下注療法(CSII)導入1型糖尿病患者の臨床的特徴. 笠原善仁, 他. 第43回中部日本小児科学会(2007. 9. 2 名古屋)
  19. 自己免疫性リンパ球増殖症候群(ALPS) III型におけるCD95モザイシズム. 笠原善仁, 他. 厚生労働省難治性疾患克服研究事業原発性免疫不全症候群に関する調査研究班平成19年度第1回班会議(2007. 6. 22

- 東京)
20. 炎症性疾患におけるサイトカインプロファイルの解析と病態評価. 谷内江昭宏, 笠原善仁, 他. 第19回日本アレルギー学会春季臨床大会(2007. 6. 10 横浜)
  21. EBV-HLHにおけるEBV感染CD8+ T細胞のクローン性増殖とCD5発現低下の意義. 谷内江昭宏, 笠原善仁, 他. 第17回EBウイルス感染症研究会(2007. 5. 26 東京)
  22. EBV関連疾患におけるTCRレパートワの相違. 笠原善仁, 他. 第17回EBウイルス感染症研究会(2007. 5. 26 東京)
  23. リンパ球のみにCD95(Fas)体細胞性遺伝子変異を有する自己免疫性リンパ増殖症候群. 徳山美香, 笠原善仁, 他. 第110回日本小児科学会学術集会(2007. 4. 21 京都)
  24. 自己免疫性甲状腺疾患におけるT cell receptor (TCR)  $\beta$ 鎖分子構造多様性の検討. 岡島道子, 笠原善仁, 他. 第110回日本小児科学会学術集会(2007. 4. 21 京都)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

笠原 善仁 (KASAHARA YOSHIHITO)

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号：30204366

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし