

学 位 論 文 題 名

〔B 6 - 1 pr→B 6〕脾細胞移入系における
急性期移植片対宿主様反応の解析

学位論文内容の要旨

緒言

自己免疫疾患において、数多くのリンパ球の異常が報告されている。その異常が免疫系全体のバランスを崩し、自己免疫疾患発症へと導いていくと考えられている。それでは、リンパ球の異常は幹細胞の時からすでに規定されているものなのであるのか、あるいはリンパ球が分化成熟する過程での”リンパ球分化の場”の異常によるものであるのか？この問題に対する回答を得るために、自己免疫疾患モデルマウスを用いた骨髄移植実験が行なわれた。その結果、自己免疫疾患発症が単一劣性遺伝子 lpr に起因するMRL- lpr マウスを除いて、幹細胞レベルでのリンパ球の異常が認められた。これに対して、MRL- lpr マウスの場合、正常マウスとの間で互いに骨髄移植を行なっても、リンパ球は生着しなかった。さらに、B6- lpr マウスの脾細胞をB6マウスに移入すると、 lpr 遺伝子の差異のみで、急性期にCD8⁺細胞が著明に増殖するGvH様反応が観察された。本研究では、この現象を解析することで lpr 遺伝子の本体に迫ろうと考えた。

材料と方法

1. マウスと抗体

B6- lpr , C3H- lpr , B6-gld, B6-Thy1.1 マウスの breeding pairs と MRL- lpr マウスはJackson研究所より購入した。B6, B10, B10.BR, B10.D2, MRL-+マウスは静岡県実験動物農協より購入した。(B6- lpr x MRL- lpr)F₁, (B6 x MRL-+)F₁, B6- lpr -Thy1.1マウスは当教室で作製した。

FITC-抗CD8抗体,PE-抗 CD4抗体,biotin-抗Thy1.2抗体は米国Becton-Dickinson社より購入した。FITC-抗Thy1.1抗体は当部門で作製した。抗Thy1.2抗体,抗Lyt2.2抗体,抗L3T4抗体,抗B220抗体と抗ラットIg κ 鎖抗体は補体依存性細胞障害に用いた。

2. 供与者細胞の分画とキメラマウスの作製

供与者脾細胞をモノクローナル抗体と補体による細胞障害法で特定のサブセットに分画した。分画した細胞の純度は90%以上であった。前日、9 Gyの全身X線照射を宿主マウスに行い、未処理の、あるいは分画した供与者脾細胞を静注し、キメラマウスを作製した。

3. 細胞表面抗原の検索

脾細胞にFITC-抗CD8抗体とPE-抗CD4抗体あるいはFITC-抗CD8抗体とbiotin標識抗体を加え4°Cで30分間、静置した。biotin標識抗体を用いた場合は細胞を遠心し、上清を捨てた後、さらにstreptavidin-PEを加え4°Cで30分、静置した。その後、propidium iodideを加えて遠心し、細胞をPBSに浮遊させFACScanにて解析した。

4. 細胞増殖抑制活性の測定

B6マウスの脾細胞(2.5x10⁵/穴)と30GyのX線を照射したキメラマウスの脾細胞(2.5x10⁵/穴)を96穴マイクロプレート中でCon A 4 μ g/mlまたはLPS 50 μ g/mlの存在下で混合培養し、ハーベットの6時間前に³H-TdRでパルスし、その取り込み量により増殖抑制能を測定した。可溶性因子による細胞抑制活性の測定は、ミリセルを用いて下層にB6マウスの脾細胞を上層にキメラマウスの脾細胞をLPSと共に3日間培養し増殖抑制活性を測定した。

5. Reverse transcriptase - PCR

5x10⁶個のキメラマウス脾細胞からRNAを抽出し、1サンプルあたり20ngのRNAから逆転写酵素によりcDNAを作製後、PCRを27サイクル行なった。PCR産物を4%アガロース上で電気泳動を行なった後、エチジウムブロマイドで染色し、紫外線下で目的のバンドを確認した。

結果

[MRL-lpr \rightarrow MRL-+],[C3H-lpr \rightarrow C3H],[B6-lpr \rightarrow B6]の脾細胞キメラマウスを作製し、急性期GvH様反応の解析を行なった。[B6-

lpr → B6]キメラマウスでは移植10日目に脾細胞数の90%を占める著明なCD8⁺細胞の増殖がみられたが、他の2系統では認められなかった。この差異は系統間のMHCの差異に基づくものではなく、B6あるいはB10系マウスの背景遺伝子の差異に基づくものであることが判明した。また、lprマウスと同様の病態を示すgldマウスを供与者に用いても、この様なGvH様反応は認められなかった。

キメラマウスで増加しているCD8⁺細胞が増殖するために、供与者のB220⁺細胞とCD8⁺細胞が必須であった。どちらの細胞群がキメラCD8⁺細胞の前駆細胞であるか同定するために、B6-lpr-Thy1.1マウス由来のCD8⁺細胞とB6-lpr(Thy1.2)由来のB220⁺細胞とを混合してB6マウスに移植したところ、B6-lpr-Thy1.1マウス由来のCD8⁺細胞が前駆細胞あることが判明した。

[B6-lpr → B6]キメラマウスの脾細胞は正常マウスのマイトジェンに対する増殖反応を抑制することが報告されている。本研究では、この抑制反応とCD8⁺細胞の関係について解析した。Con A増殖反応に対する抑制には反応細胞とキメラ脾細胞との細胞間接触が必須であった。しかし、LPS増殖反応に対する抑制は細胞間接触による部分と可溶性因子による部分とがほぼ同定度であった。また、この可溶性因子の大部分はIFN- γ であった。

次に、増殖反応抑制活性を担っている細胞について検討した。キメラ脾細胞をCD8⁺細胞とCD8⁻細胞に分離し、それぞれの抑制活性を検討した。Con A反応抑制にはCD8⁺細胞のみが関与していたが、LPS反応抑制にはCD8⁺細胞とCD8⁻細胞の両者が必須であった。

キメラ脾細胞がIFN- γ の他にどのようなサイトカインを産生しているかを検討するためにPT-PCR法を用いてIL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IFN- γ , TNF- α , TNF- β のmRNAの発現を検索した。CD8⁺細胞からはIFN- γ のmRNAが、CD8⁻細胞からはTNF- α のmRNAが検出された。

考察

急性期lpr-GvHでB6-lprマウスを供与者として用いた際にのみ、著明なCD8⁺細胞の増殖がみられたのはB6マウスの背景遺伝子の影響によるものであった。実際にB6マウスのCD8⁺細胞の増殖能が他の系

統に比して高いことが報告されている。

lpr マウスと同様の病態を示すgld マウスは正常マウスに存在する lpr-GvH起因性の刺激に関しては無反応であり、むしろ正常マウスと同様に lpr-GvHを惹起させる抗原もしくは環境を内在していることが示唆された。

Buddらは B220⁺T 細胞を PMAとIL-2の存在下で培養するとこの細胞がCD8⁺細胞に分化すると報告したが、このキメラマウスで増殖しているCD8⁺細胞は供与者のCD8⁺細胞がそのまま増殖したものであった。

CD8⁺細胞からIFN- γ が産生される事が判明したが、蛋白レベルではこの細胞の培養上清からIFN- γ は検出されないことが報告されている。しかし、RT-PCR法では、この脾細胞からIFN- γ のmRNAが検出されたので、定法の検出感度以下のIFN- γ がキメラ脾細胞より産生されている可能性が示唆された。

lpr-GvH におけるCD8⁺細胞の増殖を従来の GvHの概念で考えると、正常マウスに lprマウスで欠損している抗原(lpr関連抗原)を想定し、その抗原をlpr CD8⁺細胞が認識して増殖していると考えることができる。しかもこの場合 lprリンパ球と正常リンパ球でリンパ球混合反応の起こらないこと、供与者と宿主の MHCが異なっても MHC 不適合の GvH反応ではみられない著明なCD8⁺細胞の増殖が起こることから、供与者の抗原提示細胞が宿主の lpr関連抗原を提示し、それをCD8⁺細胞が認識していると推測された。

結論

B6-lprマウスを用いた lpr-GvHにおいて、CD8⁺細胞が B220⁺細胞の存在下で増殖し、IFN- γ を産生して、2次リンパ組織の線維化を引き起こす可能性が示唆された。このCD8⁺細胞はB6あるいは B10系マウスに存在する抗原もしくは環境を認識して増殖していると考えられた。そして、この抗原もしくは環境が lprマウスと正常マウスの差異である可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 出 利 光
副 査 教 授 小 山 富 康
副 査 教 授 小 野 江 和 則

学位論文題名

[B6-lpr→B6] 脾細胞移入系における急性期移植片対宿主様反応の解析

ヒト自己免疫疾患モデルマウスであるMRL-lprマウスに発症する自己免疫疾患は単一の劣性遺伝子、lpr遺伝子によって規定されており、MRL-lprマウスは全身リンパ節腫脹、血管炎、関節炎、自己抗体産生等の病態を示す。

著者は、lpr遺伝子の機能解析を行なうため、lpr遺伝子によって規定される移植片対宿主宿主（G v H）様反応の解析を行なった。

lpr遺伝子を持つB6-lprマウスの脾細胞を、X線照射したlpr遺伝子を持たない正常B6マウスに移入すると移植後10日目にピークを示すCD8陽性T細胞の著明な増加がみられ、CD8陽性T細胞がG v H様反応を惹起していることを明らかにした。

増加するCD8陽性T細胞はlprマウスのCD8陽性T細胞に由来し、このCD8陽性T細胞増殖のためにはlprマウス由来のB220陽性細胞の存在が必須であった。増加するCD8陽性T細胞には、インターロイキン2受容体 α 鎖やトランスフェリン受容体の発現がなく、しかも一般的なT細胞活性化の際にみられるインターロイキン2やインターロイキン4のT細胞増殖作用を持つサイトカインのmRNAの発現がみられず、このCD8陽性T細胞にユニークな増殖経路が存在する可能性を示した。また、このCD8陽性T細胞はlprマウス由来にもかかわらず、lprマウスの異常T細胞に発現する、J11d抗原やB220抗原の発現がみられないことを明らかにした。

脾におけるG v H様反応はリンパ球の著明な減少と脾の線維化であり、移入後3週目に完成する。10日目に増殖のピークを示すCD8陽性T細胞はコンカナバリンAに対する正常マウスT細胞の増殖反応を細胞間接触を介して強く抑制した。また、リポポリサッカライドに対する正常マウスB細胞の増殖反応を、IFN- γ の産生と細胞間接触を介して抑制していることを見いだした。さらにReverse Transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)法を用いて、IFN- γ がCD8陽性T細胞から産生されていることを示し、これがG v H様反応を惹起している可能性を示した。

CD8陽性T細胞の増殖は、脾細胞の供与者と宿主の主要組織適合抗原(MHC)が異なることによるG v H反応では認められず、B6-lprマウスのCD8陽性T細胞が正常B6マウスの未知の抗原(lpr関連遺伝子産物)を認識して増殖していることを明らかにした。このlpr関連遺伝子産物はlprマウスでは欠損しており、このlpr関連遺伝子産物がlprマウスと正常マウスの根本的差異のひとつである可能性が示唆された。

論文発表に際し、小山教授よりヒトの膠原病で単一劣性遺伝子により発症するケースが多いか、小野江教授、本間教授より移植片対宿主様反応はgldマウスで起きるか、また、CD8陽性T細胞増加におけるB220陽性細胞の役割とその特徴等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、副査の小山、小野江両教授には個別に御審査いただき、合格と判定された。

以上本論文は単一劣性遺伝子、lpr遺伝子によって自己免疫疾患を発症するB6-lprマウスをもちいて、lpr遺伝子およびlpr関連遺伝子産物によって、G v H様反応が惹起されることを明らかにした。また、G v H様反応を引き起こす直接の原因はlpr遺伝子を持つCD8陽性T細胞がlpr関連遺伝子産物を認識して増殖することにある点を明らかにした。

以上の結果に基づき、博士の学位に相当すると判定した。