

平成23年 3月 31日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790535

研究課題名 (和文) 効率的制御性 T 細胞培養法の確立

研究課題名 (英文) Establishment of the effective cell culture method for regulatory T cells.

研究代表者

柴倉 美砂子 (SHIBAKURA MISAKO)

岡山大学・大学院保健学研究科・准教授

研究者番号：30314694

研究成果の概要 (和文)：

制御性 T 細胞の効率的培養方法の確立を試みた。セレクトイン/セレクトインリガンドの相互作用が、制御性 T 細胞の細胞増殖や機能に果たす役割を明らかにするために、セレクトイン^{-/-}マウスや PSGL-1^{-/-}マウスを用いて制御性 T 細胞増殖能や機能を評価した。P-セレクトイン^{-/-}マウス、PSGL-1^{-/-}マウスは、野生型に比べて制御性 T 細胞増殖率が高い傾向があった。制御性 T 細胞による *in vitro* suppression assay を行ったところ、PSGL-1^{-/-}マウスにおいて野生型 T 細胞の増殖を抑制する傾向が見られた。

研究成果の概要 (英文)：

I tried the establishment of the effective cell culture method of regulatory T cells. To clarify the role of selectins / selectin-ligands in the cell proliferation and the function of Treg cells, we examined the cell proliferation rate and the function of Treg cells, using P-selectin ^{-/-} mice and PSGL-1 ^{-/-} mice. The growth rate of P-selectin ^{-/-} Treg cells and PSGL-1 ^{-/-} Treg cells were high in comparison with the wild-type Treg cells. PSGL-1 ^{-/-} Treg cells could inhibit wild-type T cell proliferation in *in-vitro* suppression assay.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			0
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：血液検査学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：制御性 T 細胞・培養方法・P-セレクトイン・PSGL-1

1. 研究開始当初の背景

同種骨髄移植は、白血病等の難治性造血器

悪性腫瘍に対する治癒を望める治療法として、世界中で広く行われている。移植後3ヶ月以内に生じる急性GVHDは主に皮膚、腸や肝臓がドナーTリンパ球により傷害される状態であり、強力な免疫抑制療法がその治療に用いられるが、なかにはそれらが奏効せず、白血病などの原疾患は押さえ込めても、この副作用によって患者が命をおとす場合も少なくない。この医療現場での重大な問題についての機序の理解はまだ浅いものであり、従来のようなリンパ球の増殖機構やサイトカイン産生のみをに向けた研究では、その到達点に限界があると思われる。

マウス骨髄移植モデルにおいて制御性T細胞(Treg)による急性GVHDの抑制が報告され(J Exp Med. 2002;196: 389-99.)、TregによるGVHD制御法開発のため、in vitroにおけるTreg培養の研究が行われている(Blood, 2006, 108, 4260-67.)。ラパマイシンは免疫抑制剤で骨髄移植後の免疫抑制剤として用いられており、近年ラパマイシンがTregの増殖を誘導(J Immunol. 2006, 177, 8338-47.)するという報告がなされたが、その機序についての報告はほとんど無い(J Immunol, 2008, 180, 5794-98.)。

私は、P-セレクチンノックアウトマウスの脾細胞を用いたマウス骨髄移植の急性GVHDモデルにおいて、有意に生存率が増加することを確認した。TregにはP-セレクチンが発現しており、P-セレクチンノックアウトマウスでは野生型の1.5倍のTregが存在することが報告されている(J Immunol. 2002, 169, 4712-6)。

私は、このマウス急性GVHD骨髄移植モデルにおける、P-セレクチンノックアウトマウス脾細胞移植による生存率増加は、Treg数またはTreg機能の違いによるのではないかと考えた。ラパマイシンのターゲットであるmTORは、P-セレクチンのカウンター

レセプターであるPSGL-1を介してシグナルを伝達している(EMBO J. 2007, 26, 505-515.)。PSGL-1からのシグナルはT細胞にapoptosisを誘導する(Blood. 2004, 104, 3233-42.)。P-セレクチンによるPSGL-1からのシグナルが無い場合、ラパマイシンによるmTOR阻害と同じ作用が、P-セレクチンノックアウトマウス内で生じている可能性がある。申請者は、P-セレクチンノックアウトマウスのTregにおいては、P-セレクチン/PSGL-1の細胞間相互作用が欠落することによってTregのapoptosisが抑制され、さらに分化誘導が促進されるのではないかと考えている。骨髄移植モデルの生存率増加から推測すると、P-セレクチン/PSGL-1からのシグナルの欠如によるTreg機能への影響は大きいと考えられる。

私は、これまで単に細胞接着のワンステップとして考えられていた、P-セレクチン/PSGL-1経路のシグナル伝達に着目した。

Tregの増殖や機能にセレクチン/セレクチンリガンドが重要な役割を果たしていることが証明されれば、細胞接着分子をコントロールすることによりTregをより効率かつ選択的に増殖させることができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

細胞接着分子であるP-セレクチンは、Tregに発現しP-セレクチンノックアウトマウスでは、脾臓Treg数が野生型に比べて多いと報告されており、セレクチンの発現がTregの分化・増殖に影響を与えている可能性がある。Tregの分化・成熟にセレクチン/セレクチンリガンドが重要な役割を果たしていることが証明されれば、細胞接着分子をコントロールすることによりTregをより効率かつ選択的に増殖させることができると考えた。そこで、Tregの分

化・成熟機序におけるセレクトイン/セレクトインリガンドを明らかにし、Tregの効率的な培養方法を確立するために、まず本研究では、P-セレクトインノックアウトマウスや、そのカウンターレセプターであるPSGL-1ノックアウトマウスのTregを分離し、その細胞増殖能、Treg機能を評価した。

3. 研究の方法

実験動物：C57BL/6Jマウス(野生型)、P-セレクトインノックアウトマウス、PSGL-1ノックアウトマウスを用いた。

脾臓におけるT細胞分布：それぞれのマウスの脾臓リンパ球構成をFACSにて調べた。

Treg培養：Dynabeads FlowComp Mouse CD4+ CD25+ Treg Cells分離キットを用いて、Tregを分離した。得られた、CD4+ CD25+ T細胞は、Tregに一致するとみなし、フローサイトメトリーにて、CD3+ CD4+ CD25+ 細胞集団の回収率を測定した。得られたTregを 1×10^6 個/mlになるように、RPMI-1640 10%FBSに浮遊させ、Dynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28とIL-2を2000 U/mlになるように添加して、培養した。3日目と5日目、7日目に細胞数を数え、3日目と5日目には細胞数が 1×10^6 /mlになるように細胞を希釈し、再びマイクロビーズとIL-2を新たに添加し培養を続けた。これらの細胞数から増殖曲線を作成した。5日目と7日目には、FoxP3陽性細胞をFACSで確認した。

Treg機能の評価 (in-vitro suppression assay)：分離したTregの野生型マウスCD4+ T細胞の増殖抑制能をCFSE Cell Proliferation Kit (Molecular Probes)にて調べた。

4. 研究成果

脾臓T細胞分布：CD4とCD8陽性細胞数に有意差はなかったが、CD4/CD8比では、P-セレクトインノックアウトマウスが有意に高かった(図1)。過去の報告(J Immunol. 2002, 169,

4712-6)とは異なり、P-セレクトインノックアウトマウスにおいて、Treg細胞数が多い傾向が得られたが、n=6では有意差は得られなかった(図2)。

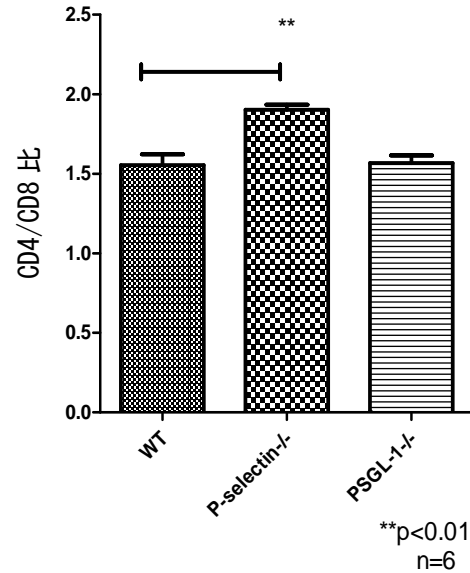


図1

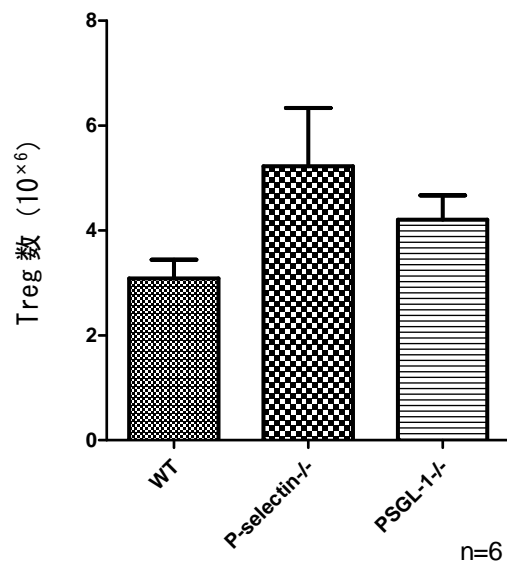


図2

Treg増殖率とFoxP3陽性率：分離したTregを抗CD3抗体、抗CD28抗体をコーティングしたDynabeadsを用いて、IL-2の存在下で刺激培養した。3日目、5日目、7日目に細胞数を数えた。有意差は得られなかったが、P-セレクトインノ

ックアウトマウス、PSGL-1ノックアウトマウスでは、野生型に比べ増殖率が高い傾向がみられた(図3)。培養5日目、7日目のFoxP3陽性細胞率を比較した。培養開始時のCD4+CD25+ T細胞の純度は90%以上であり、細胞数も同じであるが、培養5日目ではP-セレクチンノックアウトマウス由来Treg細胞の培養において、FoxP3陽性細胞率が高い傾向がみられた(図4)。FoxP3陽性細胞率は培養日数が増えると減少していく傾向がみられた。

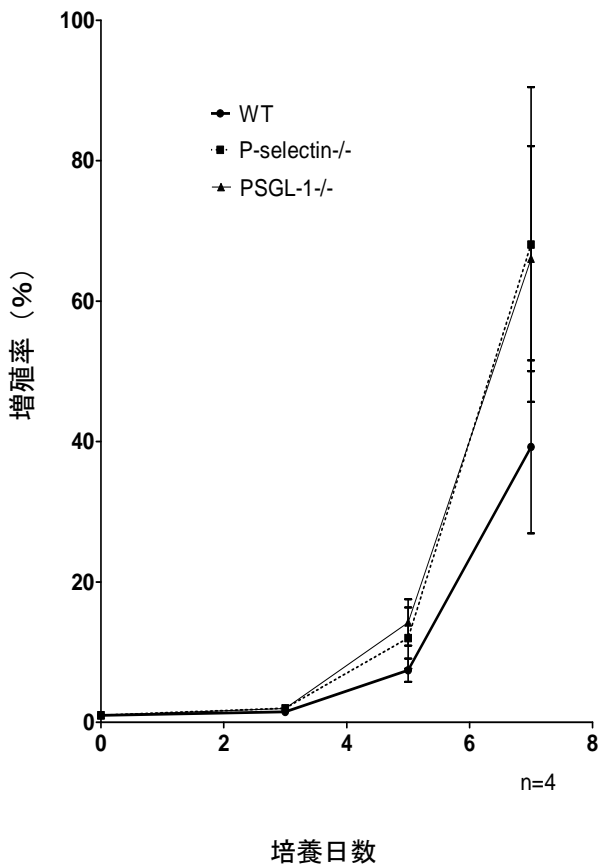


図3

In Vitro Suppression Assay (抑制試験) : 各マウスから分離したTregと野生型マウスCD4陽性T細胞の増殖抑制率を調べた(図5)。抑制率はPSGL-1-/-マウス由来Tregで高い傾向がみられたが、有意差は得られていない。

今回の研究結果から、①P-セレクチンノックアウトマウス脾臓Tregが多い傾向にある、

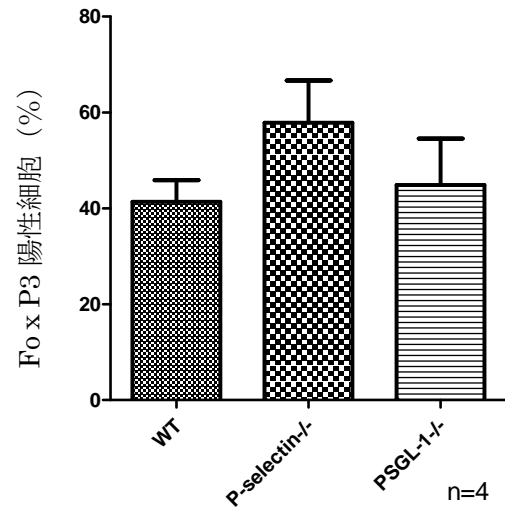


図4

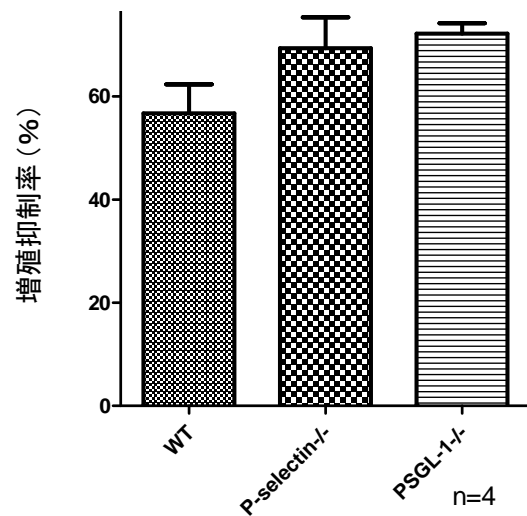


図5

②P-セレクチンノックアウトマウス、PSGL-1ノックアウトマウス由来のTregは野生型に比べて増殖率が高い傾向がある、③分離したTregを培養していくと、培養日数が経過するにつれてFoxP3陽性細胞率は低下した、④PSGL-1ノックアウトマウス由来のTreg機能は野生型よりも高い傾向がある、という事が判明した。

これらの結果は、P-セレクチン/PSGL-1シグナルがTregの増殖能や機能に影響を与えている事を示唆している。また効率的にTregを培養するには、短期間で増殖させる事が重要である。今後は、n数を増やし同様の実験を繰り返す必要がある。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴倉 美砂子 (SHIBAKURA MISAKO)
岡山大学・大学院保健学研究科・准教授
研究者番号：30314694