

学位論文題名

胸腺細胞の分化と選択

学位論文内容の要旨

I. 研 究 目 的

T細胞のMHC拘束性と自己寛容性は、あらかじめ遺伝的に決定されているのではなく、胸腺内あるいは一部胸腺外での分化過程で獲得される。自己寛容性は、主に自己反応性T細胞クロンの胸腺内除去、または不活化によって成立する(negative selection)。一方、特定のT細胞抗原レセプター(TCR)を持った胸腺細胞は、胸腺内微小環境によって種々の程度に選択拡張される(positive selection)。

TCRの β 鎖V領域産物の一つ、 $V_{\beta}17a$ をもったT細胞はI-E分子に反応性を示すために、I-E⁺マウスではクロン除去される。一方、I-E⁻マウス(SWR、SJL)では、系統によって $V_{\beta}17a^{+}$ T細胞のCD4/CD8分画の割合が異なる。

本論文では、種々の骨髓キメラマウスと胸腺キメラマウスを用いて、 $V_{\beta}17a^{+}$ T細胞のCD4/CD8分画の割合を左右する因子について解析した。

II. 材 料 と 方 法

1. マウス: 実験には、SWR/J、SJL/J、DBA/1、C57BL/10 (B10)、B10.A (4R) (4R)、C57BL/6 (B6)、B6.C-H-2^{bm1} (bm1) B6-H-2^{bm3} (bm3)、B6.C-H-2^{bm7} (bm7)、B6-H-2^{bm8} (bm8)、B6.C-H-2^{bm10} (bm10)、B6.C-H-2^{bm11} (bm11)、B6.C-H-2^{bm12} (bm12) マウスを使用した。いずれもI-E分子欠損系で、SWR、SJLのみ $V_{\beta}17a$ TCRを発現している。

2. 骨髓移植: 10GyX線照射した宿主マウスに、抗Thy1.2抗体で処

理した骨髓細胞を静注した。例えば、SWR 骨髓細胞をSJLに移植したキメラマウスを [SWR→SJL] と表し、他の組み合わせのキメラもこの表記法に従った。

3. 胸腺移植：胸腺摘除したSWRマウス (TxSWR) に10GyX線を照射し、抗Thy1.2抗体と補体で処理したSWRの骨髓細胞を移植した (TxSWR Bマウス)。胎令14日目のSWR、SJL、または4Rの胎仔胸腺をdeoxyguanosine (dGuo) 処理し、胸腺内のリンパ様細胞を除去後、TxSWR Bマウスの腎被膜下に移植した。

4. 細胞表面抗原の解析：骨髓または胸腺移植後5週時に、胸腺細胞を抗V β 17a、抗CD4、抗CD8抗体で3重染色してFACS解析した。

5. 統計処理：実験結果は、平均値±標準誤差で表し、有意差の判定にはStudentのt検定を用いた。

III. 結 果

1. 正常SWR、SJL、(SJLxSWR) F₁ マウスのV β 17a⁺胸腺細胞の解析

各マウスのV β 17a⁺細胞のうちCD4⁺8⁻、CD4⁻8⁺細胞の割合は、SWR (H-2^b) でそれぞれ83.8±0.7%、3.9±0.1%、一方SJL (H-2^k) では、それぞれ71.3±0.4%、17.1±0.4%で、SWRと比べCD4⁻8⁺細胞の割合に著明な差が認められた。さらに (SJLxSWR) F₁ (H-2^{b/k}) では、それぞれ80.0±0.5%、6.6±0.4%で、CD4⁻8⁺細胞の割合はSWR、SJLの間であった。(SJLxSWR) F₁ マウスのCD4⁻8⁺細胞の割合は、SWRと比較して有意に高く (p<0.05)、またSJLと比べると有意に低かった (p<0.01)。

2. [SWR→SJL]、[SJL→SWR] のV β 17a⁺CD4⁻8⁺胸腺細胞の割合
V β 17a⁺CD4⁻8⁺細胞の割合に影響を与える因子を調べるために、SWR、SJL間で骨髓キメラマウスを作製し、胸腺細胞の表現形を解析した。V β 17a⁺CD4⁻8⁺細胞の割合は、[SWR→SJL] で14.4±0.3%、一方[SJL→SWR] では5.1±0.3%で、どちらも正常宿主マウスの割合に近似していた。

3. 他の骨髄キメラマウスの $V_{\beta}17a^{+}CD4^{-}8^{+}$ 胸腺細胞の割合

H-2^b、H-2^d以外のH-2ハプロタイプの影響を見るため、さらにB10 (H-2^b)、4R (H-2^d)にSWRの骨髄を移植した。[SWR→B10 (K^b、A^b、D^b)]、[SWR→4R (K^k、A^k、D^b)]キメラの $V_{\beta}17a^{+}CD4^{-}8^{+}$ 細胞の割合は、それぞれ $18.6 \pm 1.2\%$ 、 $8.5 \pm 0.1\%$ であった。また [SWR→(B10x4R) F₁]キメラの $V_{\beta}17a^{+}CD4^{-}8^{+}$ 細胞の割合は、 $11.7 \pm 0.3\%$ で [SWR→B10] と [SWR→4R] との間であった。CD4⁻8⁺細胞の反応性はクラスI分子によって規定される。またB10と4Rマウス間でクラスIの違いはH-2Kのみに認められる。従って、 $V_{\beta}17a^{+}CD4^{-}8^{+}$ 細胞の割合は、胸腺内クラスI (K) 分子によって決まることが示唆された。

4. 胸腺キメラマウスの $V_{\beta}17a^{+}CD4^{-}8^{+}$ 細胞の解析

胸腺外環境の影響を除外するために胸腺内骨髄由来細胞 (胸腺リンパ球、樹状細胞 (DC)、マクロファージ (Mφ) など) を除いた胸腺を移植し、5週後に移植胸腺内の細胞の解析を行った。TxSWR Bマウスに移植されたSWR、SJL、4R胸腺内の $V_{\beta}17a^{+}CD4^{-}8^{+}$ 細胞の割合は、それぞれ $5.8 \pm 0.01\%$ 、 $13.3 \pm 0.3\%$ 、 $10.0 \pm 1.2\%$ であった。この値は胸腺ドナーマウスの値と同程度であった。従って、 $V_{\beta}17a^{+}CD4^{-}8^{+}$ 細胞の割合は胸腺ストローマ (上皮) 細胞に発現されているクラスI分子によることが判明した。

5. H-2KクラスI突然変異マウス (bmマウス) を宿主にした骨髄キメラマウスの胸腺細胞の解析

H-2K分子の関与が示唆されたため、種々のbmマウスにSWR骨髄細胞を移植した。各 [SWR→bm] の $V_{\beta}17a^{+}CD4^{-}8^{+}$ 細胞の割合を [SWR→B6] ($17.1 \pm 1.1\%$) と比較すると、[SWR→bm8] だけが $11.3 \pm 0.7\%$ と有意に減少していた ($p < 0.05$)。

IV. 考 察

T細胞の成熟分化には、胸腺内でTCRと主要組織適合複合体 (MHC、マウスではH-2) 分子の相互作用が必要である。positive selectionには胸腺上皮細胞が、またnegative selectionには胸腺内マクロファ-

ジ (Mφ) や樹状細胞 (DC) が重要な成分であることが示されてきた。

本実験において、骨髓キメラマウスの $V_{\beta}17a^{+}CD4^{-}8^{+}$ 細胞の割合は、骨髓供与マウスを問わず宿主のものと一致した。即ち、宿主の放射線抵抗性胸腺上皮細胞上に発現されている H-2K 分子が、 $V_{\beta}17a^{+}CD4^{-}8^{+}$ 細胞の割合を決定していることが示唆された。これは、胸腺キメラマウスの実験によって確認された。移植前に dGuo 処理し、胸腺リンパ球、Mφ、DC を除いた移植胸腺内で分化した宿主由来の $V_{\beta}17a^{+}CD4^{-}8^{+}$ 細胞の割合は、胸腺ドナーマウスの H-2K 分子によって決定された。従って、dGuo 抵抗性の胸腺上皮細胞上の H-2K 分子によって、 $V_{\beta}17a^{+}CD4^{-}8^{+}$ 細胞は種々の程度に選択拡張されることが判明した。

bm8 マウスでは、H-2K^b 分子の 22、23、24、30 番残基に特異的なアミノ酸変異がある。[SWR→bm8] キメラの $V_{\beta}17a^{+}CD4^{-}8^{+}$ 細胞の割合が有意に低下していたことから、これらの領域が $V_{\beta}17a^{+}$ T 細胞の positive selection にとって重要な部位と考えられた。bm8 のアミノ酸変異は、クラス I 分子の溝状の抗原結合部位の底面に存在しており、抗原フラグメントと直接結合するが、TCR とは直接結合しないと考えられる。従って、TCR と胸腺上皮の MHC 分子の相互作用には、ある特定の自己抗原の介在が必要であることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小野江 和 則

副 査 教 授 柿 沼 光 明

副 査 教 授 上 出 利 光

学 位 論 文 題 名

胸 腺 細 胞 の 分 化 と 選 択

T細胞の抗原識別機構は、遺伝的に決定されているのではなく、主として胸腺内での分化、選択過程によって確立される。

著者は、骨髓キメラや胸腺キメラを用いた実験によって、T細胞抗原レセプター（以下TCR）の β 鎖V領域の一つV β 17a産物を発現するT細胞が、胸腺上皮に発現されるH-2 クラスI分子によって、クローンサイズを変化させること、すなわちpositive selectionを直接証明した。

V β 17a 遺伝子を持つSWR またはSJL マウスにおいて、CD4 とCD8 抗原の発現パターンを比較すると、SJL ではV β 17a CD4⁻8⁺細胞が約20% 存在するが、SWR では4%前後しか認められず、両者に著明な差が認められる。そこでこれらの差の原因を明らかにするため、SJL またはSWR の骨髓細胞を種々のH-2 を持つマウスに移植し、再建した。次にこれらのキメラの胸腺細胞をファックスキャンで解析した。

その結果、V β 17a⁺ CD4⁻8⁺ 細胞の割合は、レシピエントマウスのH-2Kハプロタイプによって決定されることが判明した。すなわちV β 17a⁺胸腺細胞のうち、CD4⁻8⁺細胞はK^b, K^s の場合には20% 弱認められ、K^kでは約10%、そしてK^aの場合には4%であった。

次にこれらクラス I 分子を提示する細胞を明らかにするため、胸腺剔出SWR マウスをT細胞を除いた同系SWR マウス骨髓で再建したSWR Bマウスに、胎令14日目の胎仔の胸腺をデオキシグアノシン処理後に移植して、胸腺キメラを作製し、解析した。その結果、 $V\beta 17a^+ CD4^-8^+$ 胸腺細胞の割合は、胸腺上皮細胞上に発現されているH-2K分子によって決定されることが判明した。

H-2K分子のどの部分が、 $V\beta 17a^+ CD4^-8^+$ 胸腺細胞のpositive selectionに関与しているかを更に詳細に調べるために、次にSWR マウスをドナー、B6マウス由来のH-2K^b 遺伝子ミュータントマウスをレシピエントにして骨髓キメラを作製し、胸腺細胞を解析した。bm8 マウスをレシピエントにした時のみ、K^b健全系のB6レシピエントと較べて $V\beta 17a^+ CD4^-8^+$ 胸腺細胞の割合が減少していた。

K^{bm8}分子に個有の突然変異としては、抗原結合溝の底面を構成する β シートの45ポケット部位のアミノ酸置換がある。この部位は、TCRが直接アクセスすることは出来ない。したがって、K^{bm8}分子が特定のT細胞レパトアのpositive selectionに影響を与えたということは、45ポケット部位に自己蛋白由来のペプチド分子が結合し、それを介してT細胞の選択が行われることを示唆すると考えられた。

論文発表に際し、柿沼教授より胸腺細胞の各亜群の割合を規定する因子、 $V\beta 17a^+$ 胸腺細胞の中では、 $CD4^+$ 胸腺細胞が $CD8^+$ 細胞より多い理由などについて質問があったが、申請者は大概妥当な解答を成し得た。また副査の柿沼、上出両教授には個別に御審査いただき、合格と判定された。

以上本論文は胸腺内におけるT細胞のpositive selectionに対して、TCRの一つ $V\beta 17a^+$ の割合と、H-2クラス I 分子のタイプ間に直接的な相関を見出し、長い間実態の不明であった胸腺内選択過程の実像を明らかにした点で、博士の学位に相当すると判定した。