

学 位 論 文 題 名

Characterization of Large Granular Lymphocytes Differentiated
in vitro by Interleukin 3.

（ I L - 3 により試験管内において分化した
大顆粒リンパ球の性状解析）

学位論文内容の要旨

末梢血およびリンパ臓器に存在する大部分のリンパ球は、TおよびBリンパ球に分類されうる。これらの細胞は、各々その細胞表面に免疫グロブリン分子あるいはT細胞抗原レセプター（TCR）を発現し、これらの分子を介し抗原を特異的に認識する。しかし、生体にはこれらいずれにも属さない、別のリンパ球集団が存在することが、腫瘍に対する細胞傷害機構の研究過程において明らかにされている。これらの細胞は、1）胸腺の存在しないヌードマウスにも存在すること、あるいは、2）何ら特異的な抗原刺激なしである種の腫瘍細胞やウイルス感染細胞に対して、主要組織適合性抗原（MHC）非拘束性の細胞傷害活性を示すことが特徴としてあげられる。このMHC非拘束性の細胞傷害活性は、細胞傷害性T細胞（CTL）の抗原特異的細胞傷害活性に対してNK活性と呼ばれ、これらの機能を持つ細胞はNK細胞と呼ばれている。

これまでこのNK細胞については生物学的意義を中心に研究が進められてきた。その結果、NK細胞は形態学的には、いずれも細胞質内に特徴的なアズール好性顆粒を有する大顆粒リンパ球（large granular lymphocytes : LGL）であるが、当初考えられたように単一の細胞集団ではなく、異なる免疫学的調節を受けている多様な細胞集団からなることが明らかにされた。さらに、このLGL-NK細胞の機能あるいは、その起源についての解析を行うためにこれらの細胞のクローン化が試みられた。LGLの主要な増殖因子はインターロイキン2（IL-2）であり、LGLを株化する場合、一般に正常動物あるいは適当に刺激した動物の脾細胞（ヒトでは末梢血）をIL-2を含む種々の条件で培地とともに培養する方法によって行われてきた。このようにしてヒトおよびマウスのいくつかのLGL株が報告されてきたが、それらのすべてが必ずしも安定な増殖を示すものではなかった。リコンビナントIL-2（rIL-2）を用いて、その持続増殖

のための条件が検討された結果、LGLの持続増殖にはIL-2のほか、マクロファージ(Mφ)がフィーダー細胞として必要なこと、またその代わりにIL-1も有効であること、さらにこれらはLGLの細胞表面に機能的な高親和性IL-2レセプター(IL-2R)を発現維持させるのに重要な役割を果たしていることが明らかとなった。しかし、MφあるいはIL-1とIL-2の組み合わせによる方法を用いても細胞株樹立の再現性は高くなかった。

そこで申請者はLGLの性状を知る目的でまず安定した増殖を示す細胞株の樹立の方法について検討を行った。その結果、白血病ウイルス(MLV)感染マウスの脾細胞をrIL-2単独で培養することにより100%に近い再現性のあるIL-2依存性LGL株を確立しうることを見出した。これらの細胞株はいずれも、これまで報告されているLGL株と同様の表現形質および機能(NK活性)を有していた。このMLV感染マウスの脾細胞の培養上清中には高いIL-3活性が認められ、それがThy-1⁺CD4⁺CD8⁻のヘルパー/インデューサー型T細胞に由来することから、この細胞の株化にはIL-2ばかりでなくIL-3も関与していることが示唆された。そこで、正常マウス脾細胞およびThy-1⁺細胞を除去した脾細胞をIL-3/IL-2の連続刺激で培養をしたところ、上記と全く同様のLGLの株化に成功した。さらに1個の血液幹細胞に由来すると考えられる単独のIL-3プラストコロニーからも直接LGLを分化させることにも成功した。また、上記のLGL株のIL-2RおよびそのTCR遺伝子の解析を行ったところ、いずれの細胞株も機能的な高親和性IL-2Rを発現していること、またTCRβ鎖遺伝子が再構成していることを認めた。これらのことから、上記LGL株はいずれもT細胞系列の細胞であること、およびこのIL-3/IL-2培養系はin vitroにおけるLGL株の樹立のみではなくT細胞の胸腺外分化を研究する上で有用な系であることが示唆された。

T前駆細胞は胸腺において自己MHC分子拘束性の認識機構を獲得し、機能的T細胞として末梢に出ていくことが知られている。一方、ヌードマウスを用いた実験から、胸腺外分化経路も存在することが明らかにされている。しかし、この胸腺外分化の機構および胸腺外分化したT細胞の遺伝学的特徴などは不明であった。そこでこのIL-3/IL-2培養系を用いて、LGLの個体発生およびT前駆細胞の胸腺外分化能を解析する目的で、様々な発生段階にあるマウスのリンパ造血系臓器から細胞株を樹立し、その遺伝学的性状について解析した。その結果、胎児肝細胞(LFD lines)、15日齢胎児胸腺細胞(FTD15)、新生児脾細胞(SED lines)および成獣脾細胞(SPB lines)からそれぞれIL-2依存性細胞株を樹立することができた。これらの細胞株はその発生段階に依存して様々な表現系を示した。つまり、LFD lines ; Thy-1⁺CD3⁻CD4⁻CD8⁻B220⁺, FTD15 ; Thy-1⁺CD3⁺CD4⁻CD8⁺B220⁻, SED および SPB lines ;

Thy-1⁺CD3⁺CD4⁻CD8⁻B220⁺であった。また、IL-3 プラストコロニーから直接樹立した LGL 株 (IL-3B lines) もこれら SED および SPB lines と同様の表現形質を示した。TCR 遺伝子について解析したところ、LFD lines はすべての TCR 遺伝子 (α , β , γ , δ) が体細胞型 (germ line) であったが、胎生17日目および19日目の肝細胞から樹立した LFD17 および LFD19 では体細胞型転写産物が認められたことから、これらの細胞株はすでに T 細胞系列へ分化することが運命づけられていることが示唆された。これに対して、FTD15 ではすべての TCR 遺伝子の再構成と完全長の TCR α および β 鎖 mRNA の発現が認められた。一方、SED、SPB および IL-3 B 細胞株ではすべての TCR 遺伝子の再構成と完全長の TCR α および β 鎖 mRNA の発現が認められた。これらの結果から、生後脾臓中の前駆細胞は、胎児肝のそれとは異なり in vitro における胸腺外環境で TCR 遺伝子の再構成およびその発現を引き起こす能力を有することが示された。IL-2 R 複合体の発現様式においても LFD lines と他の LGL 株との間に相違が見られた。

以上の研究によりこれまで樹立が困難であった LGL 株が IL-3/IL-2 培養系という非常に簡便な方法で樹立できることが明らかとなった。これらの細胞株は脾細胞に存在する NK 細胞と全く同様の細胞傷害活性を示すことから、NK 細胞の細胞傷害機構特にその MHC 非拘束性認識機構を解明するための有用な道具となりうるものと思われる。さらに T 細胞欠損脾細胞分画および IL-3 プラストコロニーからも同様に LGL 株が樹立できること、またこれらの細胞株はその TCR 遺伝子の解析から、すべて T 細胞系列に属することが明らかとなった。また、この培養系を用いて様々な発生段階のマウスリンパ造血系臓器から樹立した細胞株は、その個体発生の段階に存在する T 細胞の遺伝学的性状を反映していた。これらのことは、この培養系は LGL の分化やその性状のみではなく、T 細胞の胸腺外分化の機構およびそれらの T 細胞の性状を解析するのに有用な系であることを示唆している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 沼 操
副 査 教 授 波 岡 茂 郎
副 査 教 授 清 水 悠紀臣
副 査 教 授 齊 藤 昌 之

末梢血およびリンパ臓器に存在する大部分のリンパ球は、TおよびBリンパ球であるが、これらいずれにも属さない別のリンパ球集団も存在する。この細胞はNK細胞と呼ばれ、主要組織適合性抗原（MHC）非拘束性の細胞傷害活性を示すことが特徴としてあげられる。

NK細胞は形態学的には、いずれも細胞質内に特徴的なアズール好性顆粒を有する大顆粒リンパ球（large granular lymphocytes : LGL）である。このLGL-NK細胞の機能あるいは、その起源についての解析を行うため、これまで数多く細胞株の樹立が試みられてきたが、再現性よく樹立できる方法は確立されていなかった。

申請者はLGL株の樹立方法を確立し、得られた細胞株を用いT細胞の胸腺外分化の機構について検討し本論文にまとめた。本論文は英文55頁からなり、参考論文7編を付している。

申請者はLGLの性状を知る目的でまず安定した増殖を示す細胞株の樹立の方法について検討を行った。その結果、白血病ウイルス（MLV）感染マウスの脾細胞をリコンビナントインターロイキン2（ $rIL-2$ ）単独で培養することにより100%に近い再現性のあるIL-2依存性LGL株を確立しうることを見出した。これらの細胞株はいずれも、これまで報告されているLGL株と同様の表現形質および機能（NK活性）を有していた。このMLV感染マウスの脾細胞の培養上清中には高いインターロイキン3（IL-3）活性が認められ、それが $Thy-1^+CD4^+CD8^-$ のヘルパー／インデューサー型T細胞に由来することから、この細胞の株化にはIL-2ばかりでなくIL-3も関与していることが示唆された。そこで、正常マウス脾細胞および $Thy-1^+$ 細胞を除去した脾細胞をIL-3/IL-2の連続刺激で培養したところ、上記と全く同様のLGLの株化に成功した。さらに1個の血液幹細胞に由来すると考えられる単独のIL-3プラストコロニーからも直接LGLを分化させることにも成功した。上記のLGL株のIL-2レセプター（IL-2R）およびそのT細胞抗原レセプター（TCR）遺伝子の解析を行ったところ、いずれの細胞株も機能的な高親和性IL-2Rを発現していること、またTCR β 鎖遺伝子が再構成していることを認めた。これらのことから、上記LGL株はいずれもT細胞系列の細胞

であること、およびこの IL-3/IL-2 培養系は T 細胞の胸腺外分化を研究する上でも有用な系であることが示唆された。

次にこの IL-3/IL-2 培養系を用いて、LGL の個体発生および T 前駆細胞の胸腺外分化能を解析する目的で、様々な発生段階にあるマウスのリンパ造血系臓器から細胞株を樹立し、その遺伝学的性状について解析した。その結果、胎児肝細胞(LFD)、15日齢胎児胸腺細胞(FTD15)、新生児脾細胞 (SED) および成獣脾細胞 (SPB) からそれぞれ IL-2 依存性細胞株を樹立することができた。これらの細胞株はその発生段階に依存して様々な表現形を示した。つまり、LFD ; Thy-1⁺CD3⁻CD4⁻CD8⁻B220⁺, FTD15 ; Thy-1⁺CD3⁺CD4⁻CD8⁺B220⁻, SED および SPB ; Thy-1⁺CD3⁺CD4⁻CD8⁻B220⁺であった。また、IL-3 プラストコローニーから直接樹立した LFD 株 (IL-3 B) もこれら SED および SPB と同様の表現形質を示した。TCR 遺伝子について解析したところ、LFD はすべての TCR 遺伝子 (α , β , γ , δ) が体細胞型であったが、胎生17日および19日目の肝細胞から樹立した LFD17および LFD19では体細胞型転写産物が認められたことから、これらの細胞株はすでに T 細胞系列へ分化することが運命づけられていることが示唆された。これに対して、FTD15ではすべての TCR 遺伝子の再構成と完全長の TCR α および β 鎖 mRNA の発現が認められた。一方、SED、SPB および IL-3 B 株ではすべての TCR 遺伝子の再構成と完全長の TCR α および β 鎖 mRNA の発現が認められた。これらの結果から、生後脾臓中の前駆細胞は、胎児肝のそれとは異なり in vitro における胸腺外環境で TCR 遺伝子の再構成およびその発現を引き起こす能力を有することが示された。IL-2 R 複合体の発現様式においても LFD と他の LGL 株との間に相違が見られた。

以上の成績のように申請者は、LGL 株が IL-3/IL-2 培養系という非常に簡便な方法で樹立できることを明らかにした。また、この培養系を用いて様々な発生段階のマウスリンパ造血系臓器から樹立した細胞株は、その個体発生の段階に存在する T 細胞の遺伝学的性状を反映していることを明らかにした。この研究は、LGL の分化やその性状のみならず、T 細胞の胸腺外分化の機構およびそれらの T 細胞の性状を解析するのに重要な知見を提供するものである。よって審査員一同は服部雅一氏が博士 (獣医学) の学位を受けるのに十分な資格を有すると認めた。