

学 位 論 文 題 名

T細胞クローンを用いた実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）
における抗原反応性と脳炎誘発性解離現象の解析

学位論文内容の要旨

I は じ め に

実験的アレルギー性脳脊髄炎(experimental allergic encephalomyelitis; EAE)は中枢神経系の自己免疫性の脱髄疾患であり、多発性硬化症の動物モデルとして知られている。EAEは中枢神経髄鞘構成蛋白であるミエリン塩基性蛋白(myelin basic protein; MBP)を感受性のある動物に感作するか、MBP反応性T細胞ライン（多種反応細胞の混合）やT細胞クローン（単一細胞由来）を移入することで引き起こすことができる。しかも、MBPの脳炎活性を有する部分（起炎決定基）に反応するT細胞ラインやクローンのみが起炎性を示す。SJL/JマウスのMBPの起炎決定基はモルモットMBPのアミノ酸89番から101番までの部位（以下MBP 89-101と略）に存在することが判明しており、この部位と反応するT細胞が脱髄性脳炎を誘発することも実証されている。

ところが、我々が樹立したT細胞クローンの中に抗原に対する反応性は保ちながら起炎性が喪失したT細胞クローンが存在することが見いだされた。この起炎性の喪失を解析することにより抗原反応性T細胞がどのような機構で脳内に達し脳炎と脱髄を生ずるかを明確にすることが可能と考えられる。そこで、我々は起炎性喪失機序として抑制因子、リンホカインなど種々の因子の解析を行い、細胞接着分子の発現に差異を見いだしたので報告する。

Ⅱ 研 究 方 法

1. T細胞と起炎性：SJL/Jマウス由来のMBP特異反応性T細胞クローン4b.14aを長期間in vitroで継代するうちに、起炎性を喪失したのが見いだされ、これを4b.14a/nと名付けた。新たにMBPをSJL/Jマウスに免疫後、合成ペプチドMBP 89-101を抗原とし継代培養してT細胞ライン(YT-2)を得、それを限界希釈して樹立した起炎性クローン(TNT-1)をも研究対象とした。各種T細胞の抗原特異反応は $[^3\text{H}]$ Thymidine uptakeにより測定し、脳炎誘発活性は、抗原刺激後の幼若化したT細胞をマウスの腹腔内に移入し、脳症(EAE)の発症の程度を6段階評価で判定した。
2. 病理学的検索：T細胞クローン移入後8日目と12日目との脊髓標本にて検討した。今回新たに作製した抗MBP 89-101モノクローナル抗体(mAb)を用いたAvidin-Biotin法による免疫組織学的染色標本も検索した。
3. 抑制因子測定：4b.14a/n(非起炎性T細胞)による起炎性T細胞抑制因子産生の有無を調べるため、4b.14aのMBP 89-101に対する増殖反応に4b.14a/nの培養上清を加えた。Controlとして、4b.14aの培養上清を用いた。
4. リンホカイン活性：TNF- α 、lymphotoxin(LT)、Interferon(IFN)、IL-2活性測定は各種T細胞の抗原刺激後24, 48時間細胞の培養上清を用いていずれもbioassayで求めた。最初に総TNF (TNF- α とLTの総量)活性をL929細胞を用いたcytotoxicity assayで調べ、次にLT活性を抗mouse TNF- α 抗体をcoatingしたprotein A-SepharoseでTNF- α を吸着除去したサンプルを用いて同様に測定した。TNF- α 活性は総TNF活性値とLT活性値との差から求めた。IFN活性はL929細胞とvesicular stomatitis virusを用いたcytopathic effect (CPE) reduction assayで測定した。IL-2活性はCTLL-2細胞(IL-2 dependent)ならびにHT-2細胞(IL-2 and IL-4 dependent)の $[^3\text{H}]$ Thymidine uptakeにより求めた。
5. 接着分子の解析：リンパ球の接着分子であるCD2とLFA-1 α (CD11a)とLFA-1 β (CD18)の発現の程度は抗原刺激後72時間の4b.14a/nと4b.14aとを、それぞれの抗マウス特異抗体を用いてFACScanサイトメーターで解析した。

Ⅲ 結 果

4b. 14aは腹腔内投与後7日から、TNT-1は9日から重症EAEを発症したが4b. 14a/nは全くEAEを発症せず、また大量投与しても発症しなかった。EAEの病理像では、4b. 14a移入後の脊髄には血管周囲性に著明な単核細胞浸潤と抗MBP 89-101 mAbによる免疫染色で炎症病巣のMBP陽性myelinの消失（脱髄）が見られたが、4b. 14a/nでは細胞浸潤は全く見られず、MBP陽性の髄鞘も保たれていた。また、起炎決定基であるMBP 89-101に対する4b. 14a/nの抗原特異反応は4b. 14aやTNT-1と同程度保たれていた。非起炎性細胞による抑制因子については、4b. 14a/n培養上清はdose dependentに4b. 14aのMBP 89-101に対する増殖反応を抑制したが、4b. 14a培養上清にも同様の抑制活性を認め、抑制因子は関与していないと考えられた。リンホカイン活性では4b. 14a/nの培養上清中のTNF- α 活性は高値を示したが、これは4b. 14a/n由来ではなく抗原刺激時にフィーダー細胞として加えた脾細胞由来と考えられた。LT, IFN, IL-2活性では両者に明らかな差はなかった。接着分子発現の程度では、LFA-1 α とCD2の発現量に差はなかったが、4b. 14a/nのLFA-1 β の発現量は4b. 14aより明らかに低下しており、この低下傾向はコンスタントに再現された。

Ⅳ 考 察

T細胞性組織障害の中で、起炎決定基に反応するT細胞クローンが必ずしも起炎性を有していないという現象に遭遇した。抑制因子や検索した範囲のリンホカイン活性などには差異がなかったが、T細胞上の接着分子(LFA-1 β)の発現量には常に低下が観察された。EAEを発症するためには、エフェクターT細胞が中枢神経に侵入しなければならない。EAEは免疫系の様々な複雑な細胞相互作用や緻細な調節機構の総和として誘起され、多方面からの解析が重要と考えられるが、今回の解析で接着分子低発現によるhoming能や血液脳関門の透過性の欠如が脳炎誘発能の障害の1つの要因になっていると推測された。

V ま と め

実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) における抗原決定基に反応する T 細胞クローンの起炎性喪失機序を解析して次の結果が得られた。

1. ミエリン塩基性蛋白およびその起炎決定基に反応する T 細胞クローン (4b. 14a/n) は臨床的にも病理学的にも脳炎誘発能力を喪失していた。
2. 起炎性保持 T 細胞クローンと比較して起炎性喪失 T 細胞クローン (4b. 14a/n) には抑制因子の存在や検索した範囲のリンホカインに差が無かったが、接着分子 (LFA-1 β) において発現量の低下が観察された。
3. EAE 発症には T 細胞クローンが起炎決定基に反応し、かつ細胞接着分子を保持していることが重要と考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 吉 木 敬

副 査 助 教 授 小 林 邦 彦

学位論文題名

T細胞クローンを用いた実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)
における抗原反応性と脳炎誘発性解離現象の解析

は じ め に

実験的アレルギー性脳脊髄炎(experimental allergic encephalomyelitis; EAE)は中枢神経系の自己免疫性の脱髄疾患である。EAEは中枢神経髄鞘構成蛋白であるミエリン塩基性蛋白(MBP)を感受性のある動物に感作するか、MBP反応性T細胞ラインやT細胞クローンを移入することで引き起こすことができる。しかも、MBPの脳炎活性を有する部分(起炎決定基)に反応するT細胞ラインやクローンのみが起炎性を示す。SJL/Jマウスの起炎決定基はモルモットMBPのアミノ酸89番から101番までの部位(MBP 89-101)に存在することが判明しており、この部位と反応するT細胞が脱髄性脳炎を誘発する。ところが、我々が樹立したT細胞クローンの中に抗原に対する反応性は保ちながら起炎性が喪失したT細胞クローンが存在することが見いだされた。そこで、この起炎性喪失機序として抑制因子の関与、リンホカイン産生の欠失、細胞接着分子の発現の変化に基づくと仮定し、この3点について解析を行った。

方 法

SJL/Jマウス由来のMBP特異反応性T細胞クローン4b.14aと、このクローンを長期間in vitroで継代するうちに、起炎性を喪失したもの4b.14a/nと、新たに樹立した起炎性クローンTNT-1との3クローンを研究対象とした。各種T細胞の抗原特異反応は $[^3\text{H}]$ Thymidine uptakeにより測定し、脳炎誘発活性は、抗原刺激後の幼若化T細胞をマウスの腹腔内に移入し、脳症(EAE)の臨床的重症度の判定を行い脊髄H.E標本ならびに新たに作製した抗MBP 89-101モノクローナル抗体(mAb)を用いたABC法による免疫組織学的染色標本にて病理学的検索も行った。抑制因子産生の有無は、4b.14a/nの培養上清を4b.14aのMBP 89-101に対する増殖反応に加えて調べた。TNF- α , lymphotoxin(LT), Interferon(IFN), IL-2活性測定は各種T細胞の培養上清を用いて、最初に総TNF活性をL929細胞を用いたcyto-

toxicity assayで、次にLT活性を抗mouse TNF- α 抗体を用いてTNF- α を吸着除去して同様に測定した。TNF- α 活性は総TNF活性値とLT活性値との差から求めた。IFN活性はL929細胞とvesicular stomatitis virusを用いたcytopathic effect reduction assayで測定した。IL-2活性はCTLL-2細胞ならびにHT-2細胞の $[^3\text{H}]$ Thymidine uptakeにより求めた。接着分子の解析では、CD2とLFA-1 α (CD11a)とLFA-1 β (CD18)の発現の程度を抗原刺激後72時間の4b.14a/nと4b.14aとを、それぞれの抗マウス特異抗体を用いてFACSscanサイトメーターで解析した。

結 果

4b.14aとTNT-1は重症EAEを発症したが、4b.14a/nは全くEAEを発症せず、また大量投与しても発症しなかった。病理学的検索では、4b.14aでは著明な単核細胞浸潤と抗MBP 89-101 mAbによる免疫染色で炎症病巣のMBP陽性myelinの消失(脱髄)が見られたが、4b.14a/nでは細胞浸潤は全く見られず、髄鞘も保たれていた。また、MBP 89-101に対する4b.14a/nの抗原特異反応は4b.14aやTNT-1と同程度保たれていた。非起炎性細胞による抑制因子については、4b.14a/n培養上清中にはdose dependentの抑制活性を認めたが、4b.14a培養上清にも同様の抑制活性を認めた。リンホカイン活性では4b.14a/nの培養上清中の脾細胞由来と考えられるTNF- α 活性は高値を示したが、LT、IFN、IL-2活性では両者に明らかな差はなかった。接着分子発現の程度では、LFA-1 α とCD2の発現量に差はなかったが、4b.14a/nのLFA-1 β の発現量は4b.14aより明らかに低下しており、この低下傾向はコンスタントに再現された。

考 察 と 結 語

起炎決定基に反応するT細胞クローンが必ずしも起炎性を有していないという現象に遭遇した。抑制因子や検索した範囲のリンホカイン活性などには差異がなかったが、T細胞上の接着分子(LFA-1 β)の発現量には常に低下が観察された。EAEを発症するためには、エフェクターT細胞が中枢神経に侵入しなければならない。EAEは免疫系の様々な複雑な細胞相互作用や繊細な調節機構の総和として誘起され、多方面からの解析が重要と考えられるが、今回の解析で接着分子低発現によるhoming能や血液脳関門の透過性の欠如が脳炎誘発能の障害の1つの要因になっていると推測され、EAE発症にはT細胞クローンが起炎決定基に反応し、かつ細胞接着分子を保持していることが重要と考えられた。

口頭発表に当たり、吉木教授、小林教授、上出教授より脱髄性脳炎発症機構における細胞接着装置の役割、リンパ球、血管内皮に介在する他の細胞接着因子、LFA-1 β 反応性低下の解釈とその意義、非起炎性T細胞クローンの生体内局在、投与部位による検討などの質問がなされたが、発表者は概ね適切な回答をなしたものと思われた。また、吉木教授、小林教授には個別に審査を頂き、それぞれ合格と判定された。以上、本研究は免疫反応性を有しているが起炎性を失ったT細胞クローンを多方面から解析し、脱髄性脳炎発症機構に関する一つの要因を示したものであり、学位論文に値するものと判断された。