

## 論文内容要旨

Non-suppressive regulatory T cell subset  
expansion in pulmonary arterial hypertension

(肺動脈性肺高血圧症では制御性T細胞における  
非抑制性サブセットの異常を起こす)

Heart and Vessels, in press.

主指導教員：木原 康樹 教授

(応用生命科学部門 循環器内科学)

副指導教員：吉栖 正生 教授

(基礎生命科学部門 心臓血管生理医学)

副指導教員：山本 秀也 準教授

(応用生命科学部門 循環器内科学)

佐田 良治

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【背景】近年、「免疫・炎症」プロセスが肺動脈性肺高血圧（PAH: pulmonary arterial hypertension）の肺血管リモデリングに強く関与することが明らかとなってきた。制御性 T 細胞（Tregs: regulatory T cells）は胸腺や末梢で、ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞が主に形質転換成長因子ベータ 1（TGF- $\beta$  1: transforming growth factor beta-1）などのサイトカインの影響を受けて分化し、エフェクター T 細胞の抑制を介して、免疫恒常性維持に重要な役割を果たす。そのため、PAH においても Tregs は防御的に作用すると予想され、実際に PAH モデルラットを用いた研究で Tregs 輸注は肺血管リモデリングの進行を抑制することが報告された。しかし、ヒト PAH では循環血液中の Tregs はむしろ増加することが示されており、PAH における Tregs の役割に関して一致した見解をみない状況であった。

2009 年に、Miyara らによって Tregs が実際には heterogeneous な細胞集団であり、Tregs の「マスター制御因子」であり重要なマーカーである細胞内 FoxP3 (forkhead box protein 3) 蛋白と細胞表面の CD45RA 抗原の発現量により、機能の異なる 3 つのサブセットに分類されると報告された。このサブセットの解析により、Tregs 中には本来の免疫抑制的な作用を有さずに、炎症性サイトカイン産生により、炎症惹起的に作用するサブセットが存在することが明らかとなった。こうした事実は炎症性疾患において Tregs の質的異常が存在する可能性を示唆する。

そこで我々は、PAH における Tregs の役割をより明らかにするため、Tregs のサブセットに着目して、PAH 患者における循環血液中の Tregs の詳細な解析を行った。また PAH の病態や Tregs の分化・維持いずれにおいても重要な役割を果たす TGF- $\beta$  1 との関連についても検討した。

【方法】PAH 患者 8 名と健常成人ボランティア 14 名を対象として、末梢血サンプルを採取した。Lymphoprep tube を用いて末梢血単核球を分離後、フローサイトメトリー法で Tregs および Tregs サブセットの CD4<sup>+</sup> T 細胞中における割合と、細胞表面機能分子である、CD25 抗原、細胞傷害性 T リンパ球抗原 4（CTLA-4: cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4）の発現量を検出し比較した。末梢血単核球から total RNA を抽出して、リアルタイム PCR 法で Tregs 関連機能分子である、FoxP3、CTLA-4、IL-10 (interleukin-10)、TGF- $\beta$  1 遺伝子発現量を検出し、両群間で比較した。また血清 TGF- $\beta$  1 濃度をフローサイトメーターによる CBA (cytometric bead array) 法で検出し、Tregs サブセットとの関連を検討した。

【結果】PAH 群では健常群と比較して Tregs の割合が有意に上昇 ( $p < 0.05$ ) しており、過去の報告と一致していた。続いて Tregs サブセットの解析を行ったところ、Tregs 本来の免疫抑制機能を有する CD45RA<sup>+</sup>FoxP3<sup>low</sup> Tregs と CD45RA-FoxP3<sup>high</sup> Tregs サブセットの割合は両群間で有意差を認めなかったが、炎症惹起性である CD45RA-FoxP3<sup>low</sup> Tregs サブセットの割合は PAH 群で有意な上昇 ( $p < 0.01$ ) を認め、PAH における Tregs の増加は、この炎症惹起性 Tregs サブセットの増加を反映したものと考えられた。また同サブセットでは、機能分子である CTLA-4 も有意に発現上昇 ( $p < 0.05$ ) しており、活性化を反映した

ものと考えられた。一方リアルタイム PCR 法ではいずれの Tregs 関連機能分子の遺伝子発現量において両群間で有意差を認めなかった。血清 TGF- $\beta$  1 濃度は PAH 群ではコントロール群に比較して有意に低値 ( $p < 0.01$ ) であったが、Tregs サブセットの割合との間に明らかな相関は認めなかった。

【考察】PAH 患者では炎症惹起的な Tregs サブセットの増加と活性化を認めた。PAH では Tregs による免疫恒常性維持に異常を起こし、疾患につながる可能性が示唆された。PAH で Tregs に異常を起こす機序や役割の解明は、PAH の病態解明の鍵になると考えられた。