

学 位 論 文 題 名

gp90^{MEL-14}発現T細胞の分布と機能

学位論文内容の要旨

I. はじめに

リンパ球のリンパ節組織内への移動は、高内皮細胞静脈（HEV）を介して行われる。この高内皮細胞との特異的接着で働くリンパ球表面構造は、ホーミングレセプターと呼ばれ、MEL-14単クローン抗体によって gp90^{MEL-14}分子が同定されている。このようにリンパ球と末梢リンパ節 HEV との接着機構が、分子レベルで解明されてきたが、通常の条件下ではリンパ球上の gp90^{MEL-14}抗原発現パターンが急速に変化するため、各リンパ組織細胞が、生体内で実際の程度の gp90^{MEL-14}抗原を発現しているかについては、一定の見解が得られなかった。著者は gp90^{MEL-14}の modulation を止めることにより、各リンパ組織細胞上の実際の gp90^{MEL-14}発現量を測定することに成功した。また末梢リンパ節T細胞の90%以上は gp90^{MEL-14}を発現しているが、gp90^{MEL-14}陰性細胞も少数存在しており、これらの機能が近年注目されている。今回の研究においては、種々のリンパ組織細胞の gp90^{MEL-14}発現の詳細な定量的解析と、gp90^{MEL-14}陽性、陰性リンパ球の機能を解析した。

II. 材料と方法

- 1) 3重染色 (i): C57BL/6 (B6) の脾 (SP), 腸間膜リンパ節 (MLN), 末梢リンパ節 (PLN), 末梢血 (PB), 及びパイエル板 (PP) よりリンパ球 (1×10^6 個) を採取し, MEL-14, ビオチン化抗ラット κ -鎖抗体を順次加えた後, 非特異的染色を防ぐため, マウス Ig, 及びラット Ig を加えた。最後に, streptavidin-TANDEM (phycoerythrine/texas red), phycoerythrine (PE)-抗 CD 4 (L 3 T 4) 抗体, 及び fluorescein isothiocyanate (FITC)-抗 CD 8 (Lyt 2) 抗体のカクテルで染色した。
- 2) 3重染色 (ii): PLN T 細胞に 1 次抗体として抗 Pgp-1 を加え, 上記のステップ後, PE-抗 CD 4 抗体と FITC-MEL-14, 又は PE-抗 CD 8 抗体と FITC-MEL-14 で染色した。

3) フローサイトメトリー：蛍光色素でラベルした細胞は、FACScan を使用し、FSC と SSC の2つのパラメータで生細胞を選別し、30,000個以上について解析した。場合によっては死細胞を propidium iodide にて染色し、生細胞のみを解析した。

4) 混合リンパ球反応 (MLR)：B 6 又は、B 10BR (BR) マウスの各リンパ組織より得たリンパ球をナイロンウールカラムを通し、ヒツジ抗マウス IgG ダイナビーズと2回反応した後、T細胞分画を得た。この細胞より、MEL-14とヒツジ抗ラット IgG ダイナビーズで gp90^{MEL-14}陽性細胞を除き、gp90^{MEL-14}陰性反応細胞とした。刺激細胞は、AKR 又は B 10マウス脾細胞をマイトマイシン処理 (40 μ g/ml) 後、 1×10^5 個/ウェルの反応細胞に対し、 2×10^5 個/ウェルを分注した。反応細胞と刺激細胞を2～5日間混合培養後、³H-チミジンの細胞内取り込み量を測定した。

5) CD 4 細胞と CD 8 細胞の分離：リンパ球を抗 Lym-2 抗体、又は抗 CD 4 抗体で処理後、ヒツジ抗ラット IgG ダイナビーズを用いて、それぞれ CD 8 陽性、又は CD 4 陽性細胞を除去した。

6) マイトジェン反応：細胞に、Con A、又は PHA (いずれも 5 μ g/ml) を加えて3日間培養後、反応性を MLR と同様³H-チミジンの取り込み量で測定した。IL-2、又は IFN- γ アッセイには、培養細胞を洗浄し、新たに培養液を加え、12時間培養後の上清を用いた。

7) 抗 CD 3 抗体刺激：抗 CD 3 抗体 (2 C11) をプレート表面に固相化した。上記の方法で用意した反応細胞をプレートに分注、培養後、培養上清中の IL-2、IFN- γ 産生量を測定した。

8) IL-2 アッセイ：上記培養上清を、IL-2 依存性 T 細胞株、CTLL-2 に加えた。培養後、CTLL-2 の増殖反応を測定し、反応細胞から分泌された IL-2 の量を間接的に算定した。

9) IFN- γ 定量：反応細胞の培養上清中の IFN- γ 分泌量を、INTERTEST- γ ELISA キットを用いて、波長492/620nm で測定後、解析した。

Ⅲ. 結 果

1) 各リンパ組織細胞の gp90^{MEL-14} 発現量：浮遊細胞調整の過程で、gp90^{MEL-14} 抗原量が変化した。この変化を抑えるために、NaN₃ を加えた Hanks 液に各組織および末梢血を取り、浮遊細胞に調整後、3重染色を行った。PLN, SP リンパ球の gp90^{MEL-14} 発現量は、NaN₃ を加えない通常のメディウムを用いて細胞を処理した時には、NaN₃ 添加 Hanks 液のものと比べて著明に高かった。しかし、PB の gp90^{MEL-14} 発現量では、両者間に差が認められなかった。さらに SP, PLN, PB, MLN と PP 細胞ポピュレーションを NaN₃ 添加 Hanks で処理し、CD 4 陽性

T細胞, CD 8 陽性T細胞, 及びB細胞の各集団の gp90^{MEL-14}発現量を比較した。その結果, PB リンパ球の gp90^{MEL-14}抗原量は, いずれのポピュレーションでも他のリンパ組織と比べ高い値を示した。また PLN は 2 番目に高い値を, PP 細胞は再低値を示した。他の細胞では中間値を示した。

2) リンパ球上の gp90^{MEL-14}と Pgp-1 抗原発現の関係: Pgp-1 の発現は CD 4 陽性細胞で高く, gp90^{MEL-14}の発現は CD 8 陽性細胞で高いこと, gp90^{MEL-14}陰性集団の大部分は, CD 4, CD 8 に関わらず Pgp-1 発現量が高いことが判明した。

3) gp90^{MEL-14}陰性と陽性細胞の MLR: gp90^{MEL-14}陽性T細胞と gp90^{MEL-14}陰性T細胞の AKR 抗原に対する MLR を調べ, その機能を比較検討した。その結果, いずれの組織のT細胞においても, gp90^{MEL-14}陽性T細胞と較べて, gp90^{MEL-14}陰性T細胞の反応性は有意に高かった。また, 各組織より得た gp90^{MEL-14}陰性, 陽性T細胞それぞれの反応性を比較した時, 組織間には有意の差は認められなかった。しかし, BR の gp90^{MEL-14}陽性T細胞反応性をH-2 に対する MLR (B10), Mls-1^aに対する MLR (AKR) で比較すると, Mls-1^aに対する反応が有意に高かった。しかし, gp90^{MEL-14}陰性T細胞では逆に, B10に対する反応が AKR に対するものよりは, 有意に高かった。

4) gp90^{MEL-14}陰性細胞と陽性細胞のマイトジェン反応: CD 4⁺集団では, gp90^{MEL-14}陽性と陰性T細胞群の間に, Con A に対する反応に有意の差は認められなかったが, CD 8⁺ポピュレーションでは, gp90^{MEL-14}陽性細胞と較べ, gp90^{MEL-14}陰性T細胞は高い Con A 反応を示した。また Con A 刺激後, 上清中の IL-2 量を測定した結果, CD 4⁺, CD 8⁺T細胞の両方で gp90^{MEL-14}陰性細胞の上清は, gp90^{MEL-14}陽性と較べ, 高い IL-2 値を示した。さらに, CD 4⁺T細胞は IFN- γ をほとんど産生しなかったが, CD 8⁺T細胞は, 多量の IFN- γ を分泌した。

5) CD 8⁺T細胞のサイトカイン分泌と gp90^{MEL-14}発現: CD 8⁺gp90^{MEL-14}陰性T細胞は Con A, PHA, または 2 C11いずれの刺激によっても, CD 8⁺gp90^{MEL-14}陽性細胞より多くの IL-2 を分泌した。また, Con A 又は 2 C11で刺激した時, CD 8⁺gp90^{MEL-14}陰性T細胞は CD 8⁺gp90^{MEL-14}陽性T細胞と較べて, 著明に高い IFN- γ を分泌した。

IV. 考 察

1) PLN と SP 中のCD 8⁺T細胞は, in vivo では gp90^{MEL-14}発現量は低いが, 細胞浮遊液を作製する過程で, その発現量を増加させたと考えられた。また PB のリンパ球は, in vivo においてすでにマキシマムに近い gp90^{MEL-14}を発現しているため, 細胞浮遊液調整中に発現量の見

掛け上の増加が認められないと考えられた。つまり、SP と PLN のリンパ球は、in vivo では gp90^{MEL-14}発現が抑制されているが、in vitro では、up-regulate される事が示唆された。

2) 抗 CD 3 抗体により活性化された CD 8⁺Pgp-1⁺gp90^{MEL-14}陰性T細胞は、多量の IL-2, INF- γ を分泌した。さらに、異系組織移植により増加した CD 8⁺gp90^{MEL-14}陰性T細胞も多く INF- γ , グランザイムを分泌し、高い細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) 活性を持つことを Mobley らは報告している。それゆえ、gp90^{MEL-14}陰性 CD 8⁺T細胞は、ヘルパーT細胞非存在下でもそれ自身が分泌したサイトカインによって CTL へと誘導される経路が示唆された。

3) gp90^{MEL-14}陰性と gp90^{MEL-14}陽性細胞間で、IL-2, INF- γ の産生量に差が認められ、gp90^{MEL-14}陰性 Pgp-1⁺T細胞がメモリーT細胞であるという考えに一致した。

V. 結 語

1) リンパ球上の gp90^{MEL-14}分子の modulation を抑える条件下で gp90^{MEL-14}発現パターンを解析すると、末梢血 (PB), 末梢リンパ節 (PLN), 脾 (SP), 腸間膜リンパ節 (MLN), パイエル板 (PP) の順に gp90^{MEL-14}発現細胞の割合、並びに gp90^{MEL-14}発現量が高いことが判明した。

この順序は PLN と HEV との解剖学的、機能的距離に相関しており、gp90^{MEL-14}がホーミングレセプターとして働く際、その発現量に依存して効率的にリンパ球が PLN にマイグレートすると考えると、これまでの gp90^{MEL-14}のホーミングレセプターとしての役割と一致する結果と考えられた。

2) 脾、末梢リンパ節いずれにおいても、gp90^{MEL-14}陰性T細胞は、gp90^{MEL-14}陽性T細胞と比べ、高い MLR を示した。また、gp90^{MEL-14}陰性T細胞は、Mls 抗原より H-2 分子に対して高い反応性を示したが、gp90^{MEL-14}陽性T細胞は、H-2 と比べ Mls 抗原により強い反応性を示した。

3) CD 8⁺ポピュレーションでは、gp90^{MEL-14}陽性T細胞群と比べ、gp90^{MEL-14}陰性T細胞は高い Con A 反応を示したが、CD 4⁺ポピュレーションでは、著明な反応差が認められなかった。しかし、Con A 刺激後の IL-2, INF- γ 産生は、CD 8⁺, CD 4⁺両ポピュレーションにおいて、gp90^{MEL-14}陰性分画で高かった。同様の傾向は PHA, 2 C 11で刺激した、CD 8⁺ポピュレーションにおいても認められた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小野江 和 則
副 査 教 授 小 林 邦 彦
副 査 教 授 吉 木 敬

リンパ球の末梢リンパ節への移動は、リンパ節傍皮質域の高内皮細胞静脈（HEV）を介して行われる。HEV との接着で働くリンパ球上の分子は、ホーミングレセプターと呼ばれ、これらは現在 gp90^{MEL-14} と同定されている。しかし、gp90^{MEL-14} 分子は、リンパ節にはホーミングしない未熟型胸腺細胞、好中球などにも発現されているなど、これらのホーミングレセプターとしての役割とは一致しない結果が、報告されている。本研究においては、リンパ球上の gp90^{MEL-14} 発現量をより in vivo に近い状態で定量することに成功し、さらに gp90^{MEL-14} 発現、及び非発現 T 細胞の機能を解析し、gp90^{MEL-14} のホーミングレセプターとしての役割を再確認した。

種々のリンパ組織、末梢血よりリンパ球浮遊細胞を調整する際、アジ化ナトリウムを添加したハンクス液内で行い、アジ化ナトリウム非添加ハンクス液で処理したものと比較した。その結果、末梢血以外のリンパ球は、細胞浮遊液調整過程で速やかに gp90^{MEL-14} 分子発現量を増加することが判明した。しかし、末梢リンパ球は、in vivo で既にマキシマムの gp90^{MEL-14} を発現しているため、in vitro で発現量を増加することはなかった。アジ化ナトリウム添加によって、発現量の変化を抑えたリンパ球ポピュレーションの gp90^{MEL-14} 発現細胞の比率、及び発現量は、末梢血、末梢リンパ節、脾、腸間膜リンパ節、パイエル板の順に高かった。これらは末梢リンパ節 HEV との解剖学的、機能的距離と相関し、gp90^{MEL-14} がその発現量依存性にホーミングレセプターとして働くことを支持した。また、gp90^{MEL-14} と Pgp-1 発現量はおおむね逆相関の関係にあることが判明した。

次に、gp90^{MEL-14} 陽性、陰性 T 細胞の機能を比較した。混合リンパ球反応においては、リンパ節、脾いずれにおいても、gp90^{MEL-14} 陰性 T 細胞が、gp90^{MEL-14} 陽性細胞より高い反応性を示した。また、gp90^{MEL-14} 陰性 T 細胞は、Mls 抗原より H-2 抗原に強い反応性を示したが、gp90^{MEL-14} 陽性 T 細胞は、その逆の反応パターンを示した。T 細胞を CD 4 陽性と CD 8 陽性の 2 分画に分け、さらにこれらを gp90^{MEL-14} 陽性と陰性亜群に精製後コンカナバリン A で刺激すると、CD 4 陽性、CD 8 陽性いずれにおいても、gp90^{MEL-14} 陰性細胞が gp90^{MEL-14} 陽性細胞

より高い IL-2, INF- γ 産生を示した。同様の傾向は, PHA, 固相化抗 CD3 抗体で刺激した CD8 陽性 T 細胞でも認められた。これらの結果は, 末梢リンパ節にほんの数%存在する gp90^{MEL-14}陰性リンパ球が, 生体内で一度活性化されたメモリー細胞であることを示唆した。

論文発表に際し, 小林, 吉木, 上出, 武市, 細川各教授より, gp90^{MEL-14}陰性 T 細胞は, 活性化の結果 gp90^{MEL-14}分子発現量が低下したものなのか, またその分子量低下の生物学的意義, 末梢リンパ節以外のリンパ組織に対するホーミングレセプターについて, アジ化ナトリウム処理リンパ球を機能アッセイに用いたのかどうか, gp90^{MEL-14}の接着因子としての役割の直接評価はしているか, gp90^{MEL-14}発現量に影響するサイトカインについて, gp90^{MEL-14}陽性と陰性 T 細胞における混合リンパ球反応の標的抗原の違いの意義, 抗原レセプターを介しない T 細胞活性化について, T 細胞以外の細胞における gp90^{MEL-14}発現について, など数多くの質問があった。申請者は一部不十分なものがあったが, おおむね適切な解答を成し得た。また, 小林, 吉木両教授には個別にご審査いただき合格と判定された。

以上, 本研究は単一浮遊リンパ球調整当初より, アジ化ナトリウム添加メディウムを用いるという単純な改良手順により, gp90^{MEL-14}分子のより生体内に近い発現量を定量化することに成功し, gp90^{MEL-14}分子のホーミングレセプターとしての役割を確認した。また, gp90^{MEL-14}陽性 T 細胞と陰性 T 細胞の機能を解析し, 末梢リンパ組織に少数存在する gp90^{MEL-14}陰性リンパ球が, in vivo ですでに活性化されたメモリー細胞であることを示唆する結果を得た。これらはいずれも新知見であり, 博士(医学)の学位に相当すると判定した。