

学 位 論 文 題 名

Functional and phenotypic analyses of thymic low density
adherent cells from murine bone marrow chimeras
—Influence on thymocyte differentiation—

（骨髄キメラマウスの胸腺内低比重付着細胞の機能及び
表現形の解析—胸腺細胞分化に対する影響—）

学位論文内容の要旨

I. 研究目的

胸腺基質（ストローマ）細胞は、胸腺細胞（リンパ球）の分化において重要な役割を果たしている。しかし、胸腺ストローマ細胞の数は、胸腺細胞と較べて非常に少ないため、現在まで詳細な解析はされていない。著者の教室では、C3H マウスをレシピエントとした骨髄移植キメラにおいては、胸腺細胞の分化過程に抑制機構が働くこと、この抑制は C3Hマウス胸腺ストローマ細胞の機能に起因することを示唆する結果を報告している。今回の研究は、C3Hと他のマウスの間で骨髄移植を行い、この抑制効果のメカニズムに関与する胸腺ストローマ細胞の解析を行うことを目的として行われた。

II. 研究方法

1. 骨髄キメラマウス：AKR マウスは米国Jackson 研より購入した。C3H/He, C57BL/10, B10. BRマウスは静岡実中検より購入した。骨髄キメラは、10Gy照射レシピエントに 2×10^7 個の T 細胞除去骨髄細胞を移植し、作製した。以下【ドナー→レシピエント】と表す。

2. 胸腺低比重付着性細胞の作製：胸腺組織を細切後、Freshneyの方法に従い、コラーゲナーゼ、DNaseで処理し、パーコール濃度勾配に載せ、遠心して分離した。その後、抗Thy-1抗体と補体処理でT細胞を完全に除去し、プラスチックシャーレ付着細胞をlow density adherent cell (LDAC)とした。
3. 免疫染色：骨髓キメラのキメリズムは、抗Thy-1, Ly-1, I-E (ISCR III), Mac-1、及び当教室で確立した胸腺髓質ストローマ細胞に対するHIF 単クローン抗体を用い、フローサイトメトリー、及び免疫組織染色によって確認した。またLDACの表現形は、ISCR III、抗B220, Mac-1, FcR III (2.4G2) 単クローン抗体によって染色し、フローサイトメトリーで解析した。
4. IL-1計測：胸腺LDACに1 μ g/mlのLPSを加えて培養した。培養上清中のIL-1活性は、形通りC3H/Heの胸腺細胞のPHAに対する増殖反応によって計測した。
5. 胸腺細胞刺激：96穴プレート上の固相化抗CD3抗体(2C11)、または液相2C11と各種アクセサリー細胞(ACC)とによって胸腺細胞を刺激し、 3 H-サイミジン取り込みを計測した。また実験によっては、培養中にプロスタグランジン、またはインドメタシンを加え、その影響を見た。
6. T細胞ハイブリドーマ刺激：ハトチトクロームc関連ペプチド抗原(46D50E54R) 特異的、I-A*拘束性のハイブリドーマ、KE17.1、を抗原とACC、または2C11とACCによって刺激した。反応は培養上清中のIL-2をIL-2依存性細胞ライン、CTLL-2、に加え、その 3 H-サイミジン取り込みで計測した。

III 結果

1. 胸腺細胞のキメリズムと抗CD3(2C11)抗体に対する反応性：[C3H $\rightarrow$ AKR], [AKR $\rightarrow$ C3H]キメラの胸腺リンパ球は、骨髓移植5週以後完全にドナー側に置換していた。2C11に対する反応性は、正常AKRがC3Hより高く、また[C3H $\rightarrow$ AKR]キメラ胸腺細胞は、[AKR $\rightarrow$ C3H]より高い増殖反応を示し、キメラの反応性はレシビエントタイプになることが判明した。
2. 胸腺LDACの表現形：キメラより得た、LDACの表面抗原発現パターンをFACSCAN、免疫組織染色によって解析した。キメラLDACのキメリズムは、[B10 $\rightarrow$ AKR]を用いて解析したが、髓質のI-E*細胞、またLDACのうちMac-1*細胞は、殆どドナー側の細胞に置

換していた。また正常AKR, C3H、及び[C3H→AKR]、[AKR→C3H]キメラのLDACの大部分はI-E⁺で、B220⁺（B細胞）、Mac-1⁺（マクロファージ）の割合が著明に増加していた。特に正常C3H マウス、[AKR→C3H]キメラでは、それぞれAKR、[C3H→AKR]よりMac-1⁺細胞の割合が高く、Mac-1⁺細胞の割合はレシビエントタイプになることが判明した。

3. 胸腺LDACのIL-1産生：LDACをLPS で刺激して、IL-1産生能を比較した。正常C3H のLDACは、AKR マウスよりIL-1産生が高く、また[AKR→C3H]キメラLDAC上清は、[C3H→AKR]より高いIL-1活性を示した。つまり、IL-1産生能は、C3H 胸腺内で分化したLDACが高く、これらはLDAC中のマクロファージの割合と相関した。
4. 胸腺LDACの抗原提示能：2C11、またはペプチド抗原(46D50E54R) に対するKE17.1T細胞ハイブリドーマ反応における、LDACの抗原提示能を比較した。正常C3H マウスはAKR より高く、また[AKR→C3H]キメラも[C3H→AKR]キメラより高い抗原提示活性を示した。従って、抗原提示能もレシビエントタイプに影響されることが判明した。
5. 胸腺細胞のプロスタグランディンに対する感受性：胸腺細胞を固相化2C11で刺激する培養中に、階段希釈したプロスタグランディン(PGE1、PGE2) を加えた。PGE1、PGE2 によって胸腺細胞の反応は抑制されたが、PGE-2 に対する感受性は、C3H がAKR より高く、また[AKR→C3H]キメラは[C3H→AKR]キメラより高かった。PGE1に対する感受性では、各マウス間で一定の傾向が認められなかった。また、[C3H→AKR]と[AKR→C3H]キメラ胸腺細胞を2C11で刺激する培養中にインドメサシンを加えると、[AKR→C3H]の反応はインドメサシンの濃度依存性に増加したが、[C3H→AKR]ではほとんど影響がなかった。[AKR→C3H]の反応は、インドメサシン8 μ g/ml以上で、ほぼ[C3H→AKR]キメラと同じ反応性になった。これらの結果から、[AKR→C3H]胸腺細胞の2C11に対する低反応性は、PGE2の影響によることが示唆された。

IV 考 察

C3H, [AKR→C3H]の胸腺は、AKR, [C3H→AKR]と比べて、細胞数にして約1/10であり、C3H の胸腺ストローマには、胸腺細胞の増殖を抑える何らかの抑制機構が存在すると

考えられた。実際[AKR→C3H]キメラの胸腺細胞は、[C3H→AKR]と比べて抗CD3 抗体の2C11に対する反応性が著明に低かった。今回これらC3H, AKR マウス、及び[C3H→AKR]、[AKR→C3H]キメラを用い、これらの胸腺ストローマ細胞の機能と表現形を解析した。この実験では胸腺ストローマ細胞として、LDACを実験に用いた。LDACは、大部分がI-E*でB細胞、マクロファージより構成されていた。C3H, [AKR→C3H]キメラより得たLDACには、それぞれAKR, [C3H→AKR]と比べて有意にMac-1*細胞が多く、またこれらのIL-1産生も高かった。T細胞ハイブリドーマに対する抗原提示能も、C3H または[AKR→C3H]、すなわちC3H 胸腺内で分化したLDACの活性が高かった。これらの結果から、胸腺ストローマ中のマクロファージの割合、機能が低い時(C3H型)、胸腺リンパ球の増殖反応が抑制されることが示唆された。実際[AKR→C3H]キメラ胸腺細胞は、[C3H→AKR]と比べてPGE2に対する感受性が高く、また[AKR→C3H]胸腺細胞の2C11に対する低反応性は、PGE2のインヒビターであるインドメサシン添加によって解除され、[AKR→C3H]胸腺細胞は、[C3H→AKR]とほぼ同じ反応性にまで回復した。これらのことは、胸腺マクロファージの相対的活性状態が亢進している時には、これらよりPGE2などの増殖抑制因子が分泌され、生体内においても胸腺リンパ球の増殖を制御していると考えられた。しかし、同じマクロファージが産生するIL-1などの増殖促進因子と、PGE2との関係については今後に残された問題である。

V 結 語

C3H マウス胸腺内で分化した胸腺リンパ球は、AKRマウス胸腺で分化したものとは比べ、in vitroの抗CD3 抗体刺激に対して低反応性を示した。これとは逆にC3H 胸腺内で分化したLDAC、特にマクロファージ活性は、AKRのものとは比べて高かった。これら胸腺リンパ球とマクロファージ活性間に認められる逆相関の反応パターンは、マクロファージの分泌するPGE2によ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

Functional and phenotypic analyses of thymic low density
adherent cells from murine bone marrow chimeras
—Influence on thymocyte differentiation—

(骨髄キメラマウスの胸腺内低比重付着細胞の機能及び
表現形の解析 —胸腺細胞分化に対する影響—)

T細胞は胸腺内で増殖・分化する過程で、種々の刺激に対する反応性を獲得する。その際、胸腺支質細胞は、重要な役割を果たすと考えられているが、支質細胞の機能を客観的に評価する方法が確立されていないなどの制約のため、これらの細胞の役割の詳細については不明な点が多い。

本論文においては、遺伝的に胸腺のサイズが小さく、また加齢とともに速やかに胸腺が萎縮するC3H マウスと、大型の胸腺を持ち、比較的長期にわたって大きさを保持する、AKR胸腺支質細胞の機能をin vitroで解析した。

実験材料としては、AKR, C3H, B10そしてB10.BR間で作製した骨髄キメラを用いた。これらのキメラより胸腺リンパ球、及び低比重付着性細胞（以下LDAC）を得、機能を解析した。

胸腺リンパ球、及び胸腺内H-2 クラスII陽性細胞は、移植後3週以降には全てドナー側細胞に置換していた。C3H をレシピエントとしたキメラ胸腺リンパ球は、抗CD3 抗体による刺激に対して、強い増殖反応を示さなかったが、AKR をレシピエントとした場合には著明な増殖反応が認められ、C3H 胸腺においては、胸腺リンパ球に対して何らかの抑制機序が働いていることが示唆された。

胸腺より得たLDAC中のMac-1⁺細胞の割合は、C3H マウス、及びC3H をレシピエントとしたキメラで、AKR、及びAKR レシピエントキメラより高かった。また同様に、LPS刺激に対するIL-1産生も、C3H、及びC3H レシピエントキメラのLDACで、高かった。この傾向は抗CD3 抗体、またはペプチド抗原に対するTハイブリドーマ細胞反応における抗原提示能においても認められ、C3H 胸腺内のLDACはAKR と較べて有意に高い抗原提示機能を示した。

以上より、胸腺内マクロファージの機能亢進が胸腺リンパ球の分化に抑制的に働いていると考えられた。そこで、キメラ胸腺細胞の抗CD3 抗体と抗原提示細胞に対する反応系に、プロスタグランディンE₂（以下PGE₂）を加えたところ、C3H 胸腺内で分化したリンパ球がAKR のものと較べ強く抑制され、これらがPGE₂に対して感受性が高いことが判明した。またこの反応系に、PGE₂のインヒビターであるインドメサシンを加えると、C3H レシピエントキメラの胸腺細胞は、濃度依存性に反応性を増加させたが、AKR レシピエントキメラの胸腺細胞には増加が認められず、インドメサシン8 μ g/ml以上では両者の抗CD3 抗体に対する反応性に差が認められなくなった。

以上の結果は、AKR マウスと較べてC3H 胸腺内に多数認められるマクロファージ型の細胞が、PGE₂を介して胸腺リンパ球の分化・反応性を制御していることを示すものと考えられた。

論文発表に際し、柿沼教授より胸腺内抗原提示細胞の機能が、個々の細胞の機能レベルを反映しているのか、インドメサシンを生体に投与する実験を行なったかについて質問があったが、申請者は大概適切な解答を成しえた。また柿沼、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、本論文は胸腺支質細胞の機能と胸腺リンパ球の機能分化の関係の詳細を初めて明らかにした。よって、博士の学位に値すると判定した。