

学 位 論 文 題 名

骨髓移植キメラマウスを用いた、胸腺内自己反応性
T細胞クローン消去機構の解析

学位論文内容の要旨

I 研 究 目 的

骨髓移植は白血病その他の病気の治療法として、重要性が増している。一方、その際の重大な副作用であるGVHR（移植片対宿主反応）が臨床上問題となっている。本研究では、骨髓移植マウス（骨髓キメラマウス）を用いて、1.ドナー骨髓より分化する胸腺細胞の宿主に対する寛容獲得機序、2.GVHRによる胸腺内寛容誘導の障害、について検討した。骨髓キメラマウスの胸腺細胞分化は、胎生期の様式と類似すると考えられているので、本研究の結果は、生理的な自己寛容誘導、維持メカニズムにも応用できる。また、GVHRに関しては、ヒト骨髓移植後の慢性GVHRの機序の解明の基礎データとなり得ると考えられる。

II 実 験 材 料 と 方 法

実験デザインは、まずマイナー組織適合抗原の一つMls-1 抗原が異なるマウス間で骨髓キメラを作成後（多くはB10 H-2 コンジェニックマウス (Mls-1^b, Vβ6⁺, Thy1.2) をドナー、AKRマウス(Mls-1^a, I-E⁺, Vβ6⁻, Thy1.1) をレシピエントとした）、Mls-1^a抗原とH-2 クラス II (I-E, I-A) 分子を同時に認識するVβ6T細胞レセプター(TCR)を発現する胸腺細胞の頻度をフローサイトメーターで解析した。Vβ6⁺T細胞は、Mls-1^aかつI-E⁺の細胞に反応するため、Mls-1^a, I-E⁺のマウスでは、消去され自己寛容になることが判明している。また、同様の系で、ヒト骨髓移植

と同様、骨髓移植時少数の成熟T細胞を混入し、胸腺細胞分化への影響を解析した。

1. 骨髓移植：致死量(1000 rad) X線照射したAKR に、ドナーB10系マウスの骨髓細胞 (2.3×10^7 個) を移植した。キメラは [ドナー→レシビエント] と表す。骨髓細胞は抗 Thy-1.2 抗体と補体で処理し、成熟T細胞を除去した(実験によってはCONTROL キメラと表す)。軽度のGVHRを生じさせる時は、骨髓細胞と同時にナイロンウールカラムにより精製した 1×10^5 個の脾臓T細胞を移植した (GVHRキメラと表わす)。

2. 細胞表面抗原の解析：骨髓移植後1週または5-7週の子マウスより、胸腺細胞浮遊液を作成し、抗 Thy-1 抗体または抗 TCR (抗CD3, V β 8, V β 6) 抗体、biotin-抗マウス・ラットIg G抗体, Duochrome、さらに PE-抗CD4, FITC-抗CD8 抗体にて染色後、CD4 $^+$ 8 $^-$ またはCD4 $^-$ 8 $^+$ 細胞上の抗原をFACS解析した。V β 6 $^+$ T細胞上のクラスI発現は、抗 K k , K b , D d 抗体と抗 V β 6 抗体による二重染色により解析した。

3. 免疫組織染色：骨髓キメラマウスの胸腺の凍結切片を作製後、抗 V β 6 抗体、biotin-抗ラットIg 抗体、ABC キット、DAB にて染色した。

Ⅲ 結 果

1. 骨髓キメラマウスにおける自己反応性 V β 6 $^+$ 胸腺細胞消去のメカニズム

CD4 $^+$ 8 $^-$ 及びCD4 $^-$ 8 $^+$ 胸腺細胞中のV β 6 $^+$ 細胞の頻度は、ドナーがI-E $^+$ のB10.BR, B10.AQR (AQR), B10.D2、レシビエントがAKRの時、それぞれ $0.6 \pm 0.2\%$, $0.9 \pm 0.2\%$, $2.0 \pm 0.2\%$ と、正常ドナーマウスの6-10%と比較してほぼ完全に消去されていた。一方、ドナーがI-E $^-$ のB10.G (I-A g), B10 (I-A b), B10.A (4R) (I-A k) では、それぞれ $6.9 \pm 0.8\%$, $4.3 \pm 0.5\%$, $2.9 \pm 0.1\%$ と V β 6 $^+$ 細胞が消去されないか、消去程度が小さかった。これら V β 6 $^+$ 細胞の頻度は、以後終生変化しなかった。宿主及び胸腺上皮細胞が同一条件でも、ドナーがI-E $^+$ の時のみ完全にV β 6 $^+$ 細胞が消去されたことから、自己反応性クローン消去には骨髓由来 I-E $^+$ 細胞が重要であることが証明された。また、I-E $^-$ ドナーにおいても、I-Aの型によりV β 6 $^+$ 細胞の割合が変化したことから、宿主由来のMIs-1 * 抗原とドナーのクラスII抗原のaffinityにより、V β 6 $^+$ 細胞の消去の程度が決定されることが判明した。

骨髓由来細胞が $V\beta 6^+$ 細胞の消去に重要であることをさらに明らかにするため、B10とAKRの骨髓を混合してB10に移植し、5週後にB10由来の胸腺細胞(Thy-1.2⁺)中の $V\beta 6^+$ 細胞の頻度を見たところ、ほぼ完全に消去されていた。

以上より、骨髓由来細胞のみで、胸腺細胞のクローン消去が達成されることが明らかとなった。

2. 骨髓移植後1週にGVHRキメラマウスの胸腺内で生じた急性GVHR

GVHRが胸腺に及ぼす影響を調べるために、T細胞と骨髓を移植したGVHRキメラ[AQR→AKR]と、骨髓のみ移植したCONTROLキメラで胸腺のT細胞のThy-1アロタイプ、及びTCR頻度を調べた。移植後1週にGVHRキメラの胸腺には、ドナー由来(Thy-1.2⁺)の $CD4^+8^-$ 、 $CD4^-8^+$ 細胞が増加していた(それぞれ46.7%, 47.1%)。これら成熟型胸腺細胞は、CONTROLキメラでは全く見られなかったことから、移植時混入した成熟T細胞と考えられた。さらにこのGVHRキメラの $CD4^+8^-$ 、 $CD4^-8^+$ 細胞のTCRを解析したところ、ドナー型 $V\beta 6^+$ 細胞が有意に増加していた(56.5%, 43.1%)。これらの $V\beta 6^+$ T細胞は大型のプラスト様細胞で、宿主のMls-1^a抗原に反応して増加したと考えられた。組織学的にも胸腺実質内に $V\beta 6^+$ T細胞の増加が確認された。

以上より、骨髓移植時T細胞を少数混入させた骨髓キメラマウスにおいては、移植後初期に胸腺内で宿主抗原(Mls-1^a)に対する急性GVHRが生じることが判明した。

3. GVHRキメラマウスにおける $V\beta 6^+$ T細胞消去機構の破綻

次に、移植後早期の胸腺内GVHRのT細胞分化に与える影響を調べるために、移植後5週のCONTROLとGVHR[AQR→AKR]キメラマウスの胸腺を解析した。前にも示したようにCONTROLキメラでは $V\beta 6^+$ 細胞は消去されていたが、GVHRキメラではAQRドナーマウスとほぼ同頻度の $V\beta 6^+$ 細胞が出現した($CD4^+8^-$ 細胞で $8.6 \pm 0.3\%$ 、 $CD4^-8^+$ 細胞で $14.4 \pm 0.9\%$)。これらの自己反応性T細胞は5週以降も同じ頻度で存在した。

これらの $V\beta 6^+$ 細胞が骨髓から分化した細胞であることを明らかにするため、GVHR[AQR

→AKR]で骨髄移植時(B10×AQR)F₁のT細胞を加える実験を行った。移植後1週に胸腺内で増殖したVβ6⁺細胞はF₁T細胞由来、移植後5週に出現したVβ6⁺細胞はAQR骨髄由来のクラスI発現パターンを示した。

以上より、移植後初期の胸腺内GVHRの影響で、胸腺細胞分化の際、自己反応性Vβ6⁺T細胞消去機構が障害されることが判明した。

IV 考 察

本研究ではまず、骨髄由来クラスII陽性細胞（おそらくマクロファージ、樹状細胞）が、胸腺内の自己反応性クローン消去に重要であることを示した。さらに、胸腺が骨髄移植後初期のGVHRの標的臓器となり、その結果自己反応性クローン消去機構が障害されることを初めて明らかにした。本研究ではT細胞の標的抗原となる自己抗原成分は、マウス固有のスーパー抗原、Mls-1^a（マウス内在性ウィルス遺伝子産物）だが、ヒト骨髄移植の際もヒトの自己抗原に対して同様な寛容機構の障害が生じ得ると考えられる。ヒトでは、骨髄移植後3カ月以降に発症する慢性GVHRという病態が報告されている。慢性GVHRは急性GVHR後に発症することが多く自己免疫病様の病態を示す場合があることから、本研究で示した胸腺内急性GVHRの結果、骨髄前駆細胞より新たに産生された自己反応性T細胞が、この病態に関与する可能性が考えられた。

V 結 語

B10 H-2 コンジェニックマウス(Mls-1^b)とAKR (Mls-1^a)間で種々の骨髄キメラマウスを作成し、胸腺内クローン消去（Vβ6⁺T細胞）に骨髄由来クラスII陽性細胞が重要な役割を果たすことを示した。また、この自己寛容誘導機構がGVHRにより障害されることが判明した。

以上より、ヒト骨髄移植後の急性GVHRによる胸腺機能障害が、慢性GVHRや移植片対白血病(GVL)反応等に関与する可能性が推察された。

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

骨髄移植キメラマウスを用いた、胸腺内自己反応性T細胞クローン消去機構の解析

T細胞は、胸腺内で分化・成熟する過程でnegative selectionを受け、自己抗原反応性クローンは消去または不活化される。本論文は骨髄移植キメラマウスを用いて、自己抗原反応性T細胞が消去される機構を明らかにし、また骨髄移植後の重大な副作用であるGVHRの新しい発症メカニズムを提唱した。

Mls-1^a抗原は、マウスのマイナー適合抗原の一つである。T細胞抗原レセプター（以下TCR）のβ鎖V領域産物の一つVβ6⁺T細胞はMls-1^aとH-2 クラスII分子であるI-E 抗原に反応する。したがって、Mls-1^aとI-E 陽性マウスの胸腺内では自己反応性Vβ6⁺T細胞は消去され、その結果自己免疫反応が生じない。

申請者は、Mls-1^bでVβ6⁺T細胞が約10% 存在するマウス系をドナー、Mls-1^a, I-E 陽性でVβ6⁺T細胞の存在しないAKR をレシピエントとして、骨髄移植を行った。その後、経時的にTCR Vβ usage をファックスキャンで解析し、その結果、Vβ6⁺胸腺細胞はドナーマウスがI-E⁺系である時に完全に消去されることが判明した。これらの clonal eliminationは骨髄移植後2~3 週の間を生じ、またelimination の場所は胸腺髄質であった。したがって、レシピエントのMls-1^a抗原が、胸腺髄質内のドナー由来I-E⁺細胞上に提示され、これらがVβ6⁺胸腺細胞を消去したと考えられた。

一方骨髄移植時に、少数のドナー型成熟型T細胞を混入し、軽度のGVHRを誘導したAKR レシピエント胸腺内には、移植後1週目に成熟T細胞由来のV β 6⁺T細胞が多数、反応性に増殖していることが判明した。これらはドナーT細胞の50%以上を占めた。移植5週以後でもこれらV β 6⁺T細胞は胸腺内に認められた。しかしその割合は、骨髄ドナーマウスと同程度の割合にまで低下しており、これらV β 6⁺T細胞は、骨髄内の前駆細胞よりAKR レシピエント胸腺内で新たに分化してきたものであることが判明した。つまり、急性GVHRによって胸腺内のclonal elimination誘導機構が障害され、本来消去されるべきV β 6⁺T細胞が胸腺内で産生されたと考えられた。

これらの結果から、骨髄移植患者で移植後長期間を経て発症する慢性GVHRは、移植成熟T細胞の直接反応による急性GVHRと異なり、レシピエント内で新たに産生された自己抗原反応性T細胞による自己免疫であることが示唆された。

発表に際し、柿沼教授よりclonal eliminationを受ける胸腺細胞の分化時期などにつき質問があったが、申請者は大概適切に解答したと判断された。また副査の柿沼、上出両教授には、個別に審査を受け、合格と判定された。

以上、本論文は自己反応性T細胞の胸腺内negative selectionのメカニズムを明らかにし、また骨髄移植後に認められる慢性GVHR誘導の新たな機序を初めて提唱した。よって、博士の学位に値すると判定した。