

博士論文番号:0381001

老齡時に出現する免疫抑制性 CD4T 細胞の機能解析

飯田 隆治

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 動物遺伝子機能学講座

(川市 正史 教授)

## 目次

1. はじめに	3
2. 背景	4
2-1 CD4 <sup>+</sup> T 細胞亜集団の除去による自己免疫疾患の誘導	4
2-2 <i>In vitro</i> における免疫抑制性 CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T 細胞の特性	5
2-3 CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T 細胞の発生・分化の制御	5
2-4 免疫抑制性 CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> T 細胞	6
2-5 老齢時における CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> T 細胞の免疫抑制能	7
2-6 CD45 分子の構造と機能	8
3. 材料と方法	10
3-1 動物	10
3-2 試薬	10
3-3 単クローン抗体の作製	10
3-4 CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> T 細胞の調製	10
3-5 CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T 細胞の調製	11
3-6 細胞の培養	11
3-7 免疫沈降法と質量分析	11
3-8 遺伝子導入細胞の作製	11
3-9 リアルタイム PCR	12
3-10 サイトカインの検出	12
3-11 Western Blots	12
3-12 CD45-Ig 融合タンパク質の作製	13
4. 結果	14
4-1 59.32 抗体および I.11 抗体は老齢 CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> T 細胞の抑制機能を阻害する	14
4-2 両抗体は CD45 分子の細胞外領域のうちすべてのアイソフォームに共通する領域を認識している	14
4-3 抗 CD45 抗体の中で 59.32 抗体および I.11 抗体のみが、老齢 CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> T 細胞の抑制機能を解除する	15
4-4 老齢 CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> T 細胞上の CD45 分子を架橋することが、その抑制機能解除に	

	必要である	17
4-5	59.32 抗体および I.11 抗体は若齢および老齢 CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T 細胞に対して副刺激能を有する	18
4-6	59.32 抗体は IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ 産生を増強する	19
4-7	59.32 抗体と I.11 抗体は CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T 細胞の抑制機能をも解除する	19
4-8	59.32 抗体および I.11 抗体は Lck, JAK ホスファターゼとしての CD45 分子の機能を増強する	20
4-9	59.32 抗体は FoxP3 の発現に影響を与えない	21
4-10	CD45 分子と IgG の融合タンパク質は CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T 細胞の抑制機能を解除しない	22
4-11	59.32 抗体および I.11 抗体の <i>in vivo</i> での作用	22
5.	考察	23
5-1	59.32 抗体および I.11 抗体による CD45 分子の制御	23
5-2	抑制機能解除と 59.32 抗体の副刺激能	24
5-3	59.32 抗体および I.11 抗体が認識する CD45 のアイソフォームと抑制機能解除	25
5-4	TCR シグナル強度と副刺激作用	26
5-5	59.32 抗体および I.11 抗体と JAK-STAT 経路	26
5-6	IL-2 mRNA の発現調節に関わる分子機構	27
5-7	59.32 抗体および I.11 抗体の <i>In vivo</i> における検討	27
6.	参考文献	30
7.	図	39
8.	謝辞	69

## 1.はじめに

生体防御を担う免疫系は、免疫反応を促進する細胞とその活性化を抑制する細胞とに大きく分けられる。後者の免疫抑制性細胞の存在は多くの実験系において示唆されていたが、この細胞群の実体は長らく不明であった(1)。近年、恒常的に CD25 (インターロイキン-2 受容体  $\alpha$ 鎖) を発現する CD4<sup>+</sup>T 細胞 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞) が自己免疫病の発症を抑制していること (2)、更に *in vitro* (試験管内) において他の T 細胞 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞, CD8<sup>+</sup>T 細胞) の活性化を抑制することなどが示され(3, 4)、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞が免疫抑制性細胞として機能していることが明らかとなった(図 1, 図 2)。その後の研究により、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞は末梢における免疫自己寛容の維持(自己に対する免疫応答の抑制)に関与するのみならず、腫瘍免疫、感染免疫、移植免疫などの様々な免疫応答にも関与していることが示されている(2, 5, 6)。このように *in vivo* における CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の重要性は明らかになってきているものの、抑制機構の分子基盤については不明な点が多く残されたままである。そこで、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞と同様な抑制機能を有する老齢時の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を用いて(7, 8)、老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞および CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の活性化、増殖、機能制御に関わる細胞表面抗原分子の単離を試みた。本研究では、*in vitro* において老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞依存的な増殖抑制を阻害する単クローン抗体の樹立を経て、抗体の認識分子の同定に成功した。その結果、受容体型プロテインチロシンホスファターゼファミリーに属する CD45 (白血球共通抗原 (LCA), Ly-5 としても知られる) が老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の抑制機能制御に関与していることを明らかにした。

## 2.背景

### 2-1 CD4T 細胞亜集団除去による自己免疫疾患の誘導

病原微生物やウイルスなどの侵入から生体を守る免疫系は、自己および非自己を識別し、非自己のみを排除することを最大の特徴としている。このようなシステムは、胸腺内での成熟過程を経て自己には反応しない T 細胞のみが選択的に発生することにより成立している。胸腺内での T 細胞の発生は、T 細胞上の T 細胞受容体(T cell receptor ; TCR)と胸腺上皮細胞あるいは抗原提示細胞の主要組織適合抗原複合体(major histocompatibility complex ; MHC)上に提示された自己抗原とのアフィニティによりコントロールされている。たとえば、MHC 上に提示された自己抗原に強いアフィニティを示す TCR を発現する T 細胞すなわち、自己の細胞を攻撃するような T 細胞は胸腺内で誘導されるアポトーシスにより排除される(ネガティブ選択)。また、MHC 上に提示された自己抗原に全く反応しない T 細胞は生存あるいは増殖シグナルを受け取れず、この細胞もアポトーシスで死滅する。一方、MHC 上に提示された自己抗原に中間的なアフィニティを示す T 細胞には適切な活性化シグナルが入り、そのような T 細胞はその後の分化を遂げ、胸腺を離れることが許される(ポジティブ選択)。この T 細胞が末梢において MHC 上の非自己抗原と強く反応した場合、その抗原を排除するような免疫応答を開始する。しかしながら、胸腺内で自己反応性 T 細胞を排除するメカニズムは完全ではなく、上記のシステムを逃れた一部の自己反応性 T 細胞が末梢に存在していることが示されている。近年、このような自己反応性 T 細胞を末梢にて抑制するメカニズムも存在し、自己反応性 T 細胞の活性化を抑制する細胞が存在していることが明らかになってきた(1)。

1969年に、Nishizuka & Sakakura は生後 2~4 日目に胸腺を摘出したメスマウスは不妊になり、卵巣炎を発病するようになることを観察した(9)。そのような卵巣への自己免疫の発症は、胸腺を摘出した後であっても生後 7 日目の胸腺細胞、成体マウスの胸腺細胞、脾細胞、リンパ節細胞を移入することによって抑えられた。このことは、末梢に存在している自己反応性 T 細胞の活性化を胸腺外で抑制するメカニズムがあり、細胞レベルでアクティブに制御されていることを示していた。1980 年代の半ばから後半にかけて、臓器特異的自己免疫疾患の発症の抑制には CD4T 細胞が重要であることが示された(10, 11)。また、CD4T 細胞中でいずれの細胞分画がそのような自己免疫阻害活性を有しているのかが重要な課題となり、免疫抑制機能に一致する細胞表面抗原の探索が行われた。その過程で、末梢 CD4T 細胞のうち、CD5 分子を高発現する(CD4<sup>+</sup>CD5<sup>hi</sup>)、あるいは CD45RB 分子を低発現する(CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>lo</sup>)細胞の除去は、残りの細胞集団中に存在する自己反応性 T 細胞の自発的な活性化を引き起こし、臓器特異的自己免疫疾患の発病に至ることが報告された(12-14)。以上の結果は、自己反応性 T 細胞を抑制的に制御する細胞は、CD4T 細胞中の特定の亜集団であることを示している。

Sakaguchi らは、CD5 や CD45RB 分子よりも自己免疫阻害活性に一致する細胞表面抗原として CD25 分子を報告した(2)。CD25<sup>+</sup>T 細胞は未感作マウスおよびヒトにおいて末梢 CD4 T 細胞の 5~10%、末梢 CD8 T 細胞の 1%未満を占めており、CD4 T 細胞分画中の CD5<sup>hi</sup> および

CD45RB<sup>lo</sup> T細胞分画に含まれていた(図 1A)。また、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞を除去したマウス由来の脾細胞を同系ヌードマウス(胸腺を持たないため、T細胞のみを欠損しているマウス)に移入すると、CD5<sup>hi</sup>やCD45RB<sup>lo</sup> T細胞を除去した脾細胞移入の場合よりも広範な組織(胃、甲状腺、卵巣、副腎、膵臓)に対して自己免疫病が高頻度に誘導された(図 1B)。一方、これらの自己免疫疾患は少数のCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T細胞の共移入によって抑制された。このように、自己反応性 T細胞の活性化は免疫抑制性 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T細胞によって抑制されており、自己に対する免疫寛容はCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T細胞によって維持されていることが示された。

### 2-2 *In vitro* における免疫抑制性 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞の特性

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞は、未感作正常マウスにおいて末梢 CD4<sup>+</sup>T細胞の5~10%を占める(図 2A)。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞は、共存する他の T細胞(たとえば、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T細胞)の活性化を抑制する機能を有している(図 2B)(3, 4)。この抑制機能の発揮は、TCRを介した刺激を必要とする。重要なことは、TCRを介した抗原刺激(抗 CD3 抗体と APC によるポリクローナルな刺激)を受けたCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞は、同一抗原に反応する T細胞のみならず、他の抗原に反応する T細胞の増殖をも抑制することである(3, 15)。つまり、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞が TCRを介して一端活性化されると、広範な抗原に対する T細胞の活性化を抑制するようになる。

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞のもう一つの特性は、TCRを介した抗原刺激を与えても全く増殖反応を示さないことである(図 1 右図)。この不応答性は、副刺激分子である CD28 に対するアゴニスティック抗体や T細胞増殖因子の一つである高濃度 IL-2 共存下に抗原刺激した場合に解除され、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞は増殖する(3)。しかしながら、一端増殖したCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞に対して抗 CD28 抗体および IL-2 非共存下に再度 TCRを介した刺激を与えても増殖することはない。すなわち、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞はデフォルト状態として不応答性を示すことが明らかとなっている。

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞の抑制機能の分子基盤を解明するために、いくつかのグループが cDNA マイクロアレイ法などを用いて遺伝子発現を網羅的に解析している(16, 17)。その結果、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞は、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T細胞と比較して、CTLA-4、PD-1 などの TCR シグナルを阻害する副刺激分子や、GITR(glucocorticoid-induced tumor necrosis factor family-related gene)、OX-40、4-1BB、TNFR2 などの TNF 受容体ファミリー遺伝子群、CD103 などの細胞膜分子、SOCS-1/2、SLAP-130 などのサイトカインシグナル伝達を阻害する分子などを高発現していることが明らかとなっている。しかしながら、これらの分子は *in vitro* において T細胞(CD4<sup>+</sup>T細胞あるいは CD8<sup>+</sup>T細胞)を活性化させると高発現してくること、活性化 T細胞には抑制機能や不応答性が認められないことなどから、免疫抑制機能を担う直接の分子ではないとされている。

### 2-3 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T細胞の発生・分化の制御

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞の発生は、MHC クラス II 分子上に提示された自己抗原に依存している。

たとえば、DO11.10TCRトランスジェニックマウスは、マウス体内には生理的に存在しないOVA抗原すなわち非自己抗原を認識するTCR  $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖が強制発現されている。このようなトランスジェニックマウスにおいて、 $CD4^+CD25^-T$ 細胞の大部分はトランスジェニック $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖からなるTCRを発現しているが、 $CD4^+CD25^-T$ 細胞の多くはトランスジェニックTCR $\beta$ 鎖とそれと対をなす内在性TCR $\alpha$ 鎖を発現している。すなわち、TCR $\alpha$ 鎖に関しては対立遺伝子排除が完全ではないために、トランスジェニックTCR $\alpha$ 鎖だけではなく内在性TCR $\alpha$ 鎖を選択したT細胞も発生し、このうち、 $CD4^+CD25^-T$ 細胞の多くが内在性TCR $\alpha$ 鎖を選択しているのである。重要なことに、このマウスとRAG-2欠損マウス(TCRの遺伝子再構成酵素を欠損しているマウス)の交配により、内在性のTCR $\alpha$ 鎖の発現を欠損させた場合には、 $CD4^+CD25^-T$ 細胞の発生は完全に阻害されてしまう(18)。このことは非自己に対してアフィニティの強いTCRでは、 $CD4^+CD25^-T$ 細胞は発生できないことを示している。これに対して、外来抗原であるHA (Influenza Hemagglutinin) ペプチドを自己抗原として強制発現させたマウスと、その抗原に対して強いアフィニティを持つTCRを発現させたマウスのダブルトランスジェニックマウスでは、トランスジェニックTCRを発現するT細胞の多くが $CD4^+CD25^-T$ 細胞に分化していた(19)。尚、このようなHA自己抗原を発現するマウスとその抗原に対して弱いアフィニティを示すTCRを発現させたマウスのダブルトランスジェニックマウスでは、トランスジェニックTCRを発現する $CD4^+CD25^-T$ 細胞の割合は正常であり、トランスジェニックTCRのみを発現させたマウス由来の $CD4^+CD25^-T$ 細胞の割合と比べて同程度であった。以上の結果より、自己抗原を提示したMHCリガンドに強いアフィニティを示すT細胞が、 $CD4^+CD25^-T$ 細胞として発生・分化することが考えられる。

$CD4^+CD25^-T$ 細胞の発生は、遺伝的にもプログラムされている。X染色体連鎖型劣性変異であるscurfyマウスは、転写因子様のタンパク質をコードするFoxP3 (Forkhead/Winged helix P3) 遺伝子に欠陥を有している。このマウスは致命的な自己免疫疾患を引き起こして、生後3~4週齢以内に死亡する(20)。一方、ヒトではIPEX (Immunodysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked)というX染色体連鎖性の自己免疫疾患家系が知られていたが、この家系もFoxP3に欠陥を有している(21, 22)。興味深いことに、FoxP3の発現は $CD4^+CD25^-T$ 細胞に限局してみられ、 $CD4^+CD25^-T$ 細胞へのFoxP3の異所的強制発現は、免疫抑制性細胞としての形質と機能を誘導する(23)。つまり、ScurfyマウスやIPEXにみられる致命的自己免疫疾患の原因は、FoxP3の遺伝子変異による $CD4^+CD25^-T$ 細胞の発生・分化異常であったことを示している。このことはFoxP3が免疫抑制性CD4T細胞のマスター制御遺伝子であることを示している。

#### 2-4 免疫抑制性 $CD4^+CD25^-T$ 細胞

$CD4^+CD25^-T$ 細胞を除いたCD4T細胞( $CD4^+CD25^-T$ 細胞)の中にも、免疫抑制性CD4T細胞が僅かに存在していることが示されている。通常、 $CD4^+CD25^-T$ 細胞はTCRを介した抗原刺激により著しく増殖するが、この中にも低反応性を示す細胞集団が僅かに存在し、抑制

活性を示すことが知られている。たとえば、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞中にはインテグリン $\alpha_E$  鎖 (CD103)を発現する T 細胞が約 2%存在しており、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD103<sup>+</sup>T 細胞は *in vitro* において細胞接触依存的に CD4T 細胞の活性化を抑制する(24)。更に、この集団は FoxP3 を発現しており、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup>T 細胞や CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>T 細胞に比して炎症局所へのホーミング能が高いことが示されている(25)。他方、自己抗原を認識する TCR を強制発現させたトランスジェニックマウスにおいては、抑制能を持つ CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞が過剰に発生することが知られている(26)。HA ペプチドを自己抗原として胸腺上皮細胞や骨髄細胞に強制発現させたマウスと HA ペプチドに強く反応する TCR を持つトランスジェニックマウス (TCR-HA) のダブルトランスジェニックマウスでは、トランスジェニック TCR を持つ CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞は、HA ペプチドに対して顕著な低反応性を示していた。更に、この CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞は Rag<sup>-/-</sup>TCR-HA マウス由来 T 細胞 (HA を自己抗原として発現していないため、HA に強く反応する T 細胞) の増殖を抑制することが示された。このように、T 細胞の発生条件を人為的に制御すると、不応答性となる CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞が発生し、その細胞は免疫抑制性 CD4T 細胞に分化することが示されている。

#### 2-5 老齢時における CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の免疫抑制能

ヒトおよびマウスの研究から、加齢に伴い CD4T 細胞の応答性が低下することが示されている(27)。この低応答性は、T 細胞の活性化を抑制する CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の増加や機能の増強よりも、むしろ CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の機能低下に起因している。つまり、若齢時には抗原刺激に対して活発に増殖していた CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞が、加齢に伴ってその応答性を徐々に失うのである(7)。更に、そのような低応答性に陥った老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞は、正常な応答性を示す T 細胞の活性化を抑制する能力をも獲得していることが明らかになっている(7)。

老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の抑制機能は、細胞接触に依存しており、抑制性サイトカインである IL-4、IL-10、TGF- $\beta$ などの液性因子を介さない。たとえば、老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞は若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の増殖を抑制するが、ここに上記サイトカインの中和抗体である抗 IL-4 抗体、抗 IL-10 抗体、抗 TGF- $\beta$ 抗体を加えてもその抑制機能は解除されない(7)。

老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の抑制機能は、この細胞内の特定の亜集団に帰属することが示されている(図 3)。たとえば、Rhodamine123 (R123) の排出能力に基づき、老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞を分画すると、R123 に対して強く染まる R123<sup>hi</sup> T 細胞と弱く染まる R123<sup>lo</sup>T 細胞に分けられる。若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の大部分は R123<sup>hi</sup> T 細胞となるのに対して、老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞は一部の細胞のみが R123<sup>hi</sup> T 細胞となり、大部分の細胞が R123 の排出が亢進している R123<sup>lo</sup> T 細胞となっている。老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> R123<sup>hi</sup> T 細胞は、抗原刺激に対して若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞と同等の反応性を示し、抑制能力を全く示さない。一方、加齢に伴って著しく増加する老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> R123<sup>lo</sup>T 細胞は、抗原刺激に対して低応答性を示し、且つ強い抑制活性が認められた。更に、この R123<sup>lo</sup>T 細胞分画から分離された CD103<sup>+</sup>細胞は、加齢に伴いその存在割合が著しく増加し、非常に強い抑制活性を示す。このように老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T



細胞の抑制能は、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>R123<sup>lo</sup>T 細胞分画、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>R123<sup>lo</sup>CD103<sup>+</sup>T細胞分画の抑制機能により説明される(8)。

## 2-6 CD45 分子の構造と機能

CD45 分子は受容体型のチロシンホスファターゼであり、すべての有核造血系細胞で発現されている。CD45 分子はそれらの細胞において細胞表面タンパク質の約 10%を占める I 型膜貫通タンパク質である(図 4)。CD45 分子の細胞内領域は 2 個の Protein Tyrosine Phosphatase (PTP)ドメインからなり、細胞膜に近い側のドメイン領域のみにホスファターゼ活性が認められる。CD45 分子の細胞外ドメインは進化的に保存された 3 つの構成領域からなり、O-結合型糖鎖領域、システインを高頻度を含む領域、3 つのフィブロネクチン III 型モチーフを含む領域からなる(28)。このうち、O-結合型糖鎖の修飾を受ける領域は、CD45 分子の 4~6 番目のエクソン内にあり、これらのエクソンは細胞特異的な選択的スプライシングを受ける。

CD45 分子の細胞外ドメインの特徴が進化的に保存されていることから、そのリガンドの存在が推測されている。はじめに、CD22βが CD45 分子のエクソン 4~6 をいずれも含まないアイソフォーム(CD45RO)のリガンドの候補として同定された。しかしながら、CD22βは N 結合性のシアル酸に結合するレクチン受容体であり、CD45RO 以外の分子にも結合することから、CD45 分子との相互作用は特異的ではないことが示されている(29)。同様に、β-ガラクトシド特異的に結合する galectin-1 は、糖鎖修飾を受けた CD45 分子に結合する(30)。これらのレクチンは非特異的に T 細胞の糖タンパク質に結合することや、CD45 分子のホスファターゼ活性を制御する直接的な証拠が存在しないことから、CD45 分子のリガンドか否か議論が分かれている。

CD45 分子を欠損した T 細胞株や CD45 欠損マウスの解析から、CD45 分子が T 細胞の発生や TCR を介した T 細胞の活性化に重要な役割を担うことが明らかとなっている(31, 32)。たとえば、CD45 欠損マウスでは T 細胞の発生・分化に異常がみられ、T 細胞の発生は未熟な胸腺細胞(CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>)の分化段階で停止している。また、CD45 欠損 T 細胞株は TCR を介した抗原刺激を与えても活性化しない。T 細胞が TCR を介してリガンドとなるペプチド/MHC 複合体を認識すると、TCR の補助レセプター(CD4/CD8)およびその細胞内ドメインに会合している Lck や Fyn が TCR 複合体(TCRα鎖, β鎖, CD3 複合体, CD3ε鎖などから構成される)へリクルートされる。Src ファミリーキナーゼに属する Lck や Fyn は、その後、TCR 複合体および ZAP70 などの様々な標的分子をリン酸化し、T 細胞を活性化へと導く。このような T 細胞の活性化を導く Src ファミリーキナーゼの活性化は、二つのチロシン残基により制御されており、その活性化にはキナーゼドメイン近傍に存在するチロシン残基のリン酸化と C 末側に存在するチロシン残基の脱リン酸化が必要である。Lck においては、394 番目と 505 番目のチロシン残基がそれぞれのチロシン残基にあたる。Lck の 505 番目チロシンのリン酸化は、自身が持つ SH2 ドメインとの相互作用によって基質結合部位を塞ぐような閉じた構造をとる。CD45 分子は Lck のこれらチロシン残基のうち、特に C 末側にあるチロシン残基(505 番目)の脱リン酸化と強い関係があることが示されている(33)。つまり、CD45 ホスファターゼによる Lck の脱リン酸化

はこのような構造変化を防ぐことによって Lck をより活性化しやすい状態に保ち、結果として TCR シグナルを正に制御していることが示唆されている(図 5)。

このような TCR シグナル近傍における CD45 の機能に対して、CD45 分子はサイトカイン受容体のシグナル伝達にも重要な役割を担っている。サイトカインが受容体に結合すると、その細胞内ドメインに会合した Janus kinases (JAKs) を介して細胞内にシグナルが伝達される。活性化 JAKs は、転写因子である Signal Transducer and Activators of Transcription (STAT) をリン酸化することにより、その 2 量体化や核への移行を促進する。核に移行した STAT は細胞増殖や細胞分化に関わる遺伝子の転写を制御する。CD45 分子は、JAK ファミリーのメンバーである JAK1、JAK2、JAK3、Tyk2 に結合し、これらの分子を直接脱リン酸化することが示されている(図 6)(34, 35)。つまり、CD45 分子は JAK ファミリーの脱リン酸化を促進することにより、サイトカイン受容体からのシグナルを負に制御していることが明らかにされている。

### 3.材料と方法

#### 3-1 動物

実験には SLC から購入した C57BL/6 (B6) マウスと Wistar ラット (2 ヶ月齢) を用いた。2 ヶ月齢および 24 ヶ月齢マウスを各々若齢および老齢マウスとして使用し、使用前までは specific pathogen-free で維持した。B6Thy1.1 コンジェニックマウスは The Jackson Laboratory から購入された。これらの動物は動物保護規約に則り、処置した。老齢マウスの中には稀にひどい病態を呈している個体がみられるが、これらは実験から排除した。

#### 3-2 試薬

CD4, CD25, pan-CD45 (30-F11) に対する PE 標識抗体、FITC 標識抗体、非標識抗体は BD Pharmingen から購入された。抗 Pan-CD45 (M1/9.3.4.HL.2)、CD45RA (14.8)、CD45RB (MB4B4, MB23G2)、CD45RC (I/24.D6) 抗体を産生するハイブリドーマは American Type Culture Collection から購入された。抗体の Fab は ImmunoPure Fab Preparation キット (Pierce) を用いて調製された。

#### 3-3 単クローン抗体の作製

Wistar ラットの腹腔内に  $3 \times 10^6$  の老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞を免疫し、2 週間後に再度同様の操作を行った。更に 2 週間後に 3 回目の免疫操作を行い、4 週間後に 4 回目の免疫操作 (この時のみ尾静脈内投与) を行った。4 回目の免疫から 3 日後に、免疫したラットから脾細胞を調製し、PEG1500 (Roche) を用いて P3X63Ag8.653 (Ag8) ミエローマ細胞と細胞融合した。HAT 選択培地 (SIGMA) で 10 日間培養し、ハイブリドーマを選別した。その後、HT 培地で細胞を 3~4 日培養した後、10% FCS-DMEM 培養液に置換した。これらの選択培地により生き残ったハイブリドーマの培養上清を用いて、老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の抑制機能を解除するハイブリドーマの選定を行った。クローニングしたハイブリドーマが産生する抗体のアイソタイプは、アイソタイピングキット (SEROTEC) により同定した。Pristane (SIGMA) を投与した SCID マウス (T, B 細胞欠損マウス) にハイブリドーマを腹腔内投与し、10 日目の腹水を回収した。腹水に含まれる抗体は、50% 硫酸アンモニウム (MERCK) を用いて沈殿させた後、PBS で透析し、粗精製を行った。

#### 3-4 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の調製

抗 CD25 抗体産生ハイブリドーマ (7D4) の上清と最終濃度 10 倍希釈のウサギの補体 (Cedarlane Laboratories) を用いて全脾細胞を 37°C、45 分間振とう培養し、このような操作を 2 回繰り返すことにより、全脾細胞から CD25 陽性細胞を除去した。CD25 陽性細胞を除いた細胞分画から、抗 CD4 (GK1.5) マグネティックビーズとマグネティックカラム (Miltenyi Biotec) を用いて CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞分画を調製した。調製した細胞の純度は、抗 CD25 抗体 (PC61)、

FITC 標識抗ラット IgG、PE 標識抗 CD4 抗体 (H129.19) を用い、フローサイトメトリー (Epics ALTRA) にて解析した。若齢、老齢マウス由来の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の最終純度は 各々 >98% CD4<sup>+</sup>, <0.2% CD25<sup>+</sup> もしくは >96% CD4<sup>+</sup>, <0.1% CD25<sup>+</sup> であった。

### 3-5 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の調製

2ヶ月齢の B6 マウス由来の全脾細胞から、抗 CD4 (GK1.5) マグネティックビーズとマグネティックカラム (Miltenyi Biotec) を用いて CD4<sup>+</sup>T 細胞を調製した。その後、FITC 標識抗 CD25 抗体と PE 標識抗 CD4 抗体 (H129.19) を用いて CD4<sup>+</sup>T 細胞を染色し、フローサイトメトリーにて CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を分取した。

### 3-6 細胞の培養

Mitomycin C 処理を施した脾細胞を抗原提示細胞 (APC) として用いた。T 細胞の抗原刺激には、抗 CD3 抗体産生ハイブリドーマ (145-2C11) の上清 (5%) と APC を用いた (図の説明に指定してある場合を除く)。培養には 96well-丸底プレートを用い、10% FCS DMEM (10% 非働化 FCS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 50 µM 2-ME) で培養した。共培養実験では若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞と老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を 1:1 の割合で培養した (図の説明に指定してある場合を除く)。主に培養開始後 2 日目に [<sup>3</sup>H]thymidine (37kBq/well) を 4 時間パルスし、取り込み量を測定することにより T 細胞の増殖を定量した。抗 CD3 抗体、APC、マウス recombinant IL-2 (10U/ml ; Shionogi) を用いて老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の細胞株を維持した。

### 3-7 免疫沈降法と質量分析

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞から樹立した T 細胞ハイブリドーマを非還元 of lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 50 mM iodoacetamide, 1 mM PMSF, 5 mM EDTA, 10 µg/ml trypsin inhibitor] で溶解した。氷上で 20 分間静置した後、遠心により不溶物を除いた。抗 CD45 抗体 (59.32 あるいは I.11) を結合させた Sepharose 4FF (Amersham Bioscience) と可溶化分画を 4°C で 100 分間混和し、遠心後、Sepharose 4FF を lysis buffer で 2 回洗浄した。結合タンパク質を非還元状態で SDS 電気泳動 (5% gel) し、Coomassie brilliant blue (CBB) で染色した。CBB で染まったバンドを切り出し、trypsin 処理後、Shimadzu Biotech AXIMA-CFR mass spectrometer にて MALDI-TOF 質量分析を行った。

### 3-8 遺伝子導入細胞の作製

CD45 分子の発現ベクターを作製するため、若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞から総 RNA を回収し、oligo (dT)<sub>12-18</sub> プライマー (Amersham Bioscience) と SuperScript II (Invitrogen Life Technologies) を用いて一本鎖 cDNA を合成した。その後、次のプライマーを用いて CD45 分子の細胞外ドメインを RT-PCR により増幅した。CD45 センス鎖: 5'-GTCCGGAATTCCTGATCTCCAGA

FITC 標識抗ラット IgG、PE 標識抗 CD4 抗体 (H129.19) を用い、フローサイトメトリー (Epics ALTRA) にて解析した。若齢、老齢マウス由来の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の最終純度は 各々 >98% CD4<sup>+</sup>, <0.2% CD25<sup>+</sup> もしくは >96% CD4<sup>+</sup>, <0.1% CD25<sup>+</sup> であった。

### 3-5 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の調製

2ヶ月齢の B6 マウス由来の全脾細胞から、抗 CD4 (GK1.5) マグネティックビーズとマグネティックカラム (Miltenyi Biotec) を用いて CD4<sup>+</sup>T 細胞を調製した。その後、FITC 標識抗 CD25 抗体と PE 標識抗 CD4 抗体 (H129.19) を用いて CD4<sup>+</sup>T 細胞を染色し、フローサイトメトリーにて CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を分取した。

### 3-6 細胞の培養

Mitomycin C 処理を施した脾細胞を抗原提示細胞 (APC) として用いた。T 細胞の抗原刺激には、抗 CD3 抗体産生ハイブリドーマ (145-2C11) の上清 (5%) と APC を用いた (図の説明に指定してある場合を除く)。培養には 96well-丸底プレートを用い、10% FCS DMEM (10% 非働化 FCS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 50 µM 2-ME) で培養した。共培養実験では若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞と老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を 1:1 の割合で培養した (図の説明に指定してある場合を除く)。主に培養開始後 2 日目に [<sup>3</sup>H]thymidine (37kBq/well) を 4 時間パルスし、取り込み量を測定することにより T 細胞の増殖を定量した。抗 CD3 抗体、APC、マウス recombinant IL-2 (10U/ml ; Shionogi) を用いて老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の細胞株を維持した。

### 3-7 免疫沈降法と質量分析

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞から樹立した T 細胞ハイブリドーマを非還元 of lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 50 mM iodoacetamide, 1 mM PMSF, 5 mM EDTA, 10 µg/ml trypsin inhibitor] で溶解した。氷上で 20 分間静置した後、遠心により不溶物を除いた。抗 CD45 抗体 (59.32 あるいは I.11) を結合させた Sepharose 4FF (Amersham Bioscience) と可溶化分画を 4°C で 100 分間混和し、遠心後、Sepharose 4FF を lysis buffer で 2 回洗浄した。結合タンパク質を非還元状態で SDS 電気泳動 (5% gel) し、Coomassie brilliant blue (CBB) で染色した。CBB で染まったバンドを切り出し、trypsin 処理後、Shimadzu Biotech AXIMA-CFR mass spectrometer にて MALDI-TOF 質量分析を行った。

### 3-8 遺伝子導入細胞の作製

CD45 分子の発現ベクターを作製するため、若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞から総 RNA を回収し、oligo (dT)<sub>12-18</sub> プライマー (Amersham Bioscience) と SuperScript II (Invitrogen Life Technologies) を用いて一本鎖 cDNA を合成した。その後、次のプライマーを用いて CD45 分子の細胞外ドメインを RT-PCR により増幅した。CD45 センス鎖: 5'-GTCCGGAATTCCTGATCTCCAGA

ットした。検出には ECL (Amersham Biosciences) を用いた。抗 Lck 抗体、抗 JAK1 抗体、抗 STAT5 抗体は Santa Cruz Biotechnology から購入された。抗 pSTAT5 抗体は Upstate から、抗 pJAK1 抗体は BioSource Int. から購入された。

### 3-12 CD45-Ig 融合タンパク質の作製

マウス CD45 分子の Cys-rich 領域および N 末端側のフィブロネクチン III 型モチーフ領域を含む 1-234 アミノ酸領域を RT-PCR により調製した。用いたプライマーを次に示す。ClaI 部位を含むセンスプライマー: (5'-CCATCGATAGGAGACCCTATTTCTTAGGGGCACAG-3') ; マウス CD45 分子のイントロン 11 の一部分および SpeI 部位を含むアンチセンスプライマー: (5'-GACTAGTATATACTTACTCCCCAAATCTGTCTGCACATTTATAA-3')。PCR で増幅した断片を ClaI と SpeI で制限酵素処理し、ヒト IgG1 の Fc 領域を含む pEF-Fc 発現ベクターに組み込んだ (CD45-Ig)。安定的発現細胞株を得るために、ネオマイシン耐性遺伝子を含む vector と共にエレクトロポレーションし、P3U1 プラズマ細胞腫に導入した。プロテイン G カラム (Amersham Biosciences) を用いて、培養上清から CD45-Ig を精製した。

## 4.結果

### 4-1 59.32 抗体および I.11 抗体は老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の抑制機能を阻害する

老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の抑制機能の制御に関わる分子を明らかにするため、抑制機能阻害抗体の樹立を試みた。材料と方法の項に記載した手順に従い、抗体産生ハイブリドーマを作製した結果、HAT 選択培地で生き残ったハイブリドーマ 1197 ウェルを得た。この培養上清を用いて、抑制機能解除抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングを行った。最終的に、最も効率的に抑制機能を解除する 2 種類の単クローン抗体産生ハイブリドーマ[59.32 抗体(IgM)および I.11(IgG2c)]を樹立した。若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞は TCR を介した刺激により活発に増殖し、刺激後 2 日目に細胞増殖のピークを迎えるが、同数の老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞を加えた場合には、若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の増殖は抑制される。この際に 59.32 抗体あるいは I.11 抗体をあらかじめ添加しておく、老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞が共存しているにもかかわらず、添加した抗体の用量に依存的して細胞増殖に回復が認められた(図 7)。この培養条件において両抗体は若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞単独、老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞単独の増殖を著しく増強することはなかった。以上の結果より、若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞と老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の共培養における応答性の回復は、59.32 抗体および I.11 抗体によって若齢・老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の双方の増殖が増強されたのではなく、老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の抑制機能が阻害されたためであることが示唆された。

次に、抗体が認識する分子の発現分布を検討するため、若齢マウス、老齢マウスから調製した脾細胞を 59.32 抗体もしくは I.11 抗体と抗 CD4 抗体で二重染色した。図 8 に示されるように、CD4 分子の発現の有無に関わらず、両抗体はすべての脾細胞を染色した。これらの結果は、両抗体の認識分子は脾細胞を構成するすべての細胞において発現されていることを示している。

### 4-2 両抗体は CD45 分子の細胞外領域のうちすべてのアイソフォームに共通する領域を認識している

図 8 で示されたように、59.32 抗体および I.11 抗体で認識される分子の発現分布が同一であったことから、両抗体が同一分子を認識している可能性を免疫沈降法により検討した。若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞由来の T 細胞ハイブリドーマから総タンパク質を回収し、59.32 抗体および I.11 抗体の認識分子を精製し、それぞれの抗体でイムノプロットを行った(図 9)。その結果、59.32 抗体による免疫沈降物は 59.32 抗体のみならず I.11 抗体で検出され、およそ 200kDa と 180kDa に位置するタンパク質が検出された。同様に I.11 抗体による免疫沈降物は 59.32 抗体においても検出され、同様な二本のバンドが検出された。以上の結果から、両抗体は同一分子を認識している可能性が強く示唆された。

次に、59.32 抗体および I.11 抗体の認識分子を同定するため、両抗体によって免疫沈降された 200kDa と 180kDa のタンパク質の質量分析を行った。タンパク質の質量分析結果をもとに

データベースサーチを行った結果、59.32 抗体により免疫沈降された二本の異なるバンドは CD45 分子であり、I.11 抗体で免疫沈降された二本のバンドも同じく、CD45 分子であることが判明した。以上の結果より、59.32 抗体および I.11 抗体は共に CD45 分子を認識していることが明らかとなった。

CD45 分子はエクソン 4~6 の選択的スプライシングにより、多様なアイソフォームを形成する (36) (図 4)。そのアイソフォームの発現は、細胞種およびその細胞の活性化状態により厳密に制御されている。そこで、59.32 抗体および I.11 抗体が認識するのは CD45 分子のいずれのアイソフォームであるかを特定するため、CD45RO (エクソン 4-6 を含まないアイソフォームの一つ) の細胞外ドメインを強制発現させた NRK 細胞株を作製した。その後、59.32 抗体、I.11 抗体および既存の抗 CD45 抗体で CD45RO 強制発現細胞株を染色し、フローサイトメリーにて解析した。その結果、CD45RO 強制発現細胞株は、pan-抗 CD45 抗体 (30-F11, M1/9.3.4.HL.2) および 59.32 抗体、I.11 抗体により染色された (図 10)。また、両抗体は CD45RB を発現させた COS7 細胞をも染色した (図 11)。以上の結果は、59.32 抗体および I.11 抗体の認識部位は CD45 のすべてのアイソフォームに共通している領域であり、両抗体はすべてのアイソフォームを認識することが示された。

#### 4-3 抗 CD45 抗体の中で 59.32 抗体および I.11 抗体のみが、老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 細胞の抑制機能を解除する

抑制機能解除に本質的な役割を果たす領域は、CD45 分子細胞外領域のどの領域であるかを検討するため、59.32 抗体および I.11 抗体と他の抗 CD45 抗体 (30-F11, M1/9.3.4.HL.2, 14.8, MB4B4, MB23G, I/24.D6) の認識部位を比較検討した。図 12 で示すように、若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞は 30-F11 および M1/9.3.4.HL.2 で強染されるが、あらかじめ 59.32 抗体もしくは I.11 抗体で若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞を前処理 (図 12 の説明に記載) しておくと、30-F11 および M1/9.3.4.HL.2 の染色強度が低下した。逆に、あらかじめ 30-F11 もしくは M1/9.3.4.HL.2 で若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞を前処理すると、59.32 抗体および I.11 抗体の染色強度は 59.32 抗体もしくは I.11 抗体単独で染色した場合に比べて低下した。しかしながら、選択的スプライシングエクソンを認識する抗 CD45 抗体 (14.8, MB4B4, MB23G, I/24.D6) を用いて同様の前処理を行った場合には、59.32 抗体および I.11 抗体の染色強度は低下しなかった。以上の結果は 59.32 抗体、I.11 抗体、M1/9.3.4.HL.2、30-F11 が CD45 分子上の非常に近い部位を認識していることを示している。また、他の抗 CD45 抗体 (14.8, MB4B4, MB23G, I/24.D6) が細胞上の CD45 分子に結合している状態であっても、59.32 抗体および I.11 抗体は CD45 分子に結合できることを示している。

次に、59.32 抗体、I.11 抗体、30-F11 および M1/9.3.4.HL.2 の認識部位を詳細に解析するため、CD45RO 分子の細胞外領域を部分的に欠損する一過的強制発現細胞 (COS7 細胞) を作製し、各抗 CD45 抗体で染色した。作製した 12 種類の CD45RO 部分的欠損細胞 (図 13) のうち、 $\Delta 2.5 \sim \Delta 3.1$ 、 $\Delta 9$ 、 $\Delta 10$  が 30-F11 および M1/9.3.4.HL.2 で認識され、 $\Delta 2.5$ 、 $\Delta 3$ 、



△9, △10 が 59.32 抗体および I.11 抗体で認識された。そこで、59.32 抗体および I.11 抗体の染色能を維持していた △3 と染色能を失った △3.1 の安定的強制発現細胞株 (NRK 細胞) を作製し、各抗 CD45 抗体で染色した (図 14)。△3 と △3.1 は CD45 のアミノ酸配列 (Accession no. NM\_011210) のうち、9-38 アミノ酸、9-44 アミノ酸を欠損させた CD45RO 部分的欠損細胞株であり、O-結合型糖鎖領域の直下にあるシステインに富んだ領域を部分的に欠損している。4 種類の抗 CD45 抗体による △3 の染色は CD45RO 強制発現細胞株と比べてわずかに低下するが、抗体間の染色強度はほとんど同一である (図 14)。これに対して、△3.1 における 30-F11 および M1/9.3.4.HL.2 の染色は △3 における染色とほぼ同一であるのに対して、59.32 抗体および I.11 抗体の染色は完全に失われた。これらの結果は、抑制機能を阻害できる抗体 (59.32 抗体と I.11 抗体) は他の抗 CD45 抗体 (30-F11, M1/9.3.4.HL.2) とは異なる部位を認識していることを示している。

次に、59.32 抗体および I.11 抗体と非常に近いエピトープを認識した M1/9.3.4.HL.2 および 30-F11 が、老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の抑制機能を阻害できるか否かを検討した。図 15 に示すように、老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞は細胞数に依存して若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の増殖を抑制するが、59.32 抗体が存在すると老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞は若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の増殖を抑制できない。これに対して、30-F11 あるいは M1/9.3.4.HL.2 を共存させた場合には、老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞は細胞数に依存して若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の増殖を抑制した。以上の結果は、30-F11 および M1/9.3.4.HL.2 は老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の抑制機能を阻害できないことを示している。次に、他の抗 CD45 抗体 (抗 CD45RA 抗体 : 14.8 ; 抗 CD45RB 抗体 : MB4B4 と MB23G2 ; 抗 CD45RC 抗体 : I/24.D6;) についても検討した (図 16)。若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞と老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞を 1 対 1 で混合し、抗原刺激した場合には若齢 T 細胞の増殖は抑制されるが、59.32 抗体および I.11 抗体を共存させると、その増殖抑制は解除される。これに対して、既存の抗 CD45 抗体共存下では、いずれにおいても増殖抑制の解除は認められなかった。また、それら抗体のいくつかは若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞単独の増殖に対して阻害的にさえ作用した。以上の結果は、CD45 分子に対する抗体の中でも、59.32 抗体および I.11 抗体のみが老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の抑制機能を解除することを示している。

59.32 抗体や I.11 抗体のみが抑制機能解除作用を示す理由として、59.32 抗体および I.11 抗体が CD45 分子に加えて CD45 とは異なる分子に交差反応することによって老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の抑制機能を解除している可能性が考えられる。そこで、59.32 抗体の抑制機能解除作用に対して抗 CD45 抗体が競合するか否かを検討した。59.32 抗体が存在する場合には老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の抑制機能は解除されるが、抗 CD45 抗体 (M1/9.3.4.HL.2) を加えると、用量に依存して 59.32 抗体の作用は失われ (図 17A)、再び老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞による増殖抑制が認められるようになった。これに対して、抗 CD45 抗体であっても 59.32 の染色に競合しない抗体 (MB4B4) の場合には、59.32 抗体の効果に影響がなかった。また、I.11 抗体においても同様な結果が得られた (図 17B)。これらの結果は、CD45 細胞外ドメインの特別な領域に 59.32 抗体および I.11 抗体が結合することが、老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の抑

制機能に重要であることを示している。

#### 4-4 老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞上の CD45 分子を架橋することが、その抑制機能解除に必要である

CD45 分子はすべての有核造血系細胞で発現していることから、前述の抑制機能解除において抗体の標的となっている細胞は、若齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞 (応答細胞)、APC、老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞のうち、いずれであるのか不明である。そこでまず、応答細胞に対する影響を検討した。図 18 に示すように、TCR 依存性の抗原刺激に用いる抗 CD3 抗体量を 5% 培養上清から希釈すると、応答細胞の増殖は低下するが、59.32 抗体を共存させるとその低下は緩やかになる。つまり、ある抗体濃度の抗 CD3 抗体においては、59.32 抗体は応答細胞の増殖を増強することが判明した。

次に、応答細胞、APC、老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の共培養において、いずれの細胞に抗体が作用することが老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の抑制機能解除に必要であるのかを検討した。老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞は応答細胞の増殖を 20%以下にまで抑制するが、あらかじめ 59.32 抗体で前処理した老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞では、応答細胞の増殖を抑制できなかった (図 19A)。また、応答細胞や APC を 59.32 抗体で前処理した場合、応答細胞の増殖は抗体未処理の場合と同等であったが、ここに未処理の老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞を共存させておくと、各群における応答細胞の増殖はすべて抑制された。すなわち、59.32 抗体は増殖抑制に対する抵抗性を応答細胞や APC に付与していることはなかった (図 19B)。これらの結果は、老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞に対して 59.32 抗体が作用することこそ、抑制機能の解除に必要であることを示している。次に、応答細胞である若齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の代わりにラット脾細胞を用いて、老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の抑制機能に対する抗体の影響を検討した。すなわち、抗体の樹立に用いた免疫動物はラットであり、両抗体はラット CD45 分子には反応せず (図 20A)、ラット脾細胞と老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の共培養系において、両抗体は老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞にのみ反応する。図 20B で示すように、抗 CD3 抗体の代わりに Concanavalin A (Con A) でポリクローナルに刺激したラット脾細胞は活発に増殖するのに対し、老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞を共存させるとその増殖は抑制される。この系に 59.32 抗体を加えておくとラット脾細胞の増殖は回復し、老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の抑制機能は解除された。この結果もまた、59.32 抗体が老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞へ作用することがその抑制機能の解除に重要であることを示している。

次に、59.32 抗体および I.11 抗体による老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の抑制機能解除には、抗体が CD45 分子に結合することのみで十分であるのか、あるいは抗体による CD45 分子の架橋が必要であるのかを検討した。59.32 抗体は IgM であり、I.11 抗体は IgG であることから、I.11 抗体は一価の抗体 (Fab) すなわち CD45 分子を架橋しない抗体に調製可能である。そこで、I.11 抗体から I.11Fab を調製した。I.11 抗体で染色した脾細胞は抗ラット IgG (H+G) 抗体および抗ラット Fc 特異抗体で染色されるのに対して、I.11Fab で染色した脾細胞は抗ラット IgG (H+G) 抗体のみで染色された。このことは、I.11Fab 抗体は CD45 分子に対する結合性を維持しているこ

と、および Fc 領域を持たない一価の抗体であることを示している(図 21A B)。次に、この I.11Fab が老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の抑制機能を解除するか否かを検討した(図 21C)。応答細胞、老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞を混合し、APC と抗 CD3 抗体で刺激する際に I.11 抗体および I.11Fab を添加したところ、I.11 抗体は老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の抑制機能を用量依存的に解除するが、I.11Fab にはそのような作用は全く認められなかった。この結果は、老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞上の CD45 分子を架橋することが抑制機能解除に必要であることを示している。

抗 CD45 抗体(ALI 4A2)をビーズにより架橋すると、アポトーシス誘導作用が認められることが知られている。たとえば、TCR 非刺激下に抗 CD45 抗体で CD45 分子を架橋すると、ミトコンドリア膜ポテンシャルの低下、活性酸素種の産生、ホスファチジルセリン残基の暴露など、アポトーシス細胞の特徴が認められる(37)。また、この抗 CD45 抗体(ALI 4A2)の架橋によるアポトーシスには、CD45 の細胞内ホスファターゼドメインは関与せず、CD45 の細胞内ドメインをほとんど欠損した細胞にも誘導されることが示されている(38)。そこで、59.32 抗体および I.11 抗体による抑制機能解除は、老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞に誘導されるアポトーシスで説明できるか否かについて検討した。Thy1.1APC、Thy1.1 応答細胞と Thy1.2 老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>細胞を混合後抗 CD3 抗体で刺激し、抗原刺激から 24 時間後の Thy1.2 の AnnexinV 陽性細胞を測定した。図 22 に示されるように、59.32 抗体および I.11 抗体で誘導される老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>細胞のアポトーシスは、他の抗 CD45 抗体(30-F11)で処理した場合や抗 CD45 抗体未処理の場合に比べて有意な差は認められなかった。これらの結果は、アポトーシス誘導による老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞数の減少が抑制機能解除のメカニズムではないことを示している。

#### 4-5 59.32 抗体および I.11 抗体は若齡および老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞に対して副刺激能を有する

図 18 で示したように、特定濃度の抗 CD3 抗体(1.25%, 0.313% 培養上清)と APC の共存下において、59.32 抗体は若齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の増殖を増強させる。更に、T 細胞の増殖を最も顕著に誘導する抗 CD3 抗体の濃度(5% 培養上清)であっても、59.32 抗体と I.11 抗体は若齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞に長期持続的な増殖を誘導した(図 23A)。通常、APC と抗 CD3 抗体を用いて *in vitro* で T 細胞を刺激した場合には、その増殖のピークは 2 日目もしくは 3 日目に認められ、その後、徐々に終息する。59.32 抗体を添加した場合には、細胞増殖のピークは 5 日目に認められるようになり、細胞増殖は 59.32 抗体非共存下に刺激した場合に比べておよそ 8 倍にまで増強された。このような作用は他の抗 CD45 抗体(30-F11)には認められなかった。59.32 抗体および I.11 抗体による長期持続的な増殖が何に起因するのかを調べるため、T 細胞増殖因子である IL-2 産生について検討した。APC と抗 CD3 抗体で刺激した場合には、IL-2 mRNA の急激な上昇が認められた(図 24)。IL-2 mRNA のピークは、抗原刺激から 16 時間後に認められ、その後徐々に減少した。59.32 抗体共存下に抗原刺激した場合も同様に、IL-2 mRNA の急激な上昇が認められたが、抗原刺激から 16 時間以降も IL-2 mRNA の転写

は持続していた。その IL-2 mRNA の相対量のピークは 59.32 抗体非共存下に刺激した場合に比べ、およそ 2 倍であり、抗原刺激から 50 時間が経っても、IL-2 mRNA の相対量は高レベルに維持されていた。このような持続的な IL-2 mRNA の転写は IL-2 タンパク質の合成を増強していた(図 24)。すなわち、48 時間後の培養上清中には IL-2 タンパク質量は 59.32 抗体非共存下時に比べて 15 倍も蓄積していることが判明した。更に、59.32 抗体および I.11 抗体は老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の応答性にも影響を与えた(図 23B)。老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞は若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞と比較して低い細胞増殖能を示すが、IL-2 を存在させると老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の増殖は回復する。図 23B で示すように、59.32 抗体と I.11 抗体は、IL-2 共存下において老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の増殖を増強した。この結果は、59.32 抗体および I.11 抗体には抑制機能を解除するという特性があることに加え、若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞および IL-2 共存下における老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の増殖を増強する作用があることを示している。

#### 4-6 59.32 抗体は IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ 産生を増強する

T 細胞の活性化には主に二つのシグナルが必要である。一つはペプチド/MHC 複合体を認識する TCR からのシグナルであり、もう一つは APC 上のさまざまなリガンドに対応する T 細胞副刺激受容体からのシグナルである。APC から副刺激シグナルを受容する T 細胞上の分子のうち、最も良く解析されている分子の一つとして CD28 分子がある。CD28 は 2 量体を形成する糖タンパク質分子であり、APC 上の B7-1(CD80)および B7-2(CD86)と結合する(39, 40)。CD28 分子からの副刺激は IL-2 mRNA の転写と安定性を上昇させる(41)。また、CD28 分子に対するアゴニスティック抗体は、IL-2 の産生のみならず、他のサイトカインの産生も増強することが知られている(41-44)。59.32 抗体および I.11 抗体は、T 細胞の細胞増殖を高め、IL-2 産生を増強する作用があることから、59.32 抗体が他のサイトカイン産生に及ぼす影響について検討した。図 25 に示されるように、59.32 抗体共存下に T 細胞を刺激した場合には、IL-2 の産生を著しく高めるのみならず、IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  の産生を増強していた。興味深いことに、IL-4, IL-10 産生は培養後期に認められ、IFN- $\gamma$  産生は培養初期より認められた。これらの結果により、59.32 抗体は CD28 に対するアゴニスティック抗体と同様に IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  産生を増強し、T 細胞に副刺激様のシグナルを導入していることが考えられる。

#### 4-7 59.32 抗体と I.11 抗体は CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の抑制機能をも解除する

GITR に対するアゴニスティック抗体が CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞および老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の抑制機能を解除することから(7, 45)、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞および老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の抑制機構は部分的に共通していることが示唆される。そこで、59.32 抗体と I.11 抗体が CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の抑制機能を解除できるか否か検討した。図 26A に示すように、APC と抗 CD3 抗体で刺激した場合には、若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞は活発に増殖するが、同数の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞を加えて刺激した場合には、若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の増殖は抑制される。この際に 59.32 抗体

もしくは I.11 抗体を添加しておく、若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の応答性が回復し、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞による増殖抑制は解除された。また、両抗体は若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞および CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の増殖を増強することはなかった。これらの結果は、両抗体が CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の抑制機能を解除することを示している。

次に、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞に対して 59.32 抗体が直接作用することが抑制機能解除に重要であるのか否かを明らかにするため、図 20 と同様に、応答細胞としてラット脾細胞を用いて CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の抑制機能に対する 59.32 抗体の影響を検討した。図 26B で示すように、マウス由来の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞は Con A で刺激したラット脾細胞の増殖を抑制する。この系に 59.32 抗体を加えるとラット脾細胞の増殖は回復した。次に、両抗体による抑制機能解除は、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞に誘導されるアポトーシスによるものか否かを検討した。図 22 で示したように、59.32 抗体および I.11 抗体による CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞のアポトーシス誘導は、若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞と同程度であった。このことは、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞のアポトーシス誘導が抑制機能解除のメカニズムではないことを示している。以上の結果から、59.32 抗体および I.11 抗体は CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞に対して作用し、その抑制機能を解除していることが明らかになった。

#### 4-8 59.32 抗体および I.11 抗体は Lck, JAK ホスファターゼとしての CD45 分子の機能を増強する

CD45 は細胞内領域にチロシンホスファターゼ活性を持つ I 型膜貫通タンパク質であり、T 細胞の発生や活性化に重要な役割を果たしている(36)。たとえば、CD45 欠損 T 細胞株や CD45 欠損マウス由来の T 細胞は TCR 刺激に対する応答性を欠いている。これらの細胞では、T 細胞の活性化において主に機能している Src ファミリー チロシンキナーゼの Lck と Fyn が不活性化されている(46-48)。Lck 活性化には C 末端側に存在するチロシン残基(505 番目)の脱リン酸化が必要であり、その脱リン酸化酵素として CD45 が注目されていた。実際に CD45 欠損マウスの T 細胞の発生不全が、恒常的活性化型の Lck (Y505 番目のチロシンをフェニルアラニンに置換した変異体 : Y505F)トランスジェニックマウスとの交配でレスキューされたことから、CD45 と Lck の遺伝的な相互作用も明らかとなっている(図 5)(33, 49)。そこで、Lck ホスファターゼとしての CD45 分子の機能に対する 59.32 抗体の影響を検討した。抗 CD3 抗体により T 細胞を刺激すると Lck の活性化が認められる。このとき Lck の構造変化により電気泳動時の移動度が p56 から p60 にシフトすることが知られている(50)。このシフトは Lck の N 末端側にあるセリン残基(Ser59)のリン酸化と一致している(51)。APC と抗 CD3 抗体で若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を刺激した場合には、活性化に伴い p56<sup>lck</sup> 以外に高分子量側へシフトした二本のバンドが認められた(図 27A)。固層化抗 CD3 抗体による刺激では、活性化に伴い p56<sup>lck</sup> 以外に高分子量側へのシフトした一本のバンドが認められた(data not shown)。このような違いは、抗原刺激の方法の違いによるものと考えられ、APC, 抗 CD3 抗体刺激時に認められた p56<sup>lck</sup> 以外の二本のバンドもまた活性化 Lck であると考えられた。59.32 抗体共存下に抗

原刺激した場合、同様な Lck のシフトが認められたが、抗原刺激後 3 時間における p56<sup>lck</sup> から高分子量側への変化は抗体非共存下に刺激した場合に比べてより顕著であった。これらの結果は、59.32 抗体はより強く Lck を活性化させることが考えられる。

CD45 分子は TCR シグナルの制御に関わるのみならず、サイトカインシグナルの制御にも関与している(図 6)。TCR を介したシグナルにより活性化された CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞は、未刺激な状態において既に発現している CD122(β鎖)および CD132(γ鎖)に加えて CD25(α鎖)を発現するようになり、3 つのサブユニットからなる高親和性 IL-2 受容体を形成するようになる(52)。IL-2 が高親和性 IL-2 受容体に結合すると、受容体に結合している JAK1 および JAK3 の活性化が誘導される。活性化 JAKs は STAT5 をリン酸化し、JAK-STAT 経路を活性化する。ところが、CD45 分子は JAK に直接会合し、活性化に必要な JAK のリン酸基を脱リン酸化することにより、JAK-STAT 経路を抑制している(34)。そこで、JAK ホスファターゼとしての CD45 分子の機能に対する 59.32 抗体の影響を検討した。若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を APC、抗 CD3 抗体で刺激した場合には、自身の産生する IL-2 のオートクライン作用により、JAK-STAT の活性化が認められるが、59.32 抗体共存下には JAK1 および STAT5 の活性化が抑制された(図 27B)。また、T 細胞が産生する IL-2 量の関与を除外するため、抗原刺激時に過剰量の IL-2 を添加した。この場合であっても、同様に 59.32 抗体は JAK1 および STAT5 の脱リン酸化を促進した。更に、IL-2 依存的に増殖する CTLL(cytotoxic T lymphocyte line)を用いて、IL-2 シグナルにおける抗体の影響を検討した(図 27C)。CTLL は IL-2 の量に依存して増殖する細胞株であり、IL-2 の添加により JAK1 および STAT5 のリン酸化が起こる。これに対して、59.32 抗体共存下に IL-2 で刺激した場合、JAK1 および STAT5 の脱リン酸化が促進されていることが判明した(図 27C)。これらの結果は、59.32 抗体が JAK ホスファターゼとしての CD45 分子の機能を増強していることを示している。

#### 4-9 59.32 抗体は FoxP3 の発現に影響を与えない

転写因子である FoxP3 の先天性な欠損は、免疫抑制性 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の発生不全に至る(53, 54)。また、FoxP3 は CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞に高発現しており、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞に FoxP3 遺伝子を異所的に発現させると、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞に抑制機能を付与する(23)。図 26 で示したように、59.32 抗体と I.11 抗体は CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の抑制機能を解除することから、これらの抗体が FoxP3 の発現を低下させ、結果として抑制機能解除に至っている可能性が考えられる。我々は 59.32 抗体処理の有無による CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の FoxP3 の発現をリアルタイム PCR にて検討した(図 28)。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を 59.32 抗体存在・非存在下に APC、抗 CD3 抗体、IL-2 で刺激し、Hprt に対する FoxP3 mRNA の相対的な発現を比較した。その結果、調製直後の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の FoxP3/Hprt は 6.39 であるのに対し、59.32 抗体共存下に刺激した細胞では 2.17、抗体非共存下の細胞では 2.42 であった。それゆえに、59.32 抗体が CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の FoxP3 の発現レベルを抑制している可能性は低いと考えられる。

#### 4-10 CD45 分子と IgG の融合タンパク質は老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の抑制機能を解除しない

59.32 抗体および I.11 抗体の作用は、リガンドから CD45 分子を介したシグナルを模倣している可能性がある。しかしながら、現在までに CD45 分子のリガンドは同定されてない(36)。我々もまた CD45 のリガンド分子を同定するため、59.32 抗体および I.11 抗体の認識に必要な CD45 の細胞外ドメインとヒト IgG1 の Fc 領域からなるリコンビナント融合タンパク質 (CD45-Ig) を作製した。この融合タンパク質は胸腺細胞や脾細胞およびそれらに T 細胞活性化刺激や B 細胞活性化刺激を加えた細胞を染色しなかった (data not shown)。また、活性化 T 細胞由来の培養上清において CD45-Ig で免疫沈降されるタンパク質を銀染色で検討したが、そのようなタンパク質は認められなかった。更に、老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞と若齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の共培養系に CD45-Ig を添加した (図 29)。CD45-Ig は CD45 とそのリガンドとの結合を阻害できると考えた。しかしながら、老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の抑制機能に影響は認められなかった。それゆえに、CD45 分子のリガンドが老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の抑制機能に影響を及ぼしている可能性は低いことが示唆された。また、このような培養条件において 59.32 抗体および I.11 抗体は老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の抑制機能を解除することから、両抗体は CD45 分子のリガンドとは異なる作用を有している可能性が示唆された。

#### 4-11 59.32 抗体および I.11 抗体の *in vivo* での作用

抗 CD45RB 抗体の MB23G2 は *in vivo* 投与により、腎移植片拒絶を遅延させる効果がある (55)。そのメカニズムとして、MB23G2 が T 細胞の活性化を抑制する分子 CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4) を誘導し、末梢の免疫寛容を誘導していることが示されている (56)。59.32 抗体および I.11 抗体は *in vitro* において老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞および CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の抑制機能を解除し (図 7)、若齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞に対して副刺激的に作用した (図 23A)。そこで、59.32 抗体および I.11 抗体の *in vivo* への投与は、抗原に対する T 細胞の応答性を増強するか否かを検討した。Complete Freund's Adjuvant (CFA) に懸濁した OVA 抗原を若齡および老齡 B6 マウスに免疫する際、59.32 抗体あるいは I.11 抗体を同時投与した。7 日後に所属リンパ節からリンパ球を回収すると、細胞の回収率は、抗体非投与群に比べて大幅に低下していることが判明した。[それぞれ  $21.2 \pm 14.7\%$  ( $n = 7$ ) および  $17.9 \pm 10.0\%$  ( $n = 6$ )]。これらの結果は、CFA に懸濁した OVA 免疫時に 59.32 抗体および I.11 抗体の投与は *in vivo* においてリンパ球を減らす作用があることを示している。

## 5. 考察

我々は老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の抑制機能を阻害する単クローン抗体 (59.32 および I.11) を樹立した。両抗体の認識分子は CD45 分子であり、老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の抑制機能の制御に CD45 分子が関与していることをはじめて明らかにした。重要なことに、既存の抗 CD45 抗体とはその認識部位が異なり、59.32 抗体および I.11 抗体のみに老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の抑制機能を解除する特性があった。このような両抗体による抑制機能解除には抑制する側の細胞に作用してその抑制機能を解除することが必要であることを示した。その一方で、抑制される側の細胞には培養後期の細胞増殖を著しく増強する作用を有することを明らかにした。更に、両抗体は老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞のみならず、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の抑制機能を解除することを示した。これら両抗体は Lck の活性化および JAK1 の脱リン酸化を促進する作用があることから、CD45 分子のチロシンホスファターゼ活性を増強していることが明らかとなった。

### 5-1 59.32 抗体および I.11 抗体による CD45 分子の制御

本研究において、他の抗 CD45 抗体と異なり、59.32 抗体と I.11 抗体のみが老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞および CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の抑制機能を解除すること、59.32 抗体と I.11 抗体は CD45 細胞外ドメインの特定領域を認識していることが明らかにされた。また、I.11 抗体による老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の抑制機能解除には、I.11 抗体の Fab では不十分であり、抗体による CD45 分子の架橋が抑制機能解除に必要であることを示した (図 21)。それでは、両抗体は CD45 分子のチロシンホスファターゼ機能をどのように制御しているのであろうか。Bilwes らは、受容体型チロシンホスファターゼファミリーに属する RPTP $\alpha$  (receptor-type protein tyrosinephosphatase) 分子の結晶構造に基づき、受容体型チロシンホスファターゼの制御機構モデルを提案している (57) (図 30)。RPTP $\alpha$  の N 末側のホスファターゼドメイン (D1) の結晶化の過程において RPTP $\alpha$  は 2 量体として結晶化され、その 2 量体構造は細胞膜直下の 2 つの  $\alpha$ -ヘリックス部分 (阻害性くさび領域と呼ばれる) が相手方となる RPTP $\alpha$  の活性中心部位に結合していた。このような 2 量体化構造ではホスファターゼの活性中心が塞がれているため、基質分子を脱リン酸化することはできないとされた。また、阻害性くさび領域は受容体型チロシンホスファターゼファミリーにおいて広く保存されていた。更に彼らは EGF (epidermal growth factor) が EGF 受容体の 2 量体化を誘導してお互いのチロシンキナーゼを活性化することをヒントに、受容体型チロシンホスファターゼの 2 量体化による制御機構を発展させ、リガンド分子が受容体型チロシンホスファターゼに結合することで受容体の 2 量体化が起き、その結果ホスファターゼ活性が負に制御されるであろうと提唱している (図 29)。また、この仮説は EGF 受容体の細胞外ドメインと CD45 細胞内ドメインのキメラ受容体の実験系においても立証され、EGF の添加により 2 量体化した CD45 ホスファターゼは T 細胞を活性化できないことも示されている (58-60)。

このような受容体型ホスファターゼの 2 量体化阻害モデルに反して、Nam らは CD45 分子に



においては RPTP  $\alpha$  に観察されたような D1 ドメインの 2 量体化は認められないことを報告している(61)。CD45 分子の D1 と D2 を含むホスファターゼ領域の結晶構造解析から D1 と D2 は強固に密着していることが判明した。このことから、D1 の阻害性くさび領域が相手方の活性中心位置に結合するような相互作用は、D2 ドメインの存在により起こらないであろうと推定された。また、同様な結論は受容体型チロシンホスファターゼファミリー分子の一つである LAR の結晶構造からも導き出されている(61, 62)。それゆえに、CD45 分子のホスファターゼに関しては、阻害性くさび領域により調節される 2 量体化阻害モデルによって説明できないのかもしれない。Bilwes らのモデルを採用した場合、59.32 抗体がホスファターゼ活性を増強するという結果(図 27)は、2 量体化によるホスファターゼ活性の不活性化を 59.32 抗体あるいは I.11 抗体が妨げたと考えられる。

CD45 ホスファターゼの機能制御に細胞内分子の関与も想定されている(36)。たとえば、基質分子との相互作用を促進する分子やホスファターゼ活性を促進する分子が同定されている(63-65)。Wu らは、CD45 の活性中心に基質結合型の変異を導入することによって、CD45 分子に結合する SKAP55 (Src kinase-associated phosphoprotein) を見出した。SKAP55 は、CD45 分子の基質分子とされている Fyn と CD45 分子に結合し、両者の結合を仲介することによって T 細胞の活性化を促進することが示唆されている。Takeda らは、CD45 分子と結合する分子として同定された CD45AP (CD45 associated protein) が単量体の CD45 分子と結合し、そのホスファターゼ活性を増強することを報告している。我々は、59.32 抗体共存下に CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を刺激した場合、T 細胞の活性化および Lck の活性化が促進されたことを示した(図 23A, 27A)。また、59.32 抗体および I.11 抗体の認識部位は、他の抗 CD45 抗体と認識する領域とは異なっており、59.32 抗体および I.11 抗体のみが老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の抑制機能を解除することを示した(図 14, 16)。それゆえに、59.32 抗体および I.11 抗体は CD45 分子と基質分子の相互作用を促進している可能性や、CD45 分子のホスファターゼ活性を増強する分子との結合を促進している可能性が考えられる。

## 5-2 抑制機能解除と 59.32 抗体の副刺激能

T 細胞に発現する受容体の中で副刺激能を有する分子がいくつか報告されており、これらの分子は大きく二つのグループに分類される。一つは CD28 や ICOS (inducible T-cell co-stimulator) のようなイムノグロブリンスーパーファミリーであり、もう一つは 4-1BB, OX-40, GITR などを含む TNF 受容体スーパーファミリーである。これらの分子群の中で、免疫抑制性 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の抑制機能の解除に関わる分子として最初に報告されたのは CD28 分子である。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞と応答細胞を 1:1 に混合し、CD28 に対するアゴニスティック抗体共存下に刺激すると、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の抑制機能が解除され、応答細胞の細胞増殖が回復した(3)。近年、T 細胞の増殖を増強する 4-1BB, OX-40, GITR のアゴニスティック抗体もまた CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の抑制機能を解除することが報告されている(45, 66, 67)。これらの抗体が CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞に対してどのようなシグナルを導入することが、その抑制機能の解除に至る

のかは未だ明らかにされていない。その一方で、副刺激を導入するこれらの抗体は、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞に対して共通のシグナル経路を活性化する(68)。たとえば、CD28, 4-1BB, OX-40, GITR に対するいずれのアゴニスティック抗体も、PI3K-AKT 経路を介して転写因子である NF- $\kappa$ B, AP-1 の活性化を促進する。その結果、T 細胞の増殖因子である IL-2 の産生を高め、T 細胞増殖を促進する。CD45 分子はこれらの副刺激分子のファミリーには属さない一方で、59.32 抗体や I.11 抗体による CD45 の制御は若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の増殖を増強し(図 18, 23A)、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の抑制機能を解除し得た(図 26)。それゆえに、59.32 抗体や I.11 抗体は、上記のアゴニスティック抗体と共通のシグナル伝達経路を活性化するアゴニスティックな作用を有するのかもしれない。

### 5-3 59.32 抗体および I.11 抗体が認識する CD45 のアイソフォームと抑制機能解除

CD45 分子は選択的スプライシングされるエクソン(4~6)を有しており、細胞の発生段階および分化段階に応じて様々な CD45 アイソフォームが形成される(36)。59.32 抗体および I.11 抗体は CD45 分子のいずれのアイソフォームも認識したことから(図 8, 10)、どの CD45 アイソフォームへの作用が老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞および CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の抑制機能解除を誘導するのが重要な問題となる。図 19 で示したように、CD45RABC を発現する APC を 59.32 抗体で前処理しても、老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の抑制機能に影響を与えなかった。このことは、若齢および老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞上で発現している CD45RO および CD45RB のどちらかが 59.32 抗体の標的としてより重要であることを示唆している。また、CD45RB は若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞で高発現しており、CD45RO は老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞および CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞で高発現していることが知られている(69, 70)。図 19, 26B で示したように、抑制機能解除には老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞や CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞に 59.32 抗体が作用することが必要十分であることを示した。それゆえに、CD45RO への作用が抑制機能解除により本質的であったと考えられる。更に、高濃度の抗 CD45RB 抗体(MB4B4)を用いて CD45RB 分子を架橋した場合、59.32 抗体および I.11 抗体は老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の抑制機能を解除した。この場合、59.32 抗体や I.11 抗体は CD45RB には結合することは可能であるが、MB4B4 抗体による CD45RB の 2 量体化が 59.32 抗体や I.11 抗体による CD45RB の 2 量体化よりも高頻度に起きていることが考えられる。我々は I.11 抗体による 2 量体化が抑制機能解除には必要であることも示した(図 21)。従って、59.32 抗体はすべての CD45 アイソフォームを認識するものの、抑制機能解除には CD45RO に対して作用を及ぼすことが重要であると考えられる。

59.32 抗体は CD45RB を高発現している若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞に副刺激様の作用を有することも示した。すなわち、59.32 抗体は Lck の活性化、IL-2 の持続的な産生およびそれらに由来する T 細胞の著しい増殖反応を誘導していた(図 27A, 24, 23A)。抗原刺激以前には若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞は CD45RB アイソフォームを発現しているが、活性化に伴い CD45RO を発現するようになることが知られている(70)。我々は、副刺激様の作用を誘導する場合において、59.32 抗体および I.11 抗体は CD45RO, CD45RB のどちらのアイソフォームに作用すること

が重要であるのかを示すことができなかった。この点については今後の課題とすべきである。

#### 5-4 59.32 抗体および I.11 抗体による Lck の活性化

Lck は主に T 細胞に発現する Src ファミリーチロシンキナーゼの一つであり、TCR からのシグナル伝達に重要な役割を担っている。TCR を介したペプチド/MHC 複合体からの刺激は Lck を活性化し、活性化 Lck は TCR に結合している CD3 複合体(CD3 $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ )および CD3 $\zeta$ 鎖をリン酸化し、その結果、ZAP70 のリクルートおよび活性化を誘導する。これらの初期シグナルは IL-2 産生に至るさまざまなシグナル経路を活性化させ、最終的には T 細胞増殖へと導く。APC と抗 CD3 抗体で若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を刺激した場合に対し、59.32 抗体共存下に同様な刺激を与えた場合には、より強い Lck の活性化、IL-2 の持続的な産生、培養後期における細胞増殖の増強が認められた(図 27A, 24, 23A)。また、恒常的活性化型 Lck (Y505F)を T 細胞ハイブリドーマに発現させると TCR 刺激後の IL-2 産生が増強することが報告されている(71, 72)。更に、CD45 分子は Lck の 505 番目のリン酸化チロシンのチロシンホスファターゼであることが示唆されている(33, 49)。これらの結果は、59.32 抗体による CD45 分子ホスファターゼ活性の増強により、Lck を負に制御するチロシン残基(Y505)が脱リン酸化され易くなり、抗 TCR を介した刺激による Lck の活性化が増強されたと考えられる。

Lck は副刺激分子の一つである CD28 分子のシグナル伝達においても重要な役割を果たしている。たとえば、CD28 のシグナル経路は Lck, PI3K, TEC, ITK を介して最終的に c-fos 遺伝子の転写に至る。Lck の結合部位を欠損する CD28 強制発現 T 細胞株は、アゴニスティック抗 CD28 抗体による c-fos レポータープラスミドの発現を抑制した(73)。このような変異 CD28 を発現する T 細胞は TCR 非依存的な刺激[PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate), 抗 CD28 抗体刺激]に対しても活性化せず、CD28 と Lck の結合は CD28 シグナル伝達に必須であることが示された。また、CD28 シグナルを増強するアゴニスティック抗体は、より少ない濃度の抗 CD3 抗体の刺激でも T 細胞を活性化できることから、このような副刺激は TCR シグナルの閾値を下げるように働くと考えられている(74)。図 18 に示されたように、59.32 抗体は低濃度の抗 CD3 抗体刺激時の細胞増殖を増強し、弱い TCR シグナルの場合であっても T 細胞を活性化した。この結果は、59.32 抗体による CD45 分子のホスファターゼ機能の増強が Lck をより活性化し易い状態に保ち、その結果、CD28 分子のシグナル伝達を増強めた可能性を示唆している。CD28 に対するアゴニスティック抗体は CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の抑制機能を解除することから(3)、両抗体はに CD28 シグナルを増強することによって抑制機能解除を促進した可能性がある。

#### 5-5 59.32 抗体および I.11 抗体と JAK-STAT 経路

IL-2 受容体自身は酵素活性を持たないものの、リガンド誘導性の IL-2 受容体のヘテロ複合体( $\beta$ 鎖,  $\gamma$ 鎖,  $\alpha$ 鎖)化は、受容体と結合する JAKs, Lck, Shc, Syk シグナル分子を活性化させる。これらの初期シグナルは phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) および Ras-mitogen-activated protein kinase (MAPK) の活性化に加え、STAT5 の活性化に至り、最終的には細胞周期進行

や生存に必須の遺伝子の転写に至る。図 27B, C で示したように、59.32 抗体は JAK1 および STAT5 の脱リン酸化を促進していたのに対して、JAK1 および STAT5 のリン酸化を完全に阻害することはなかった。また、59.32 抗体の添加は、抗原刺激による若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞増殖を阻害することではなく、59.32 抗体により誘導された IL-2 によって培養後期の細胞増殖が増強された(図 23)。従って、59.32 抗体は JAK-STAT 経路を負に制御する CD45 分子のホスファターゼ機能を増強するが、JAK-STAT 経路を完全には遮断せず、IL-2 による T 細胞の増殖に対して負の影響は与えなかったのであろうと考えられる。

それでは、59.32 抗体が JAK ホスファターゼの機能を増強することにはどのような意味があるのだろうか。一つは、IL-2 によるネガティブフィードバックを制御している可能性がある(75)。たとえば、STAT5 の標的遺伝子にはサイトカインシグナルを負に制御する SOCS ファミリーがある(76-78)。これらの分子は、活性化に伴い発現し、サイトカインシグナルに対して抑制的に働く。59.32 抗体は JAK1 の脱リン酸化を促進することによって JAK-STAT 経路を制御し、SOCS ファミリーの発現を遅らせることによって持続的な細胞増殖を誘導しているのかもしれない。

#### 5-6 IL-2 mRNA の発現調節に関わる分子機構

T 細胞増殖因子の一つである IL-2 は、ヘルパー T (Th)細胞の初期応答時に産生される主なサイトカインである。IL-2 mRNA の発現は翻訳後修飾により制御されるという報告もある(79)が、転写因子レベルで厳密に制御されている。IL-2 遺伝子の精力的な解析により、転写開始点から-300 塩基対の最小プロモーター領域(つまり、T 細胞の活性化刺激に対し、IL-2 の誘導に十分である領域)が同定されている。多くのシスエレメントがこの領域内に同定されており、抗原刺激により活性化される NFATs, OCT-1, AP-1, HMG(I)Y, NF- $\kappa$ B ファミリーがこの領域に結合することが報告されている(80, 81)。また、これら分子のうちいくつかは *in vivo* における IL-2 の発現に必要であることが示されている(82, 83)。そのうち、NF- $\kappa$ B ファミリーは、p65, c-rel, RelB, p105/p50, p100/p52 の 5 つのメンバーから構成され、これらのヘテロもしくはホモ 2 量体により、NF- $\kappa$ B 複合体が形成される。NF- $\kappa$ B ファミリーの p50 は未刺激 T 細胞の IL-2 プロモーター上でホモ 2 量体を形成しているが、T 細胞の活性化に伴い転写活性化ドメインを持つ p65 とのヘテロ 2 量体へ置換される(84)。また、抗 CD2 抗体や抗 CD28 抗体で刺激した T 細胞では抗 CD3 抗体で刺激した細胞よりも p65 の核への局在が認められ(85, 86)、クロマチン再構築因子を IL-2 プロモーターにリクルートすることが知られている(87)。59.32 抗体共存下に抗原刺激した場合、抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体で認められるような IL-2 mRNA の持続的な転写および安定化を誘導していた(図 24)。それゆえに、抗 CD28 抗体による刺激と同様、p65 の核内への長期の局在が、IL-2 プロモーター領域にクロマチン再構築因子含む転写促進因子の局在を助長し、結果、IL-2 の持続的な転写に至っているのかもしれない。

#### 5-7 59.32 抗体および I.11 抗体の *In vivo* における検討

59.32 抗体および I.11 抗体は免疫抑制性 CD4<sup>+</sup>T 細胞の抑制機能を解除することや若齢

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の増殖を増強することから、*in vivo*においてさまざまな免疫応答を強化することができることが考えられる。4-11 で述べたように、CFA アジュバントに懸濁した OVA 抗原を若齢マウスに免疫する際、59.32 抗体を同時投与した場合には、免疫後 7 日目における所属リンパ節 T 細胞の回収率が著しく減少した。CFA による強いアジュバント効果と 59.32 抗体がそのような細胞を除去する作用をもたらしたのかもしれない。それゆえに、他の弱いアジュバントを選択することによってそのような T 細胞の回収率の低下を回避できる可能性が考えられる。

腫瘍細胞が発現する抗原は自己の抗原と非常に類似しており、腫瘍に対する免疫応答が誘導されにくいことが知られている。この原因として CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞が腫瘍を認識する抗腫瘍エフェクター T 細胞の活性化および分化を抑制し、腫瘍細胞に対する免疫寛容を誘導していることが挙げられる。たとえば、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を除去した脾細胞を同系ヌードマウスに移入し、その後同系マウス由来の自己の腫瘍を接種した場合、そのマウスは腫瘍の拡大を抑え、1 ヶ月以内にその腫瘍を完全に拒絶する。それに対して、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を除去せずに全脾細胞を移入した後、自家腫瘍の接種を行うと、腫瘍の侵攻により 40 日以内にほとんどのマウスが死に至る(5)。また、*in vivo*において CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞数を減少させる抗 CD25 単クローン抗体の投与もまた腫瘍に対する効率的な免疫応答を誘導する(5, 88)。更に、このような免疫抑制性 CD4T 細胞の数の制御に加え、その抑制機能を解除するような抗体もまた、腫瘍に対する免疫応答を効率的に活性化する(89)。59.32 抗体および I.11 抗体は、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の抑制機能を解除し、且つ CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の増殖を増強することから、両抗体は免疫抑制性 CD4T 細胞の抑制機能解除によって効率的な腫瘍特異的免疫応答を惹起できる可能性がある。

このような自家腫瘍に対する免疫応答のみならず、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を除去させることにより、病原体に対する効率的な免疫応答を惹起させる試みがなされている。たとえば、マウスリーシュマニア感染では、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞がリーシュマニア感染局所における慢性感染およびメモリー T 細胞を維持するのに必要であることが報告されている(90)。また、リーシュマニアの再燃には環境因子や加齢により CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞とエフェクター T 細胞のバランスの破綻が関与し、免疫抑制性 CD4T 細胞の増加や機能亢進が関与していることが示唆されている(91)。マウスマalaria感染モデルでは、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を除去する作用のある抗 CD25 抗体をマalaria感染前に投与した場合、マalaria原虫 (*plasmodium yoelii*) により引き起こされる致死的な感染の拡大を回避し、感染したマalaria原虫を完全に排除できることが示されている(6)。HSV (herpes simplex virus) 感染においては、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を除去することはウイルスに対する CD8T 細胞応答の増強につながることが示されている(92)。このように、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の除去はこれらの感染症に対する抵抗性を強化する。59.32 抗体および I.11 抗体が上記の感染症に対する免疫応答を強化できるかどうかを検討することにより、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の数の制御だけではなく、機能的制御もまた感染症に対する有効な治療法であると証明できるであろう。

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を除去する作用のある、あるいはその抑制機能を解除する抗体が、*in vivo*において抗原特異的な T 細胞の活性化を誘導するのに対して、T 細胞を活性化させる抗

CD28 抗体の投与は逆に末梢における T 細胞死を誘導し、宿主に対する免疫応答の結果として起こる移植片対宿主病 (GVHD) の発症を抑制することは注目に値する(93)。たとえば、致死的な放射線照射を与えた B10.BR マウスに B6 マウス由来の骨髄および脾細胞を移植すると、移植した T 細胞が宿主の細胞を攻撃し、すべてのマウスが 2 ヶ月以内に GVHD を引き起こして死滅する。しかしながら、アゴニスティック抗 CD28 抗体を投与すると、致死的な免疫応答が回避され、およそ 60% のマウスが生存することが報告されている。Xue らは、このような抗 CD28 抗体の作用はアロ抗原を認識した活性化 T 細胞に対して抗 CD28 抗体がアポトーシスを引き起こすためであろうと解釈している(94)。59.32 抗体および I.11 抗体がこのような病態に対してアゴニスティック抗 CD28 抗体と同じ作用を持つか否かは検討すべき課題であると考えられる。

加齢に伴う免疫系の機能低下は感染症に対する高齢者の罹患率や死亡率の上昇を引き起こすと考えられている。高齢者の免疫系に認められる最も顕著な変化はワクチン効果の低減である。ヒトにおける研究では肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、インフルエンザ、B 型肝炎、破傷風毒素のワクチンを接種した場合、それぞれの抗原に対する抗体の産生量が加齢と共に著しく低下することが示されている(95-98)。このような問題点から、免疫機能の低下を改善するさまざまな試みがなされている。たとえば、CD43 分子は T 細胞の細胞膜上に発現されている主な糖タンパク質であるが、このタンパク質の糖鎖を切断することは T 細胞の応答性の改善につながると考えられている(99)。また、老齢マウスにおいて抗 CD4 抗体により機能低下した T 細胞を除去すると、その後正常応答性 T 細胞が新たに出現し、老齢時の免疫応答に回復が認められると報告されている(100)。また、強い副刺激作用のある 4-1BB 分子のアゴニスティック抗体は老齢 T 細胞の増殖をも強化し、低応答性を改善することが示されている(101)。59.32 抗体および I.11 抗体を老齢マウスへの単独投与、あるいは上記のいずれかの手法と組み合わせることが、老齢時にみられる免疫系の機能低下を改善できる新たな手法につながると期待される。これらは今後の大きな課題の一つである。

## 6.参考文献

1. Shevach, E.M. 2000. Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 18:423-449.
2. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155:1151-1164.
3. Takahashi, T., Y. Kuniyasu, M. Toda, N. Sakaguchi, M. Itoh, M. Iwata, J. Shimizu, and S. Sakaguchi. 1998. Immunologic self-tolerance maintained by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 10:1969-1980.
4. Thornton, A.M., and E.M. Shevach. 1998. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188:287-296.
5. Shimizu, J., S. Yamazaki, and S. Sakaguchi. 1999. Induction of tumor immunity by removing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 163:5211-5218.
6. Hisaeda, H., Y. Maekawa, D. Iwakawa, H. Okada, K. Himeno, K. Kishihara, S. Tsukumo, and K. Yasutomo. 2004. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Med* 10:29-30.
7. Shimizu, J., and E. Moriizumi. 2003. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells in aged mice are hyporesponsive and exhibit suppressive activity. *J Immunol* 170:1675-1682.
8. Shimizu, J., and E. Moriizumi. 2003. Aging-dependent generation of suppressive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>R123<sup>lo</sup>CD103<sup>+</sup> T cells in mice. *Eur J Immunol* 33:2449-2458.
9. Nishizuka, Y., and T. Sakakura. 1969. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* 166:753-755.
10. Greiner, D.L., J.P. Mordes, E.S. Handler, M. Angelillo, N. Nakamura, and A.A. Rossini. 1987. Depletion of RT6.1<sup>+</sup> T lymphocytes induces diabetes in resistant biobreeding/Worcester (BB/W) rats. *J Exp Med* 166:461-475.
11. Boitard, C., R. Yasunami, M. Dardenne, and J.F. Bach. 1989. T cell-mediated inhibition of the transfer of autoimmune diabetes in NOD mice. *J Exp Med* 169:1669-1680.
12. Sakaguchi, S., K. Fukuma, K. Kuribayashi, and T. Masuda. 1985. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for

- the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med* 161:72-87.
13. Powrie, F., and D. Mason. 1990. OX-22high CD4<sup>+</sup> T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset. *J Exp Med* 172:1701-1708.
  14. Morrissey, P.J., K. Charrier, S. Braddy, D. Liggitt, and J.D. Watson. 1993. CD4<sup>+</sup> T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med* 178:237-244.
  15. Tarbell, K.V., S. Yamazaki, K. Olson, P. Toy, and R.M. Steinman. 2004. CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 199:1467-1477.
  16. Gavin, M.A., S.R. Clarke, E. Negrou, A. Gallegos, and A. Rudensky. 2002. Homeostasis and anergy of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol* 3:33-41.
  17. McHugh, R.S., M.J. Whitters, C.A. Piccirillo, D.A. Young, E.M. Shevach, M. Collins, and M.C. Byrne. 2002. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16:311-323.
  18. Itoh, M., T. Takahashi, N. Sakaguchi, Y. Kuniyasu, J. Shimizu, F. Otsuka, and S. Sakaguchi. 1999. Thymus and autoimmunity: production of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 162:5317-5326.
  19. Jordan, M.S., A. Boesteanu, A.J. Reed, A.L. Petrone, A.E. Hohenbeck, M.A. Lerman, A. Naji, and A.J. Caton. 2001. Thymic selection of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2:301-306.
  20. Brunkow, M.E., E.W. Jeffery, K.A. Hjerrild, B. Paepfer, L.B. Clark, S.A. Yasayko, J.E. Wilkinson, D. Galas, S.F. Ziegler, and F. Ramsdell. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27:68-73.
  21. Wildin, R.S., F. Ramsdell, J. Peake, F. Faravelli, J.L. Casanova, N. Buist, E. Levy-Lahad, M. Mazzella, O. Goulet, L. Perroni, F.D. Bricarelli, G. Byrne, M. McEuen, S. Proll, M. Appleby, and M.E. Brunkow. 2001. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 27:18-20.
  22. 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. 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27:20-21.
23. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061.
  24. Lehmann, J., J. Huehn, M. de la Rosa, F. Maszyrna, U. Kretschmer, V. Krenn, M. Brunner, A. Scheffold, and A. Hamann. 2002. Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25<sup>+</sup> as well as CD25<sup>-</sup> regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:13031-13036.
  25. Huehn, J., K. Siegmund, J.C. Lehmann, C. Siewert, U. Haubold, M. Feuerer, G.F. Debes, J. Lauber, O. Frey, G.K. Przybylski, U. Niesner, M. de la Rosa, C.A. Schmidt, R. Brauer, J. Buer, A. Scheffold, and A. Hamann. 2004. Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive<sup>-</sup> and effector/memory-like CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Exp Med* 199:303-313.
  26. Apostolou, I., A. Sarukhan, L. Klein, and H. von Boehmer. 2002. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol* 3:756-763.
  27. Miller, R.A. 1996. The aging immune system: primer and prospectus. *Science* 273:70-74.
  28. Okumura, M., R.J. Matthews, B. Robb, G.W. Litman, P. Bork, and M.L. Thomas. 1996. Comparison of CD45 extracellular domain sequences from divergent vertebrate species suggests the conservation of three fibronectin type III domains. *J Immunol* 157:1569-1575.
  29. SgROI, D., A. Varki, S. Braesch-Andersen, and I. Stamenkovic. 1993. CD22, a B cell-specific immunoglobulin superfamily member, is a sialic acid-binding lectin. *J Biol Chem* 268:7011-7018.
  30. Perillo, N.L., K.E. Pace, J.J. Seilhamer, and L.G. Baum. 1995. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 378:736-739.
  31. Pingel, J.T., and M.L. Thomas. 1989. Evidence that the leukocyte-common antigen is required for antigen-induced T lymphocyte proliferation. *Cell* 58:1055-1065.
  32. Kishihara, K., J. Penninger, V.A. Wallace, T.M. Kundig, K. Kawai, A. Wakeham, E. Timms, K. Pfeffer, P.S. Ohashi, M.L. Thomas, and et al. 1993. Normal B lymphocyte development but impaired T cell maturation in CD45-exon6 protein tyrosine phosphatase-deficient mice. *Cell* 74:143-156.
  33. Seavitt, J.R., L.S. White, K.M. Murphy, D.Y. Loh, R.M. Perlmutter, and M.L. Thomas. 1999. Expression of the p56<sup>lck</sup> Y505F mutation in CD45-deficient mice rescues thymocyte development. *Mol Cell Biol* 19:4200-4208.

34. Irie-Sasaki, J., T. Sasaki, W. Matsumoto, A. Opavsky, M. Cheng, G. Welstead, E. Griffiths, C. Krawczyk, C.D. Richardson, K. Aitken, N. Iscove, G. Koretzky, P. Johnson, P. Liu, D.M. Rothstein, and J.M. Penninger. 2001. CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature* 409:349-354.
35. Yamada, T., D. Zhu, A. Saxon, and K. Zhang. 2002. CD45 controls interleukin-4-mediated IgE class switch recombination in human B cells through its function as a Janus kinase phosphatase. *J Biol Chem* 277:28830-28835.
36. Hermiston, M.L., Z. Xu, and A. Weiss. 2003. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol* 21:107-137.
37. Lesage, S., A.M. Steff, F. Philippoussis, M. Page, S. Trop, V. Mateo, and P. Hugo. 1997. CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> thymocytes are preferentially induced to die following CD45 cross-linking, through a novel apoptotic pathway. *J Immunol* 159:4762-4771.
38. Fortin, M., A.M. Steff, J. Felberg, I. Ding, B. Schraven, P. Johnson, and P. Hugo. 2002. Apoptosis mediated through CD45 is independent of its phosphatase activity and association with leukocyte phosphatase-associated phosphoprotein. *J Immunol* 168:6084-6089.
39. Harding, F.A., J.G. McArthur, J.A. Gross, D.H. Raulet, and J.P. Allison. 1992. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 356:607-609.
40. Tan, P., C. Anasetti, J.A. Hansen, J. Melrose, M. Brunvand, J. Bradshaw, J.A. Ledbetter, and P.S. Linsley. 1993. Induction of alloantigen-specific hyporesponsiveness in human T lymphocytes by blocking interaction of CD28 with its natural ligand B7/BB1. *J Exp Med* 177:165-173.
41. Lindstein, T., C.H. June, J.A. Ledbetter, G. Stella, and C.B. Thompson. 1989. Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. *Science* 244:339-343.
42. Kato, T., and H. Nariuchi. 2000. Polarization of naive CD4<sup>+</sup> T cells toward the Th1 subset by CTLA-4 costimulation. *J Immunol* 164:3554-3562.
43. Rogers, P.R., and M. Croft. 2000. CD28, Ox-40, LFA-1, and CD4 modulation of Th1/Th2 differentiation is directly dependent on the dose of antigen. *J Immunol* 164:2955-2963.
44. Shuford, W.W., K. Klussman, D.D. Tritchler, D.T. Loo, J. Chalupny, A.W. Siadak, T.J. Brown, J. Emswiler, H. Raecho, C.P. Larsen, T.C. Pearson, J.A. Ledbetter, A. Aruffo, and R.S. Mittler. 1997. 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8<sup>+</sup> T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. *J*

- Exp Med* 186:47-55.
45. Shimizu, J., S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida, and S. Sakaguchi. 2002. Stimulation of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 3:135-142.
  46. Stone, J.D., L.A. Conroy, K.F. Byth, R.A. Hederer, S. Howlett, Y. Takemoto, N. Holmes, and D.R. Alexander. 1997. Aberrant TCR-mediated signaling in CD45-null thymocytes involves dysfunctional regulation of Lck, Fyn, TCR-zeta, and ZAP-70. *J Immunol* 158:5773-5782.
  47. Sieh, M., J.B. Bolen, and A. Weiss. 1993. CD45 specifically modulates binding of Lck to a phosphopeptide encompassing the negative regulatory tyrosine of Lck. *Embo J* 12:315-321.
  48. Cahir McFarland, E.D., T.R. Hurley, J.T. Pingel, B.M. Sefton, A. Shaw, and M.L. Thomas. 1993. Correlation between Src family member regulation by the protein-tyrosine-phosphatase CD45 and transmembrane signaling through the T-cell receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1402-1406.
  49. Pingel, S., M. Baker, M. Turner, N. Holmes, and D.R. Alexander. 1999. The CD45 tyrosine phosphatase regulates CD3-induced signal transduction and T cell development in recombinase-deficient mice: restoration of pre-TCR function by active p56<sup>lck</sup>. *Eur J Immunol* 29:2376-2384.
  50. Schroder, A.J., P. Quehl, J. Muller, and Y. Samstag. 2000. Conversion of p56<sup>lck</sup> to p60<sup>lck</sup> in human peripheral blood T lymphocytes is dependent on co-stimulation through accessory receptors: involvement of phospholipase C, protein kinase C and MAP-kinases in vivo. *Eur J Immunol* 30:635-643.
  51. Winkler, D.G., I. Park, T. Kim, N.S. Payne, C.T. Walsh, J.L. Strominger, and J. Shin. 1993. Phosphorylation of Ser-42 and Ser-59 in the N-terminal region of the tyrosine kinase p56<sup>lck</sup>. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5176-5180.
  52. Theze, J., P.M. Alzari, and J. Bertoglio. 1996. Interleukin 2 and its receptors: recent advances and new immunological functions. *Immunol Today* 17:481-486.
  53. Khattri, R., T. Cox, S.A. Yasayko, and F. Ramsdell. 2003. An essential role for Scurfin in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells. *Nat Immunol* 4:337-342.
  54. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:330-336.
  55. Lazarovits, A.I., S. Poppema, Z. Zhang, M. Khandaker, C.E. Le Feuvre, S.K. Singhal, B.M. Garcia, N. Ogasa, A.M. Jevnikar, M.H. White, G. Singh, C.R. Stiller, and R.Z. Zhong. 1996. Prevention and reversal of renal allograft rejection by antibody against CD45RB. *Nature* 380:717-720.

56. Fecteau, S., G.P. Basadonna, A. Freitas, C. Ariyan, M.H. Sayegh, and D.M. Rothstein. 2001. CTLA-4 up-regulation plays a role in tolerance mediated by CD45. *Nat Immunol* 2:58-63.
57. Bilwes, A.M., J. den Hertog, T. Hunter, and J.P. Noel. 1996. Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase-alpha by dimerization. *Nature* 382:555-559.
58. Jiang, G., J. den Hertog, J. Su, J. Noel, J. Sap, and T. Hunter. 1999. Dimerization inhibits the activity of receptor-like protein-tyrosine phosphatase-alpha. *Nature* 401:606-610.
59. Majeti, R., A.M. Bilwes, J.P. Noel, T. Hunter, and A. Weiss. 1998. Dimerization-induced inhibition of receptor protein tyrosine phosphatase function through an inhibitory wedge. *Science* 279:88-91.
60. Majeti, R., Z. Xu, T.G. Parslow, J.L. Olson, D.I. Daikh, N. Killeen, and A. Weiss. 2000. An inactivating point mutation in the inhibitory wedge of CD45 causes lymphoproliferation and autoimmunity. *Cell* 103:1059-1070.
61. Nam, H.J., F. Poy, H. Saito, and C.A. Frederick. 2005. Structural basis for the function and regulation of the receptor protein tyrosine phosphatase CD45. *J Exp Med* 201:441-452.
62. Nam, H.J., F. Poy, N.X. Krueger, H. Saito, and C.A. Frederick. 1999. Crystal structure of the tandem phosphatase domains of RPTP LAR. *Cell* 97:449-457.
63. Wu, L., J. Fu, and S.H. Shen. 2002. SKAP55 coupled with CD45 positively regulates T-cell receptor-mediated gene transcription. *Mol Cell Biol* 22:2673-2686.
64. Takeda, A., A. Matsuda, R.M. Paul, and N.R. Yaseen. 2004. CD45-associated protein inhibits CD45 dimerization and up-regulates its protein tyrosine phosphatase activity. *Blood* 103:3440-3447.
65. Lokeshwar, V.B., and L.Y. Bourguignon. 1992. The lymphoma transmembrane glycoprotein GP85 (CD44) is a novel guanine nucleotide-binding protein which regulates GP85 (CD44)-ankyrin interaction. *J Biol Chem* 267:22073-22078.
66. Choi, B.K., J.S. Bae, E.M. Choi, W.J. Kang, S. Sakaguchi, D.S. Vinay, and B.S. Kwon. 2004. 4-1BB-dependent inhibition of immunosuppression by activated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *J Leukoc Biol* 75:785-791.
67. Valzasina, B., C. Guiducci, H. Dislich, N. Killeen, A.D. Weinberg, and M.P. Colombo. 2005. Triggering of OX40 (CD134) on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells blocks their inhibitory activity: a novel regulatory role for OX40 and its comparison with GITR. *Blood* 105:2845-2851.
68. Croft, M. 2003. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell

immunity? *Nat Rev Immunol* 3:609-620.

69. Ernst, D.N., W.O. Weigle, D.N. McQuitty, A.L. Rothermel, and M.V. Hobbs. 1989. Stimulation of murine T cell subsets with anti-CD3 antibody. Age-related defects in the expression of early activation molecules. *J Immunol* 142:1413-1421.
70. Dieckmann, D., H. Plottner, S. Berchtold, T. Berger, and G. Schuler. 2001. Ex vivo isolation and characterization of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 193:1303-1310.
71. Abraham, N., M.C. Miceli, J.R. Parnes, and A. Veillette. 1991. Enhancement of T-cell responsiveness by the lymphocyte-specific tyrosine protein kinase p56<sup>lck</sup>. *Nature* 350:62-66.
72. Luo, K., and B.M. Sefton. 1992. Activated lck tyrosine protein kinase stimulates antigen-independent interleukin-2 production in T cells. *Mol Cell Biol* 12:4724-4732.
73. Holdorf, A.D., J.M. Green, S.D. Levin, M.F. Denny, D.B. Straus, V. Link, P.S. Changelian, P.M. Allen, and A.S. Shaw. 1999. Proline residues in CD28 and the Src homology (SH)3 domain of Lck are required for T cell costimulation. *J Exp Med* 190:375-384.
74. Viola, A., and A. Lanzavecchia. 1996. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* 273:104-106.
75. Yoshimura, A., T. Ohkubo, T. Kiguchi, N.A. Jenkins, D.J. Gilbert, N.G. Copeland, T. Hara, and A. Miyajima. 1995. A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *Embo J* 14:2816-2826.
76. Matsumoto, A., M. Masuhara, K. Mitsui, M. Yokouchi, M. Ohtsubo, H. Misawa, A. Miyajima, and A. Yoshimura. 1997. CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. *Blood* 89:3148-3154.
77. Verdier, F., R. Rabionet, F. Gouilleux, C. Beisenherz-Huss, P. Varlet, O. Muller, P. Mayeux, C. Lacombe, S. Gisselbrecht, and S. Chretien. 1998. A sequence of the CIS gene promoter interacts preferentially with two associated STAT5A dimers: a distinct biochemical difference between STAT5A and STAT5B. *Mol Cell Biol* 18:5852-5860.
78. Alexander, W.S., and D.J. Hilton. 2004. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol* 22:503-529.
79. Ragheb, J.A., M. Deen, and R.H. Schwartz. 1999. CD28-Mediated regulation of mRNA stability requires sequences within the coding region of the IL-2 mRNA. *J Immunol* 163:120-129.

80. Powell, J.D., J.A. Ragheb, S. Kitagawa-Sakakida, and R.H. Schwartz. 1998. Molecular regulation of interleukin-2 expression by CD28 co-stimulation and anergy. *Immunol Rev* 165:287-300.
81. Jain, J., C. Loh, and A. Rao. 1995. Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr Opin Immunol* 7:333-342.
82. Peng, S.L., A.J. Gerth, A.M. Ranger, and L.H. Glimcher. 2001. NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation. *Immunity* 14:13-20.
83. Kontgen, F., R.J. Grumont, A. Strasser, D. Metcalf, R. Li, D. Tarlinton, and S. Gerondakis. 1995. Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression. *Genes Dev* 9:1965-1977.
84. Kang, S.M., A.C. Tran, M. Grilli, and M.J. Lenardo. 1992. NF-kappa B subunit regulation in nontransformed CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *Science* 256:1452-1456.
85. Lederer, J.A., J.S. Liou, M.D. Todd, L.H. Glimcher, and A.H. Lichtman. 1994. Regulation of cytokine gene expression in T helper cell subsets. *J Immunol* 152:77-86.
86. Lederer, J.A., J.S. Liou, S. Kim, N. Rice, and A.H. Lichtman. 1996. Regulation of NF-kappa B activation in T helper 1 and T helper 2 cells. *J Immunol* 156:56-63.
87. Sheppard, K.A., D.W. Rose, Z.K. Haque, R. Kurokawa, E. McInerney, S. Westin, D. Thanos, M.G. Rosenfeld, C.K. Glass, and T. Collins. 1999. Transcriptional activation by NF-kappaB requires multiple coactivators. *Mol Cell Biol* 19:6367-6378.
88. Onizuka, S., I. Tawara, J. Shimizu, S. Sakaguchi, T. Fujita, and E. Nakayama. 1999. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res* 59:3128-3133.
89. Ko, K., S. Yamazaki, K. Nakamura, T. Nishioka, K. Hirota, T. Yamaguchi, J. Shimizu, T. Nomura, T. Chiba, and S. Sakaguchi. 2005. Treatment of advanced tumors with agonistic anti-GITR mAb and its effects on tumor-infiltrating Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Exp Med* 202:885-891.
90. Belkaid, Y., C.A. Piccirillo, S. Mendez, E.M. Shevach, and D.L. Sacks. 2002. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. *Nature* 420:502-507.
91. Mendez, S., S.K. Reckling, C.A. Piccirillo, D. Sacks, and Y. Belkaid. 2004. Role for CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *J Exp Med* 200:201-210.
92. Suvas, S., U. Kumaraguru, C.D. Pack, S. Lee, and B.T. Rouse. 2003. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells regulate virus-specific primary and memory CD8<sup>+</sup> T cell responses. *J Exp Med*

- 198:889-901.
93. Yu, X.Z., M.H. Albert, P.J. Martin, and C. Anasetti. 2004. CD28 ligation induces transplantation tolerance by IFN-gamma-dependent depletion of T cells that recognize alloantigens. *J Clin Invest* 113:1624-1630.
  94. Yu, X.Z., S.J. Bidwell, P.J. Martin, and C. Anasetti. 2000. CD28-specific antibody prevents graft-versus-host disease in mice. *J Immunol* 164:4564-4568.
  95. Musher, D.M., A.J. Chapman, A. Goree, S. Jonsson, D. Briles, and R.E. Baughn. 1986. Natural and vaccine-related immunity to *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 154:245-256.
  96. Phair, J., C.A. Kauffman, A. Bjornson, L. Adams, and C. Linnemann, Jr. 1978. Failure to respond to influenza vaccine in the aged: correlation with B-cell number and function. *J Lab Clin Med* 92:822-828.
  97. Cook, J.M., N. Gualde, L. Hessel, M. Mounier, J.P. Michel, F. Denis, and M.H. Ratinaud. 1987. Alterations in the human immune response to the hepatitis B vaccine among the elderly. In *Cell Immunol*. 89-96.
  98. Burns, E.A., L.G. Lum, G. L'Hommedieu, and J.S. Goodwin. 1993. Specific humoral immunity in the elderly: in vivo and in vitro response to vaccination. *J Gerontol* 48:B231-236.
  99. Miller, R.A., S.B. Berger, D.T. Burke, A. Galecki, G.G. Garcia, J.M. Harper, and A.A. Sadighi Akha. 2005. T cells in aging mice: genetic, developmental, and biochemical analyses. *Immunol Rev* 205:94-103.
  100. Haynes, L., S.M. Eaton, E.M. Burns, T.D. Randall, and S.L. Swain. 2005. Newly generated CD4 T cells in aged animals do not exhibit age-related defects in response to antigen. *J Exp Med* 201:845-851.
  101. Bansal-Pakala, P., and M. Croft. 2002. Defective T cell priming associated with aging can be rescued by signaling through 4-1BB (CD137). *J Immunol* 169:5005-5009.

7. 図

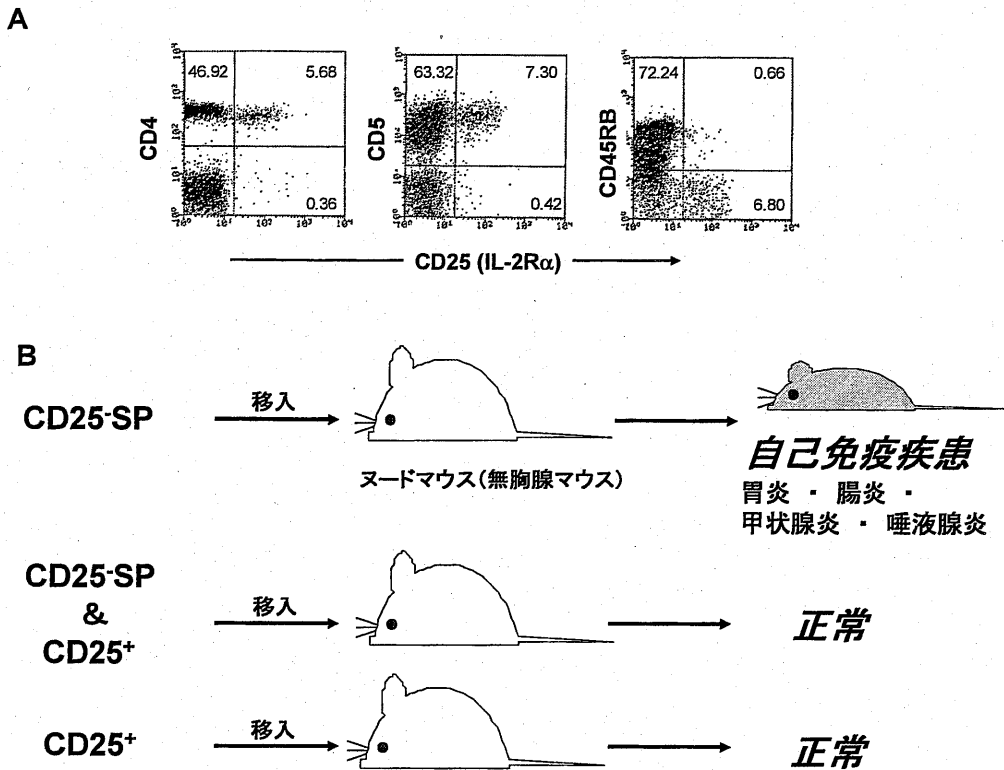
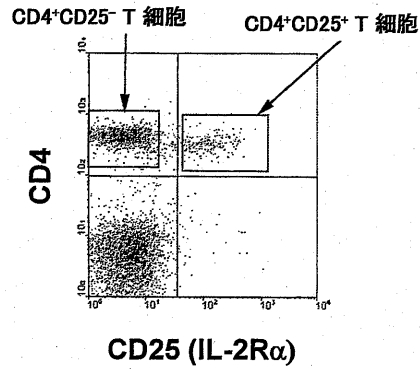


図 1

A, 未感作マウスの脾細胞由来 CD4T 細胞各分画における CD25 分子の発現。CD25 を発現する細胞は CD4, CD5<sup>hi</sup>, CD45RB<sup>lo</sup> 分画中に同じ割合で認められる[論文(2)から引用]。B, 脾細胞移入による自己免疫疾患誘導の実験系。未感作マウスの脾細胞より CD25<sup>+</sup>T 細胞を除去した脾細胞群(CD25<sup>-</sup>SP と表示)を、ヌードマウス(無胸腺マウス)に移入すると、3 ヶ月後にはさまざまな自己免疫疾患を発症する。CD25<sup>-</sup>SP 移入時に CD25<sup>+</sup>T 細胞を共移入することにより、自己免疫の発症は抑制される。また、CD25<sup>+</sup>T 細胞のみを移入した場合には、自己免疫は発症しない。



**A** 若齢マウス(2ヶ月齢)由来脾細胞



**B**

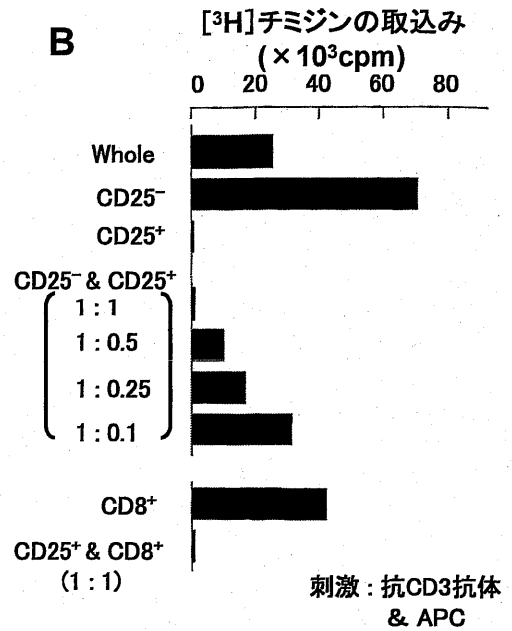


図 2

A, 抗 CD4 抗体と抗 CD25 抗体で脾細胞を染色した。CD4<sup>+</sup>T 細胞中には恒常的に CD25 分子を発現している細胞が 5~10% 存在している。B, CD4<sup>+</sup>T 細胞分画を抗 CD3 抗体と抗原提示細胞 (APC) で刺激したときの細胞増殖を示す。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞 (CD25<sup>-</sup>と表示) は抗 CD3 抗体で刺激することにより活発に増殖するが、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞 (CD25<sup>+</sup>と表示) は同様な刺激に対して不応答性を示す。一定の CD25<sup>-</sup>T 細胞数に対して CD25<sup>+</sup>T 細胞をいろいろな割合で混合した場合、CD25<sup>+</sup>T 細胞数に依存して、CD25<sup>-</sup>T 細胞の増殖が抑制される。同様に、CD8<sup>+</sup>T 細胞の活性化も CD25<sup>+</sup>T 細胞の共存により抑制される。

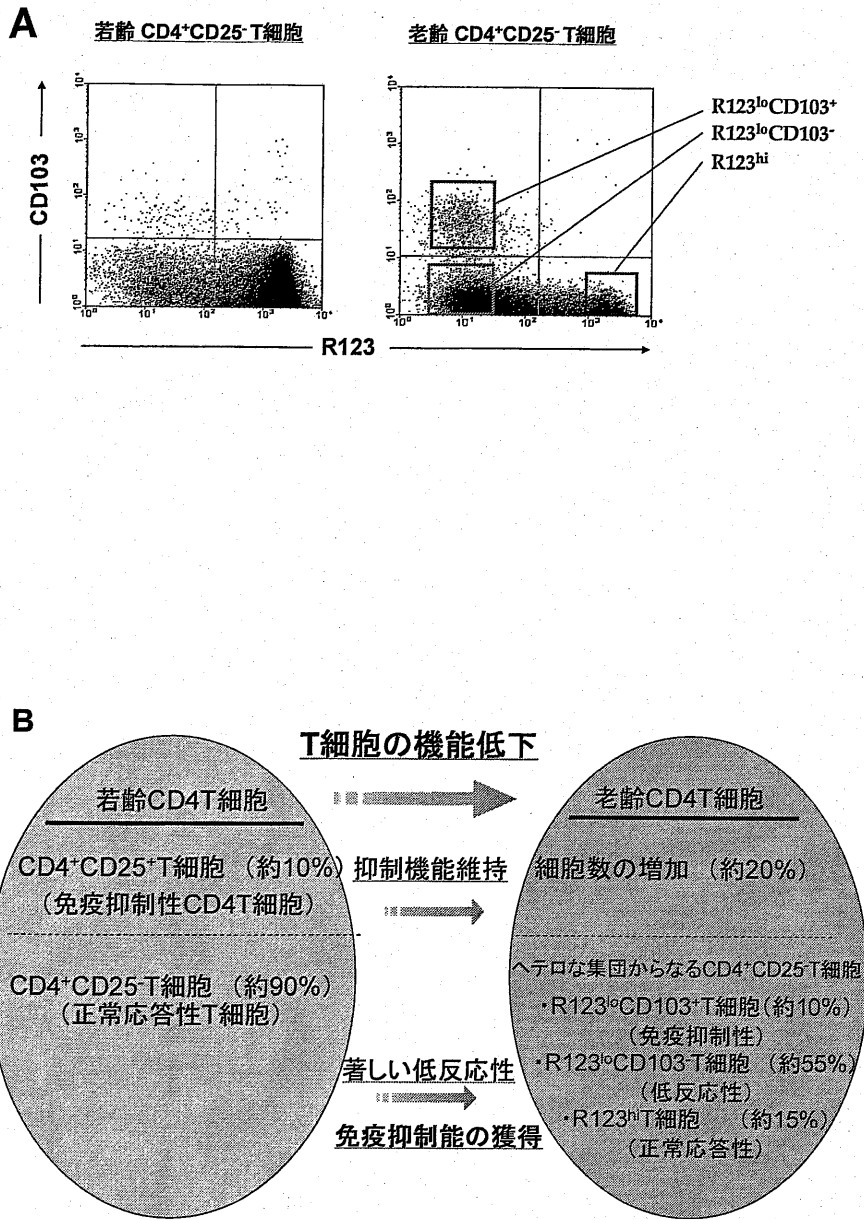


図 3

A, 若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞および老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を Rhodamine123(R123)と抗 CD103 抗体で二重染色した。R123<sup>lo</sup>CD103<sup>-</sup> T 細胞および R123<sup>lo</sup>CD103<sup>+</sup> T 細胞が老齢時に著しく増加している。B, CD4 T 細胞の加齢変化をまとめた。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞は加齢と共に著しい低反応性に陥るのみならず、免疫抑制能を獲得する。老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞は R123 と CD103 を用いて、機能的細胞亜集団に分類される。

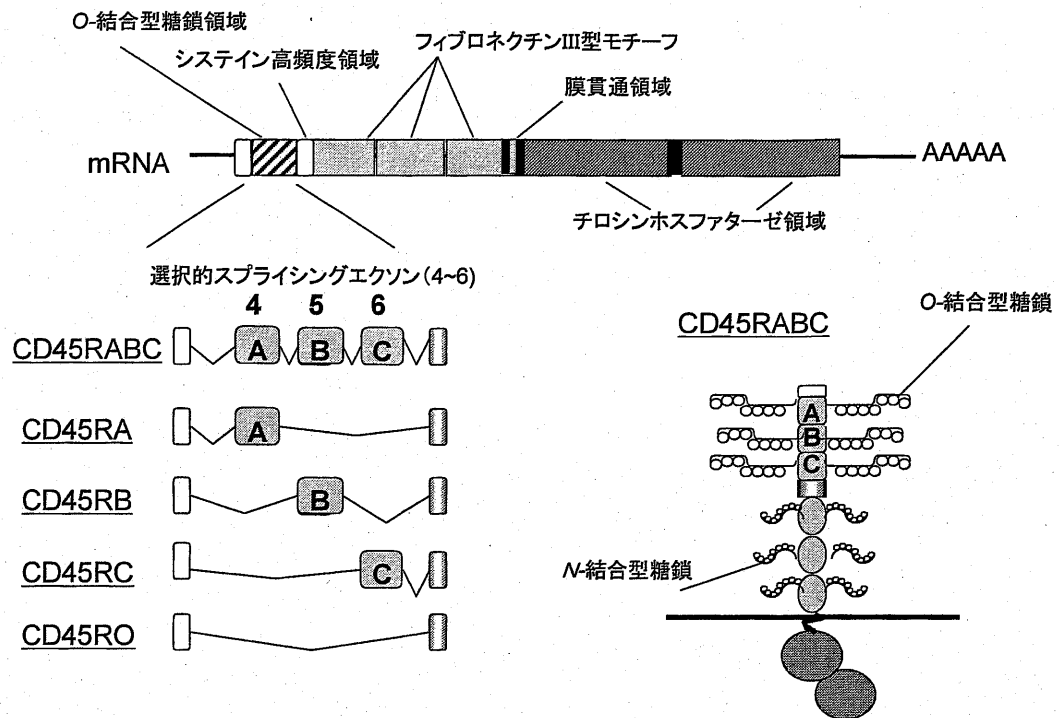


図 4

CD45 分子の選択的スプライシングによる多様なアイソフォームの形成。A, B, C はそれぞれエクソン 4, 5, 6 がコードする領域の名称を表している。たとえば、エクソン B を持つ CD45 のアイソフォームは CD45RB と呼ばれ、いずれのエクソンも持たないアイソフォームは CD45RO と呼ばれる。ABC エクソンは、O-結合型糖鎖の修飾を受け、細胞の発生段階および分化段階に応じて選択される。

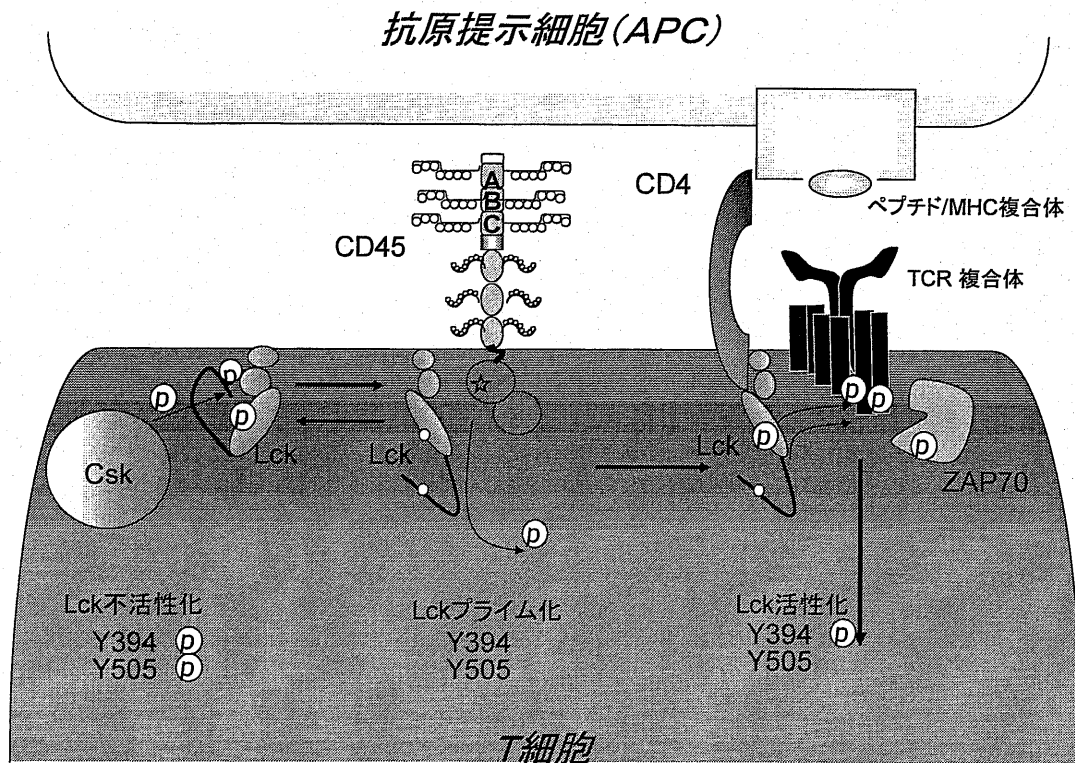


図 5

TCR 近傍における CD45 分子の役割。Csk (carboxy-terminal Src kinase) 分子と CD45 分子により、Lck 分子は不活性化状態およびプライム状態 (Lck の活性化が起こり易い状態) で平衡化している。T 細胞が TCR を介してペプチド/MHC 複合体を認識すると、TCR の補助レセプター (CD4/CD8) およびその細胞内ドメインに会合している Lck が、TCR 複合体へリクルートされる。このとき Lck がプライム状態でなければ、活性化に至るチロシン残基のリン酸化 (Y394) を受けることができず、TCR 下流のシグナル伝達を活性化できない。CD45 分子は Lck 分子の負の調節部位にあるチロシン残基を脱リン酸化することにより、Lck 分子の活性化を促し、結果として TCR シグナル経路を正に制御するように働いている。

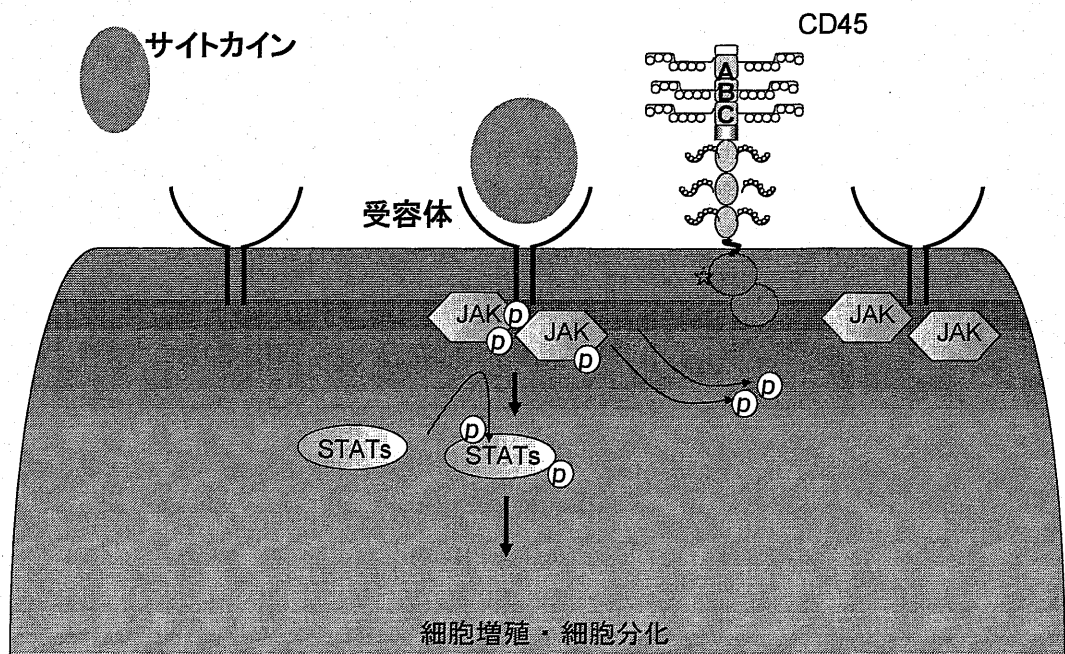


図 6

サイトカイン受容体近傍における CD45 分子の役割。サイトカインがその受容体に結合すると、JAKs がリン酸化される。リン酸化 JAKs は転写因子である STATs をリン酸化し、細胞増殖や細胞分化に関わる遺伝子の転写を促進する。CD45 分子はリン酸化 JAKs を脱リン酸化することにより、JAK-STAT 経路を負に制御している。

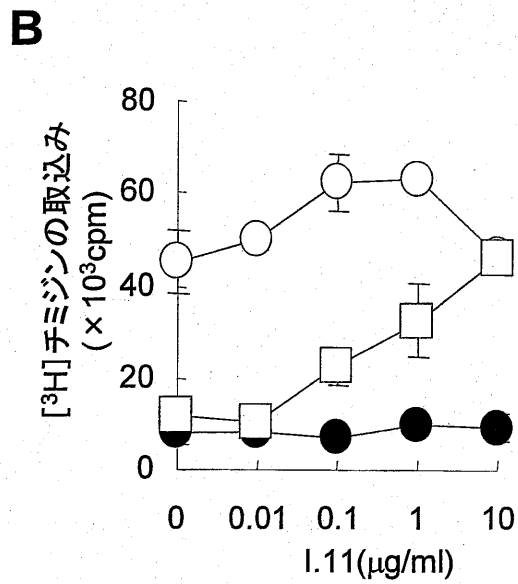
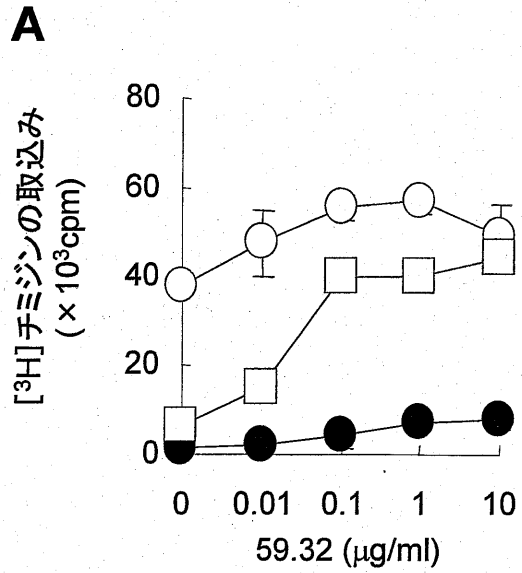


図 7

A および B, 若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞 (○)、老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞 (●)、1:1 で混合した両細胞 (□) を、59.32 抗体もしくは I.11 抗体存在・非存在下に APC と抗 CD3 抗体で刺激した。横軸に抗体量を示す。刺激から 2 日後の細胞増殖をチミジンの取り込みにより測定した。

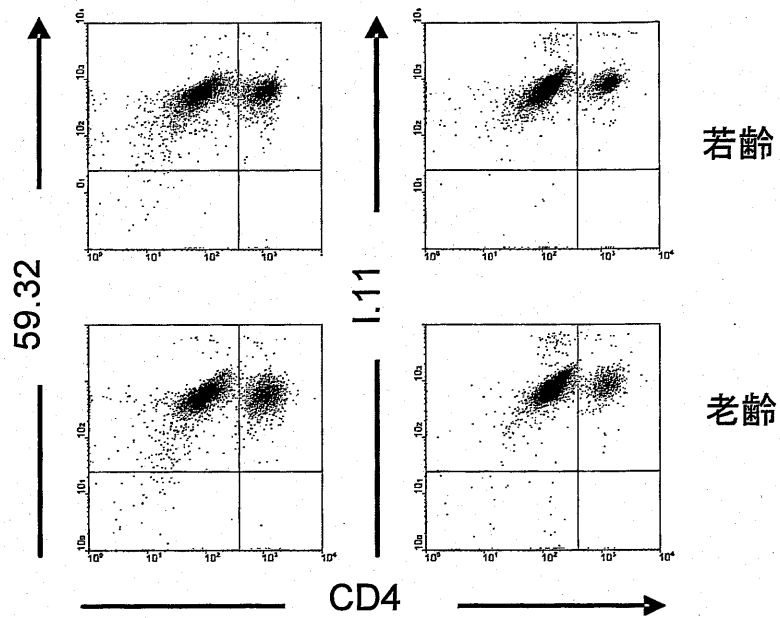


図 8

若齢および老齢マウスから調製した脾細胞を抗 CD4 抗体と 59.32 抗体もしくは I.11 抗体で染色した。ドットプロット中の垂直線は CD4 陽性の境界、水平線は 59.32 および I.11 陽性の境界を示している。

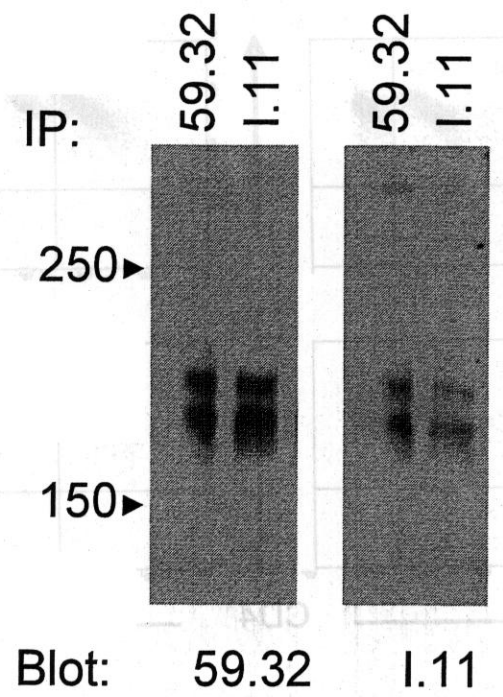


図 9

若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞由来のタンパク質を 59.32 抗体あるいは I.11 抗体で免疫沈降 (IP) し、非還元状態で SDS 電気泳動を行った。その後、59.32 抗体および I.11 抗体と二次抗体でイムノブロット (Blot) を行った。



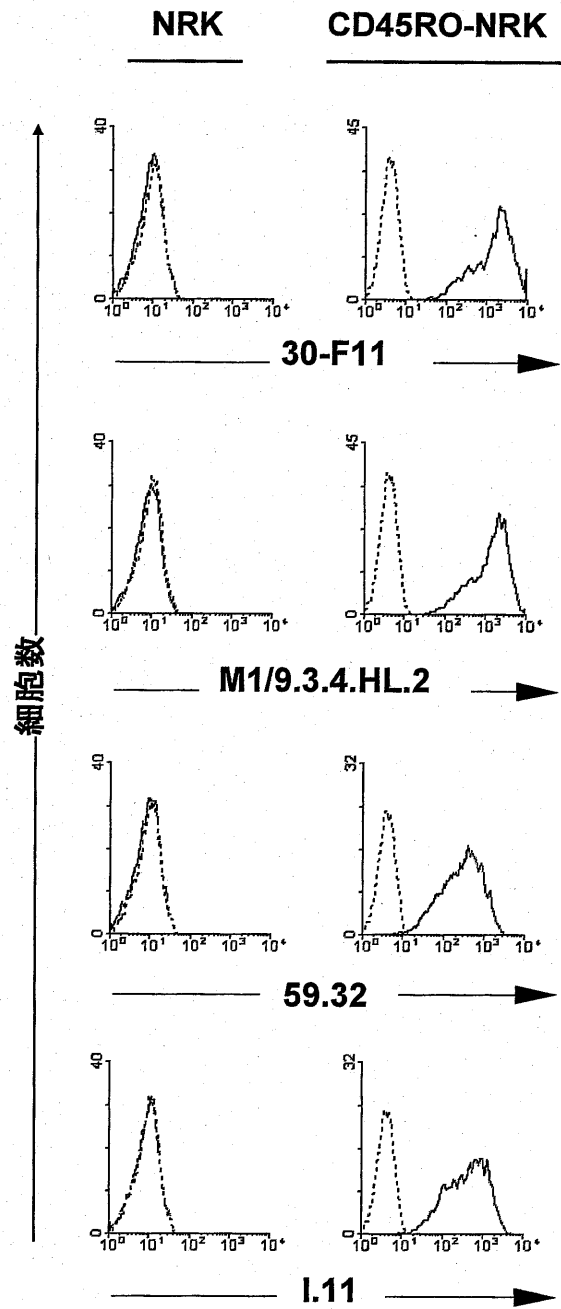


図 10

CD45RO 強制発現細胞 (CD45RO-NRK) と NRK 細胞を各抗 CD45 抗体 (30-F11, M1/9.3.4.HL.2, 59.32, I.11) で染色した。各抗 CD45 抗体の染色結果は実線で示し、二次抗体のみの染色は点線で示す。

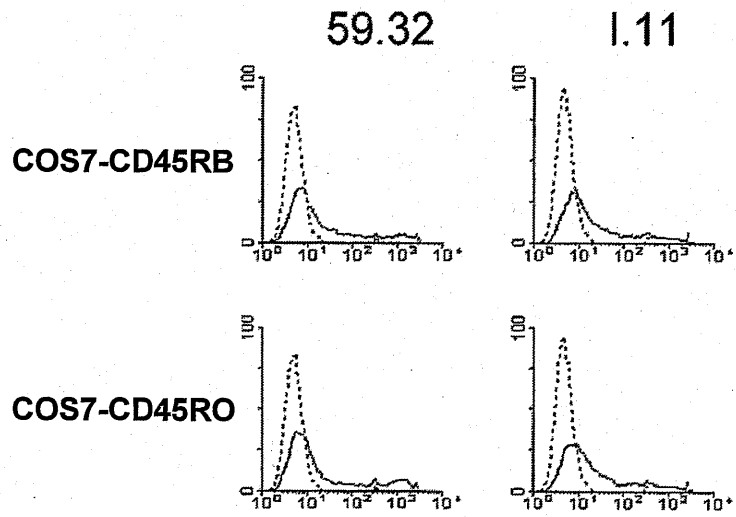


図 11

CD45RO および CD45RB の一過的強制発現細胞(COS7 細胞)を 59.32 抗体および I.11 抗体と二次抗体で染色した(実線)。二次抗体のみの染色は点線で示す。

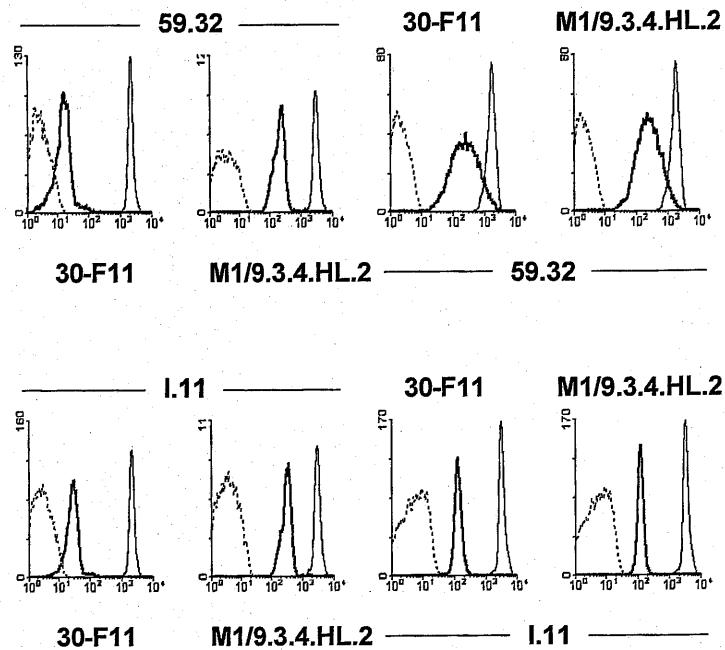


図 12

ヒストグラム上部に示した抗 CD45 抗体[59.32 (100  $\mu\text{g/ml}$ ), I.11 (100  $\mu\text{g/ml}$ ), 30-F11(10  $\mu\text{g/ml}$ ), M1/9.3.4.HL.2 (25% 培養上清)]で若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を 37°C, 60 分間培養し、その後 3 回洗浄を行い、これを前処理とした。その後、ヒストグラム下部に示す抗 CD45 抗体と二次抗体でこの細胞を染色した(太線)。抗体による前処理を行わずにヒストグラム下部に示す抗 CD45 抗体と二次抗体で染色した細胞は細線で示す。二次抗体のみの染色結果は点線で示す。

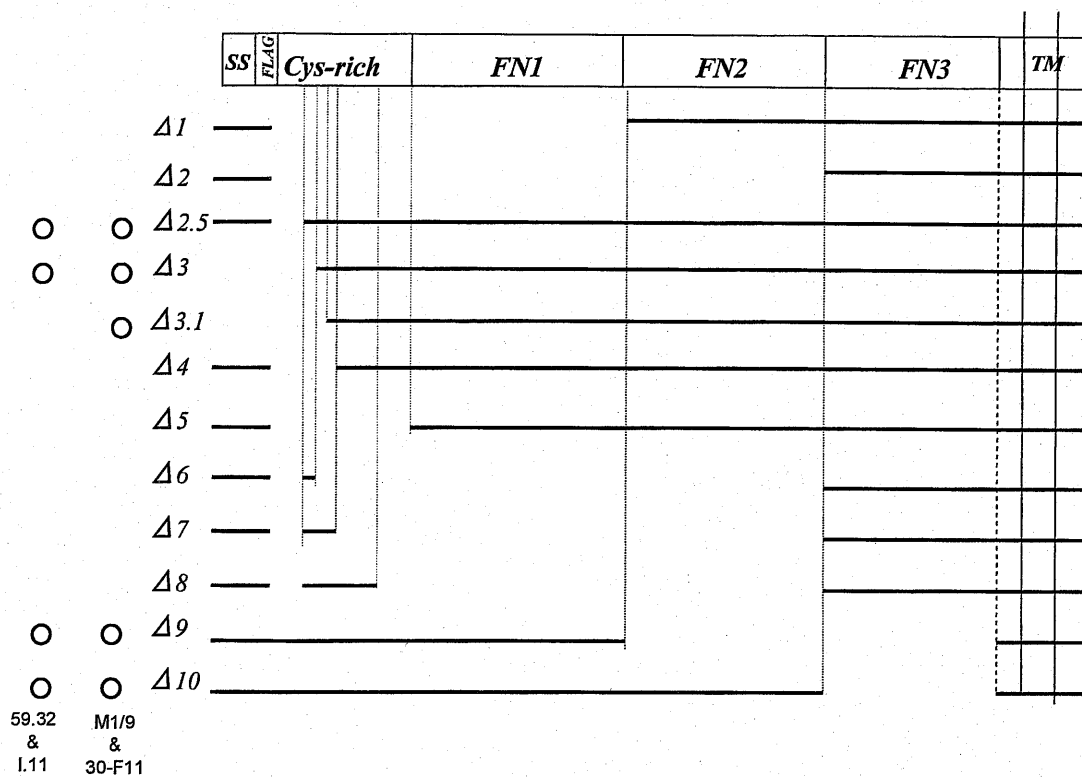


図 13

CD45RO の部分的領域を欠損させたコンストラクトを作製した。各コンストラクトの一過的強制発現細胞 (COS7 細胞) を各抗 CD45 抗体 (59.32 抗体, I.11 抗体, M1/9.3.4.HL.2, 30-F11) で染色した。Δ2.5, Δ3, Δ3.1, Δ9, Δ10 は M1/9.3.4.HL.2 および 30-F11 で認識され、59.32 抗体および I.11 抗体はこのうち Δ3.1 以外の 4 つの強制発現細胞を認識した。(SS: シグナルシーケンス、Cys-rich: システインリッチ領域、FN: フィブロネクチン III 型モチーフ領域、TM: トランスメンブラン領域)

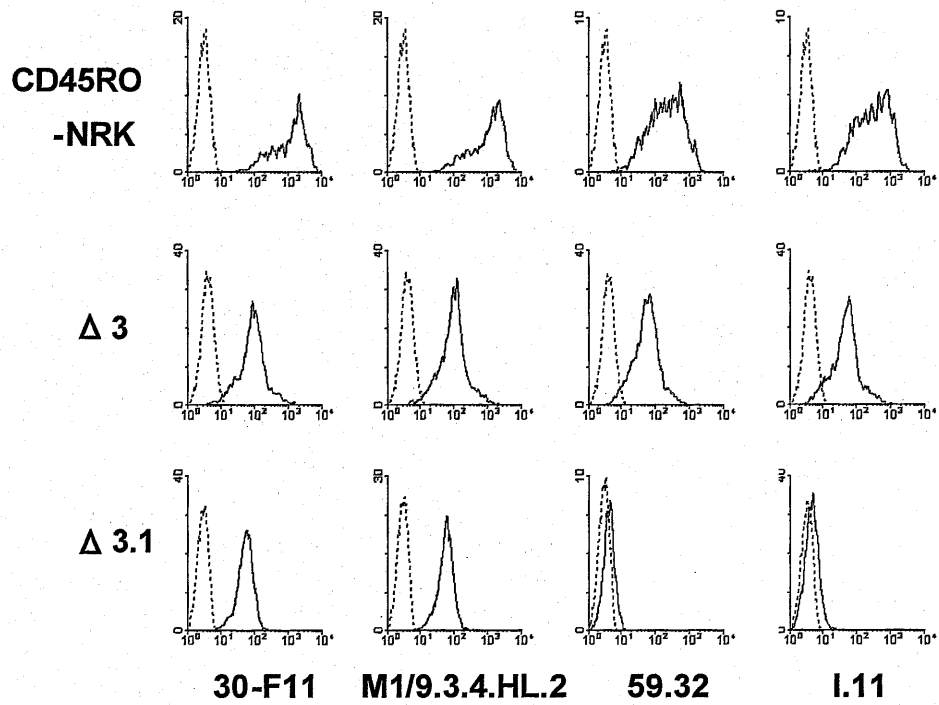


図 14

CD45RO 細胞外ドメインの強制発現株 (CD45RO-NRK)、CD45RO 部分的領域欠損株 ( $\Delta 3$ ,  $\Delta 3.1$ ) を各抗 CD45 抗体 (30-F11, M1/9.3.4.HL.2, 59.32, I.11) と二次抗体で染色した (実線)。二次抗体のみの染色は点線で示す。

A

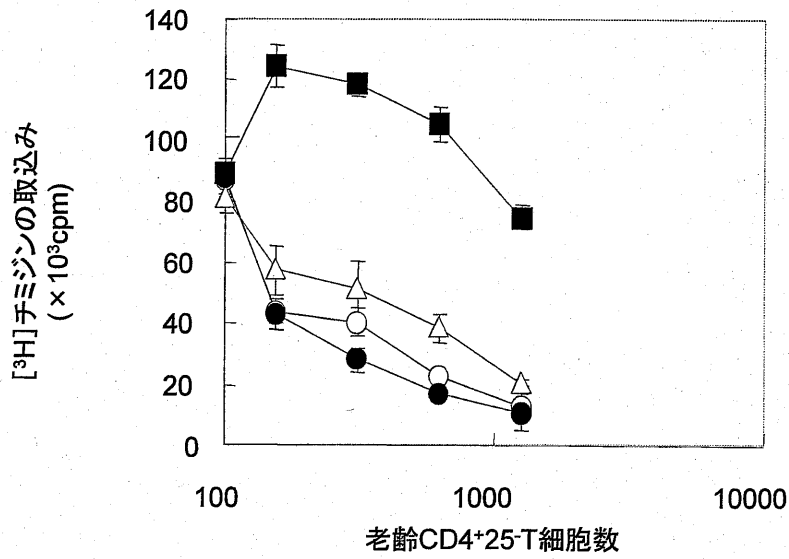


図 15

一定細胞数の若齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞 ( $1 \times 10^4$  細胞/ウェル) と横軸に示した細胞数の老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞を混合し、抗 CD3 抗体、APC、各抗 CD45 抗体 [■:59.32 (1.5 μg/ml); △:30-F11 (1.5 μg/ml); ●:M1/9.3.4.HL.2 (50% 培養上清); ○:抗 CD45 抗体なし;] で培養した。刺激から 2 日後に細胞増殖を測定した。

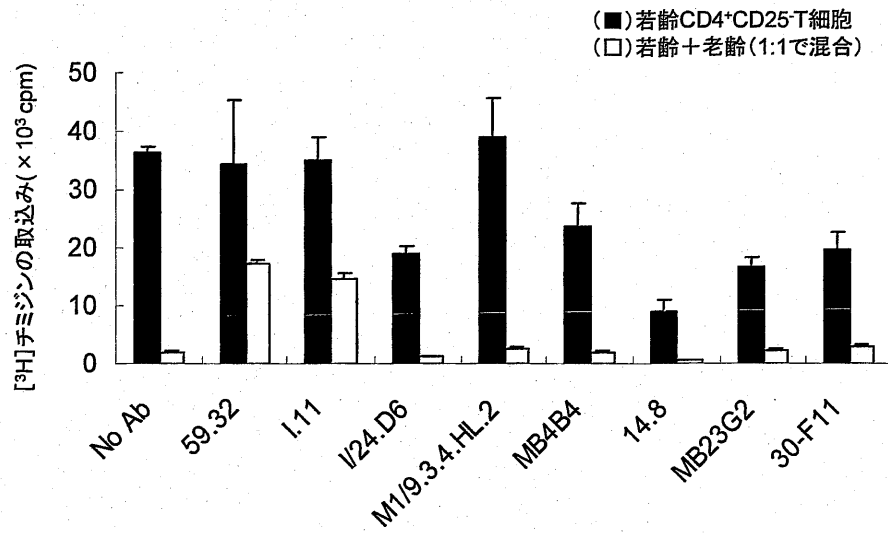


図 16

各抗 CD45 抗体存在[培養上清(50%)]・非存在(No Ab)下に若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞(■)、1:1 で混合した若齢および老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞(□)を、抗 CD3 抗体と APC を用いて刺激した。2 日後に細胞増殖を測定した。現在入手可能な抗 CD45 抗体のうちいくつかは、応答細胞の増殖に対して阻害的な作用を示した。また、59.32 抗体および I.11 抗体を除く、いずれの抗 CD45 抗体にも老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の抑制機能を解除する作用は認められなかった。

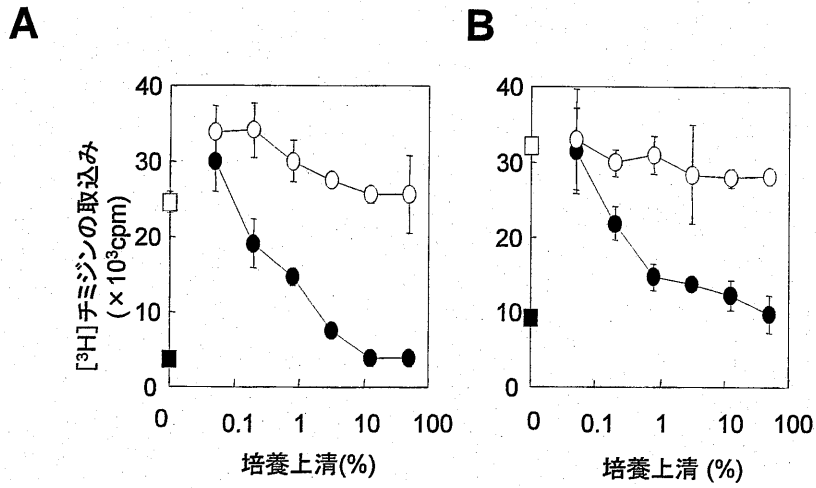


図 17

A, 若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞 (1×10<sup>4</sup> 細胞/ウェル) と老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞を 1:1 で混合し、APC (1×10<sup>4</sup> 細胞/ウェル)、抗 CD3 抗体 (5% 培養上清)、59.32 抗体 (1.5 μg/ml)、他の抗 CD45 抗体 [MB4B4 (○) あるいは M1/9.3.4.HL.2 (●)] で培養した。若齢、老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞を 1:1 で混合し、59.32 抗体存在 (□)・非存在 (■) 下に APC、抗 CD3 抗体で刺激した。縦軸は細胞増殖、横軸はハイブリドーマ (MB4B4, M1/9.3.4.HL.2) 由来の培養上清の添加割合を示している。B, 59.32 抗体の代わりに I.11 抗体 (1.5 μg/ml) を用いた結果を示す。



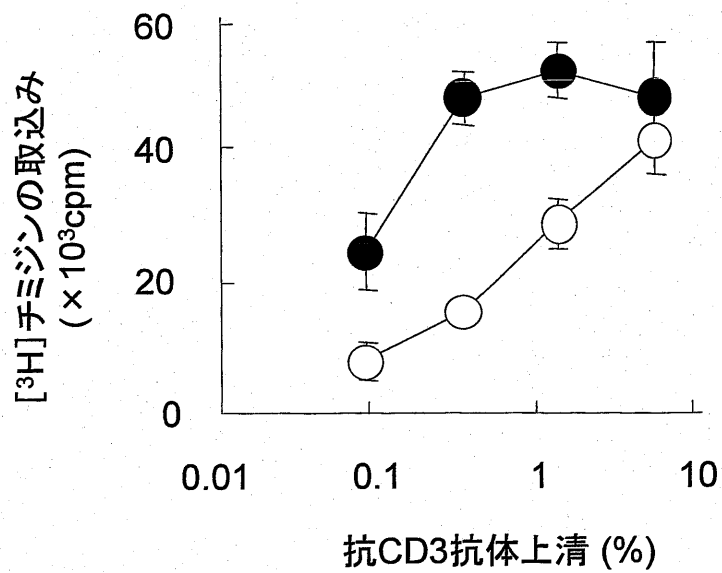


図 18

若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を 59.32 抗体(100 μg/ml) 共存(●)・非共存(○)下に APC、抗 CD3 抗体で培養した。縦軸は細胞増殖、横軸は抗 CD3 抗体の添加割合を示している。抗原刺激に用いる抗 CD3 抗体の濃度が低い場合には、59.32 抗体は若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の増殖を増強する。

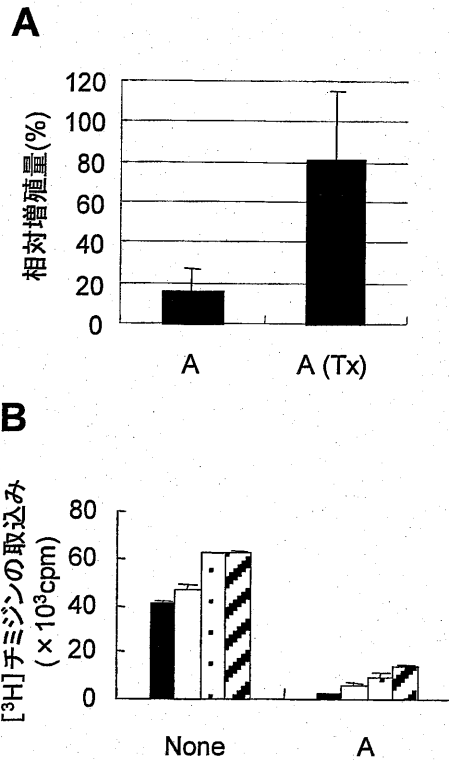


図 19

A, 59.32 抗体で前処理した老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞[A (Tx)と表記]あるいは 59.32 抗体で前処理していない老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞(A と表記)を若齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞(応答細胞)と混合し、抗 CD3 抗体、APC で刺激した。59.32 抗体(100 μg/ml)共存下に老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞を 37°C, 60 分間培養し、その後 3 回洗浄を行い、これを前処理とした。縦軸は応答細胞単独の増殖に対する相対増殖量を示している (n = 6)。A と A(Tx)は統計的に有意であった ( $p < 0.002$ )。B, 若齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞(Y)あるいは APC を 59.32 抗体(10 μg/ml)で前処理(以下 Tx と表記)し、次のような組み合わせで混合した後、抗 CD3 抗体を用いて刺激した (None と表記)。  
 [黒塗り四角: Y と APC ; 白抜き四角: Y と APC (Tx) ; 点線四角 : Y (Tx)と APC ; 斜線四角 : Y (Tx)と APC (Tx)]。また、各組み合わせに対し、老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞の共存 (A と表記)下に抗 CD3 抗体で刺激した。

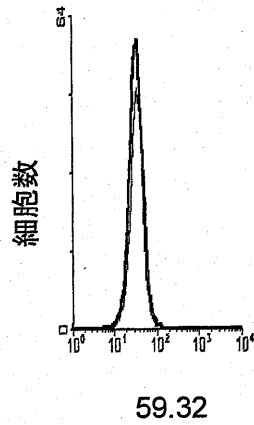
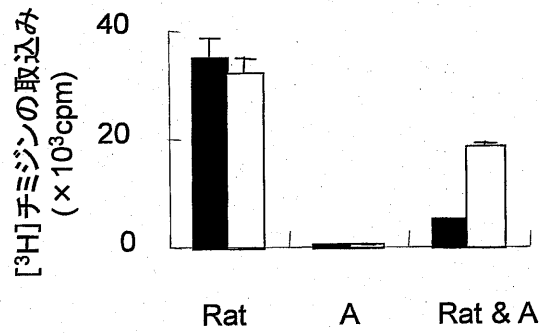
**A****B**

図 20

A, ラット脾細胞を 59.32 抗体と適切な二次抗体で染色した(太線)。二次抗体のみの染色を細線で示す。ラット脾細胞は 59.32 抗体で染色されなかった。B, ラット脾細胞(Rat と表示)、B6 マウス由来の老齢  $CD4^+CD25^-T$  細胞(A と表示)、1:1 で混合した両細胞を、59.32 抗体存在(白抜き四角)・非存在(黒塗り四角)下に ConA で刺激した。Rat 脾細胞の増殖は、マウス老齢  $CD4^+CD25^-T$  細胞の共存により抑制される。ここに、59.32 抗体を共存させておくと、その増殖抑制が解除された。

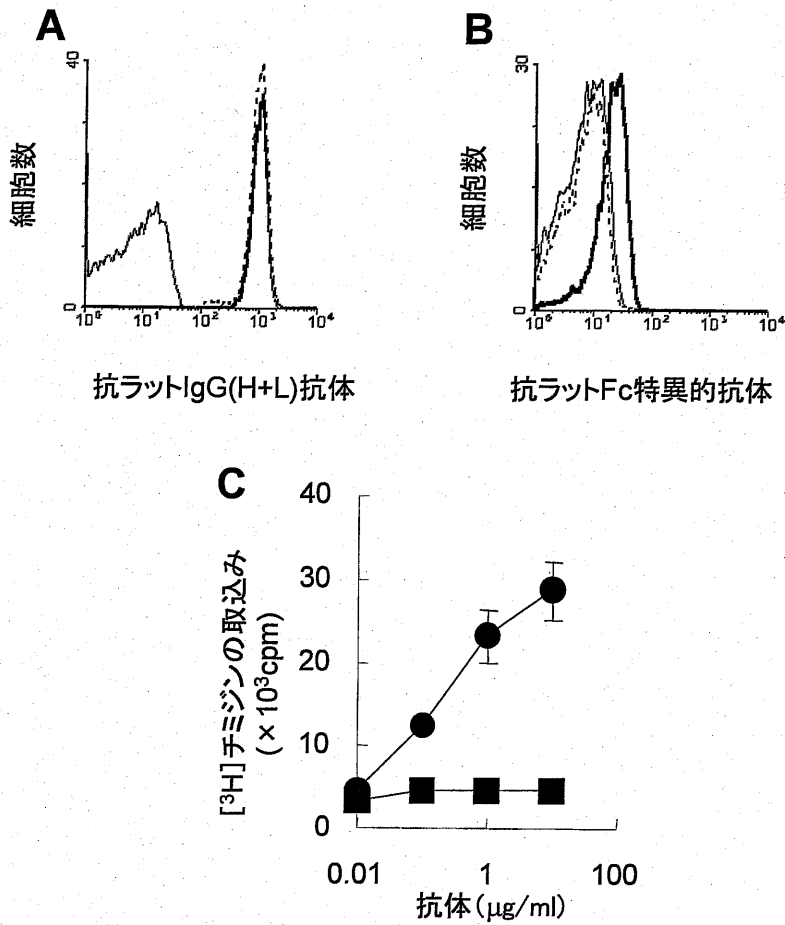


図 21

AおよびB, B6 マウス由来の脾細胞をI.11 抗体全分子(太線)とI.11Fab断片(点線)で染色した。二次抗体として、ラットIgG (H+L) (A)とラットFc 特異的抗体(B)を用いた。二次抗体のみの染色は細線で示した。I.11 抗体もしくはI.11Fab で染色した脾細胞は抗ラットIgG (H+L) 抗体で認識される(A)が、I.11Fab で染色した脾細胞はラットFc 特異的抗体で認識されなかった。C, 若齢および老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞を1:1で混合し、抗CD3抗体、APC、I.11抗体(●)もしくはI.11 Fab(■)と共に培養し、2日後細胞増殖を測定した。I.11抗体、I.11Fab非共存下における若齢CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T細胞単独の増殖は31,028cpmであり、老齢CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T細胞を共存下させていた場合は3,275cpmであった。

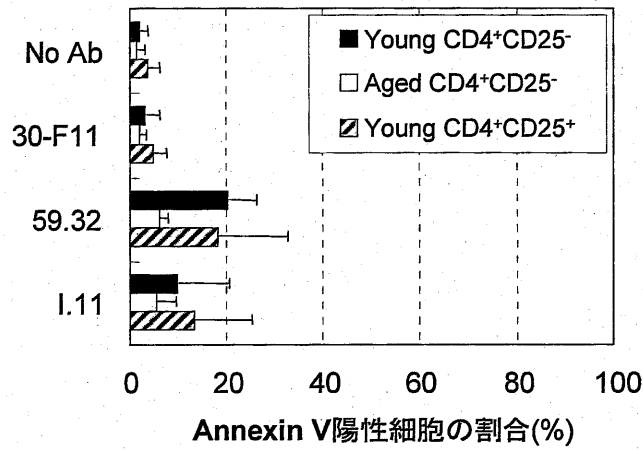


図 22

若齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞 (Thy1.1) と老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞 (Thy1.2) もしくは CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞 (Thy 1.2) を混合し、APC (Thy1.1) と抗 CD3 抗体、各 CD45 抗体 [59.32, I.11, 30-F11 (それぞれ 10 μg/ml)] で培養した。24 時間後に細胞を回収し、Thy1.2 細胞すなわち老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞もしくは CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞中の AnnexinV 陽性細胞の割合を測定した。若齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞のアポトーシス測定時には Thy1.2 の APC を用い、Thy1.1 細胞中の AnnexinV 陽性細胞の割合を測定した。

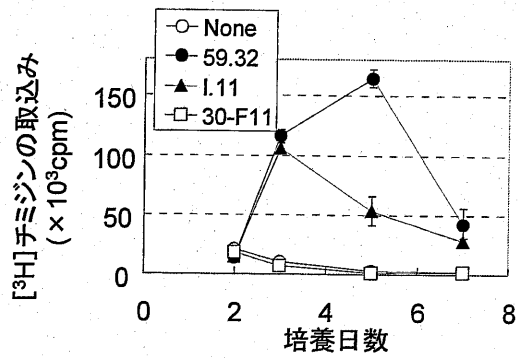
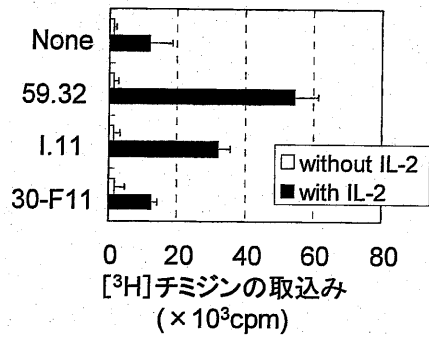
**A****B**

図 23

A, 若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を APC、抗 CD3 抗体、抗 CD45 抗体[59.32, I.11, 30-F11(それぞれ 10 μg/ml)] 共存下で培養した。培養開始から 2, 3, 5, 7 日後の細胞増殖を測定した。B, 老齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を IL-2 (10 U/ml) 存在 (■)・非存在 (□) 下で APC、抗 CD3 抗体、各 CD45 抗体[59.32, I.11, 30-F11(それぞれ 10 μg/ml)] と共に培養した。7 日後に細胞増殖を測定した。

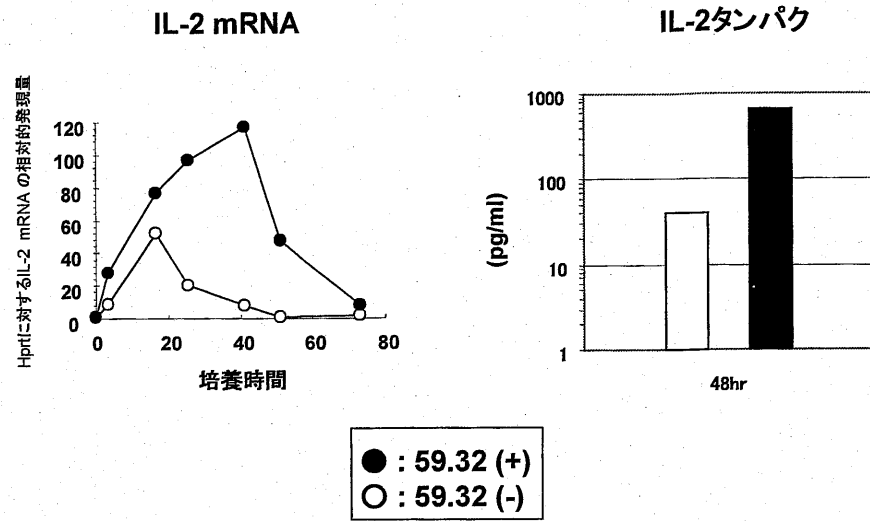


図 24

59.32 抗体存在(黒塗り)・非存在(白抜き)下に、若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞を APC、抗 CD3 抗体で刺激した。リアルタイム PCR 法により、IL-2 mRNA を測定した。また、刺激から 48 時間後の IL-2 タンパク質を ELISA 法により測定した。

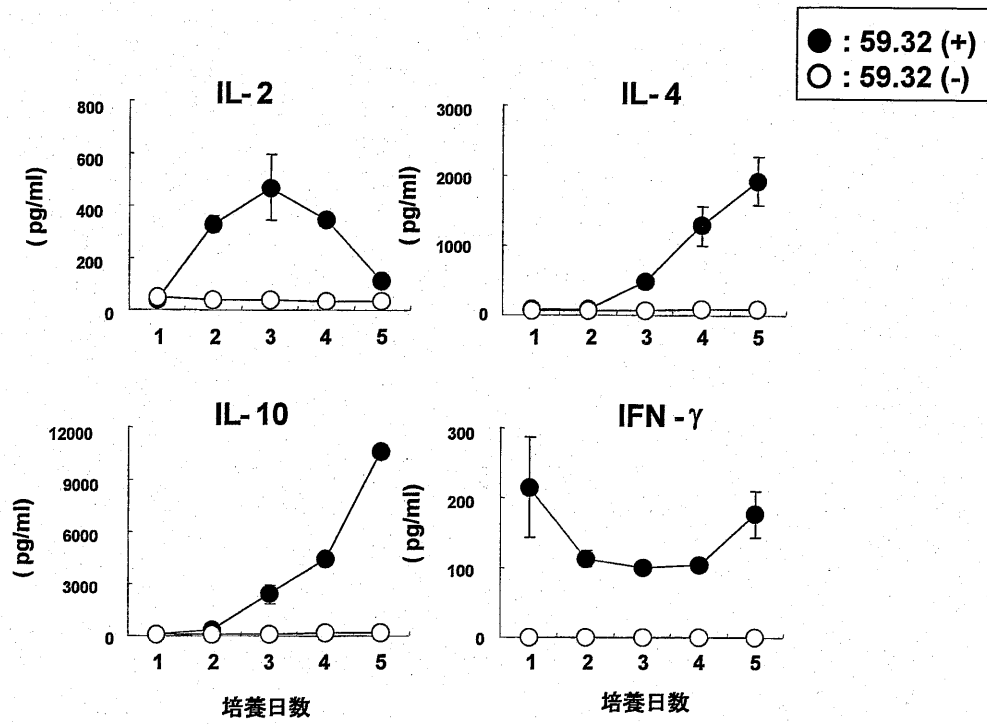


図 25

59.32 抗体存在(黒塗り)・非存在(白抜き)下に、若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞を APC、抗 CD3 抗体で刺激した。図に示した培養日数において、培養上清中に含まれる各サイトカインのタンパク質量を ELISA 法により測定した。



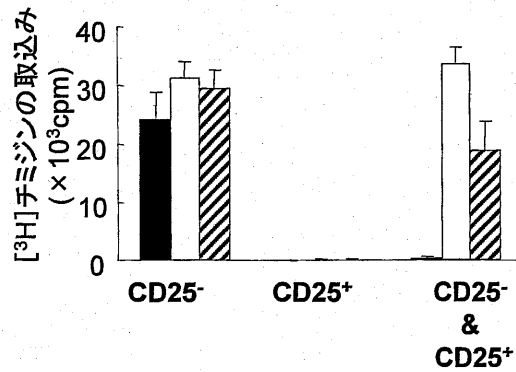
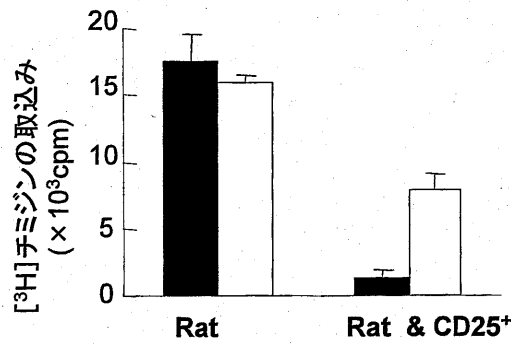
**A****B**

図 26

A, 若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞(CD25<sup>-</sup>と表示)、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞(CD25<sup>+</sup>と表示)、1:1 で混合した両細胞を、各抗 CD45 抗体 (1 μg/ml) (黒塗り四角 : 抗体なし ; 白抜き四角 : 59.32 抗体 ; 斜線四角 : I.11 抗体) 共存下に APC、抗 CD3 抗体で刺激した。B, ラット脾細胞(Rat と表示) と CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞(CD25<sup>+</sup>と表示)を 59.32 抗体 (1 μg/ml) 存在 (□)・非存在 (■) 下に ConA を用いて刺激した。ラット脾細胞は Con A により活発に増殖するが、マウス CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を共存させるとその増殖は抑制される。ここに 59.32 抗体を共存させた場合にはその抑制が解除された。

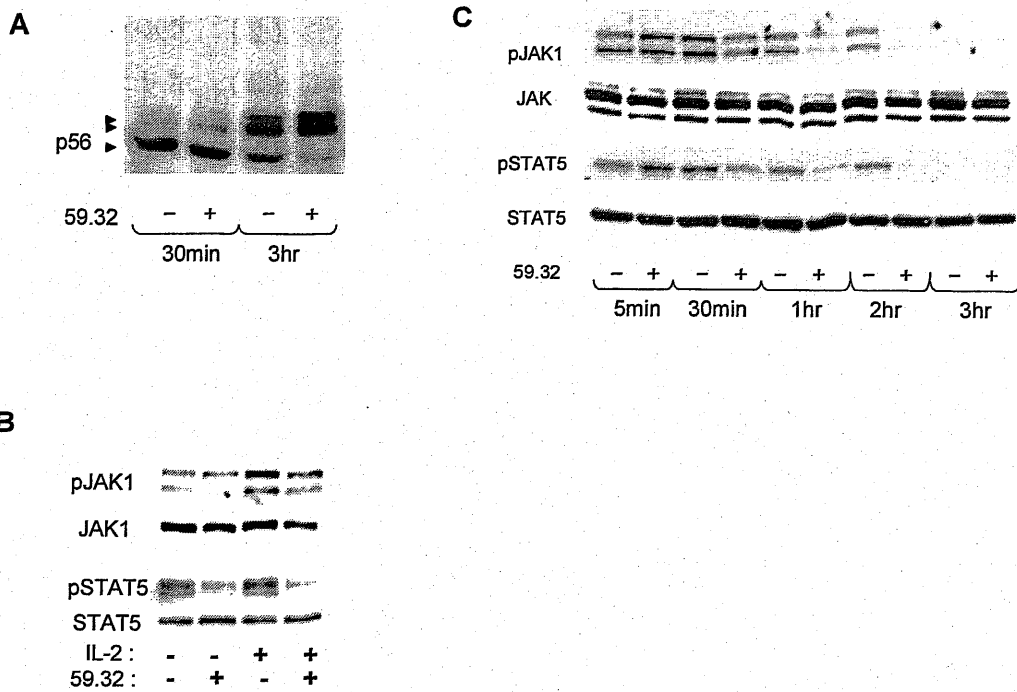


図 27

A, 若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を 59.32 抗体 (10 $\mu$ g/ml) 存在・非存在下に APC と抗 CD3 抗体で刺激した。刺激後、図に示す時間に細胞を回収し、lysis buffer で溶解した。総タンパク質を SDS 電気泳動で分離し、抗 Lck 抗体でプローブした (n = 3)。B, 若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を 59.32 抗体 (10 $\mu$ g/ml) および IL-2 (10U/ml) 存在・非存在下に APC と抗 CD3 抗体で刺激し、2 日後に細胞を回収した。総タンパク質を SDS 電気泳動し、抗 pJAK1 抗体、抗 pSTAT5 抗体でプローブした。そのプロットから抗体を剥がし、タンパク質のローディングコントロールとして抗 JAK1 抗体および抗 STAT5 抗体でリプローブした。C, 59.32 抗体存在・非存在下に CTLL を IL-2 (100U/ml) で刺激し、図に示した時間に細胞を回収した。pJAK1、pSTAT5 は B と同様に測定した。

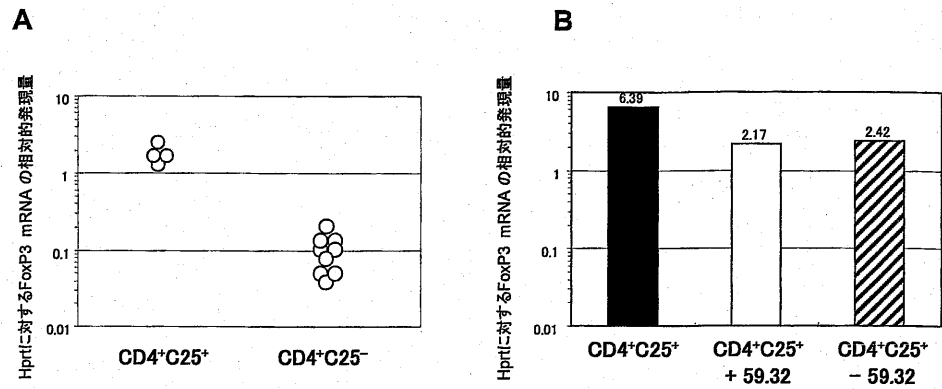


図 28

A, B6 マウスの脾細胞から調製した CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞(n = 4)および若齢 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞(n = 9) の FoxP3 mRNA 発現量をリアルタイム PCR により測定した ( $p < 0.001$ )。縦軸は Hprt に対する FoxP3 mRNA の相対的な発現量を表している。B, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を 59.32 抗体存在・非存在下に抗 CD3 抗体、APC、IL-2 で刺激した。培養開始から 2 日後の細胞から RNA を回収し、Hprt に対する FoxP3 mRNA の相対的な発現量を測定した。

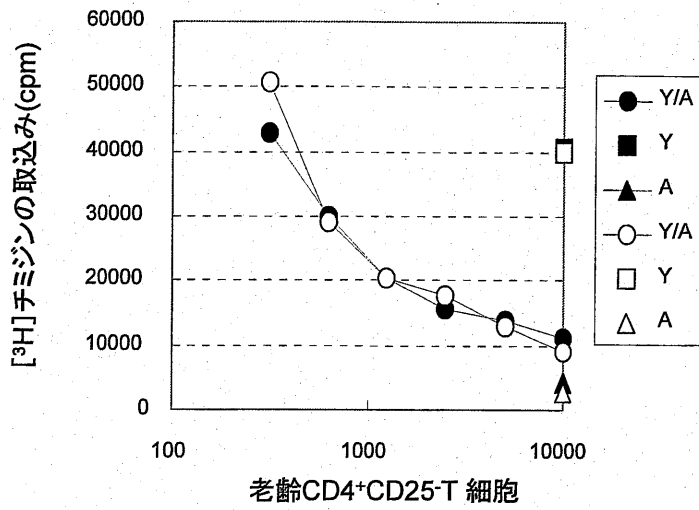
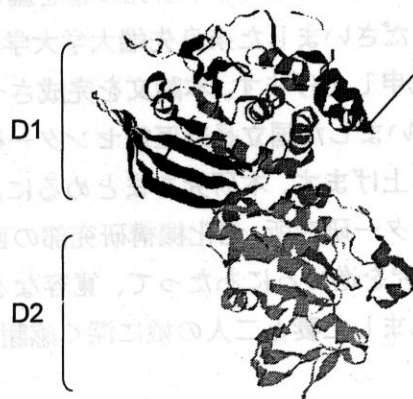


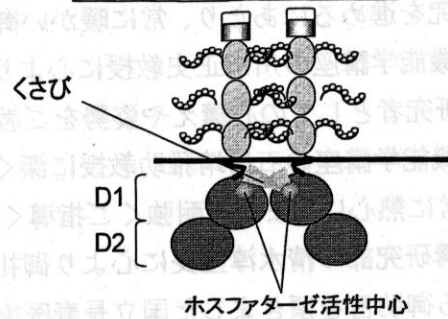
図 29

若齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞(1×10<sup>4</sup> 細胞/ウェル, Y と表示)、老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞 (A と表示)、各割合で混合した両細胞 (Y/A と表示) を CD45-Ig (50 μg/ml) 存在(白抜きシンボル)・非存在(黒塗りシンボル) 下に抗 CD3 抗体と APC を用いて刺激した。横軸は老齡 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞数を示す。

**A** CD45分子細胞内ドメインの構造



**B** 二量体化によるホスファターゼ活性の阻害モデル



**C** 二量体化によるホスファターゼ活性の阻害モデルへの否定説

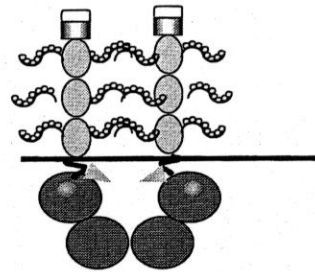


図 30

A, CD45 分子の細胞内領域の構造。RPTP $\alpha$ と同様に、CD45 分子も細胞内に 2 つのホスファターゼドメインを有している(D1、D2)。このうち N 末端側ホスファターゼドメイン(D1)にのみ、ホスファターゼ活性があり、D2 ドメインにおいては活性中心の領域が閉じているためホスファターゼ活性がないことが示されている(61)。CD45 細胞内ホスファターゼドメインの分子モデルは、Protein Data Bank の 1YGU を用いて Rasmol プログラムにより作製した。B, 受容体型チロシンホスファターゼファミリーにおける 2 量体化阻害モデル。リガンド分子の結合によって受容体型チロシンホスファターゼが 2 量体化すると、その膜直下に位置する阻害性くさび領域が相手方のホスファターゼドメインの活性中心部位を塞いでしまう。そのため、基質分子がホスファターゼドメインに結合できず、結果としてホスファターゼ活性が阻害されるというモデル。C, D1 と D2 が強固に結合しているため、阻害性くさび領域部位が相手方 D1 ドメインの活性中心には結合できないとするモデル。

## 8.謝辞

本研究を進めるにあたり、常に暖かい御支援を頂きました奈良先端大学大学院・動物遺伝子機能学講座の川市正史教授に心より御礼申し上げます。本研究の場を薦めてくださり、研究者としての心構えや姿勢をご教授くださいました奈良先端大学大学院・動物遺伝子機能学講座の石田靖雅助教授に深く御礼申し上げます。本論文を完成させるにあたり、常に熱心に、また忍耐強くご指導くださいました国立長寿医療センター研究所・老化機構研究部の清水淳室長に心より御礼申し上げます。本研究をまとめるにあたり、有益なる御助言を頂きました国立長寿医療センター研究所・老化機構研究部の西岡朋尚研究員に深く御礼申し上げます。最後に、本研究を進めるにあたって、寛容なる理解を示し続け、生活の面でも、精神面でも支えてくれました妻と二人の娘に深く感謝致します。