

学 位 論 文 題 名

Characteristics of Intrathymic B Cells in Normal and Chimera Mice

（正常，及びキメラマウス胸腺内B細胞の特徴）

学位論文内容の要旨

I. はじめに

胸腺内には一定数のB細胞が存在し，これらは末梢のB細胞とは異なる亜群に属すると考えられている。また，B細胞がM1s-1⁺抗原を発現していることも証明されている。胸腺内M1s-1⁺抗原発現とM1s-1⁺反応性のV β 6TCR陽性のT細胞の胸腺内消去の関係が判明しており，従って胸腺内B細胞の役割に興味を持たれる。本研究では，胸腺内B細胞の分布と表現型が，マウス系統によって異なること，さらにこれらの違いは胸腺を構築する基質細胞によることを明らかにした。

II. 材料と方法

1) マウス：AKR/J (AKR), SJL/J (SJL), DBA/1, SWR/J (SWR), BALB/c, C57BL/10 (B10), B10.BR, C57BL/6 (B6), C3H/He (C3H), B10.D2, CBA/N, B10.AQR, B10.A(4R), またはB10.A(3R)を用いた。

2) 骨髓キメラ作製：11Gy全身照射したレシピエントマウスに，8-12週齢のドナーマウスのT細胞除去骨髓細胞を 2×10^7 個移植し，作製した。B10の骨髓細胞をAKRマウスに移入した場合には，[B10 $\rightarrow$ AKR]と表し，以下他の組合せも同様の命名法を用いた。GVHRキメラは，ナイロンウールで精製したB6マウスの末梢T細胞 1×10^6 個をB6マウスの骨髓細胞と共にAKRに移植し，作製した。

3) 免疫組織化学解析：マウスの胸腺を取り，凍結切片作製後，Vectastain Kit (ABC法)にて免疫組織染色を行った。また，FITC標識した抗マウスIgを用いて，蛍光顕微鏡で解析した。

4) フローサイトメトリーによる細胞表面抗原の解析：正常マウスと骨髓再建後5週の骨髓キメラマウスの胸腺細胞を蛍光抗体で染色後，FACSscanで解析した。

Ⅲ 結 果

1) 胸腺内 B 220陽性細胞の分布 : AKR と SJL マウスでは, B 細胞マーカーである B 220陽性細胞は, 胸腺髄質内にクラスターを形成したが, B 10, BALB/c など他の大部分のマウスでは, B 220陽性細胞は散在性に認められた。しかし, 胸腺皮質においては, 全てのマウス系統で, B 220陽性細胞は散在性に分布していた。また, B 220陽性細胞の実数も胸腺髄質と較べ少なかった。膜型イムノグロブリン (sIg) 陽性細胞の分布型も, B 220陽性細胞とほぼ同じであった。

2) 胸腺内 B 細胞の比率 : クラスターが認められた AKR と SJL マウスでは, 他の大部分の系統のマウスより, 胸腺内 B 細胞の比率が高かった。

3) 胸腺内 B 細胞の表現型 : AKR と SJL 成熟マウスでは, sIg 陽性細胞は大部分が Ly-1 陰性であった。しかし B 10, BALB/c など他の大部分のマウスでは, sIg 陽性の細胞の 70-80 %が, Ly-1 陽性だった。

4) 加齢の影響 : AKR と SJL マウスでは, 週齢によって胸腺内 B 細胞の分布と表現型が異なった。即ち, AKR, SJL の胸腺内 B 細胞数は, 加齢と共に増加した。さらに, 生後 5 週では, 胸腺内 B 細胞の分布は散在性で, 10 週から, クラスター形成が認められるようになった。また生後 5 週目では, AKR, SJL 胸腺内 B 細胞は Ly-1 陽性が多かったが, 上記のごとく 10 週以後, Ly-1 陰性 B 細胞が多くなった。B 10, BALB/c など他の大部分のマウスでは, このような変化は認められなかった。

5) 一代雑種 (F₁) マウスの胸腺内 B 細胞 : AKR または SJL マウスと他の系統のマウス間の F₁ では, AKR と SJL と同じ分布と表現型が認められた。つまり, クラスター形成と, Ly-1 陰性 B 細胞の増加は, 遺伝的に優性な形質と考えられた。

6) 骨髓キメラの胸腺内 B 細胞 : [B 10→AKR] と [AKR→B 10] キメラの場合は, 胸腺内の B 細胞の分布型と表現型は, それぞれ AKR 型と B 10型を示した。即ち, 胸腺内 B 細胞の分布様式と表現型は, ドナーではなく, レシピエントのものと相関した。

7) GVHR キメラの胸腺内 B 細胞 : GVHR キメラの場合は, 胸腺内 B 細胞数が減少したが, Ly-1 陽性 B 細胞の比率は, GVHR を示さないコントロールキメラより高かった。また, GVHR とコントロールキメラの差は, 免疫抑制剤サイクロスポリン A (CsA) 投与によって減少した。従って, 胸腺内の Ly-1 陽性 B 細胞比率の増加は, GVHR の直接影響によると考えられた。

IV. 考 察

マウス胸腺内B細胞の分布型はクラスター形成型と散在型の二つに分類された。クラスター型はAKR, SJL, またこれらと他のマウス間のF1マウスのみに認められた。さらにAKRまたはSJLマウスでは、週齢によって胸腺内B細胞の分布, 数, 表現型が異なった。従って, 胸腺内B細胞のクラスター形成は, そのマウス遺伝形質と加齢とに関連することが判明した。

骨髓キメラの場合, 胸腺内B細胞の分布, 表現型はドナー系統に関係なく, レシピエントマウスによって決められた。つまり, レシピエントマウスの胸腺微小環境は, 胸腺内B細胞のマイグレーションと分化パターンに重要な影響を与えたと考えられた。

Ly-1陽性B細胞は, 自己反応性T細胞のクローン消去に関与していると報告されている。また, [B10→AKR]GVHRキメラの場合では, レシピエント抗原(Mls-1^a)反応性V β 6陽性T細胞の胸腺内消去が起こらないことが, 当教室の福士らによって報告されている。従って, [B10→AKR]GVHRキメラで, Ly-1陽性B細胞の比率が高かったのは予想外であった。この結果から, Ly-1陽性B細胞が存在しても, Mls-1^a抗原を発現するレシピエント(AKR)細胞が傷害されたため, GVHRキメラではV β 6陽性T細胞のクローン消去が起こらないと考えられた。

V. 結 語

マウス系統によって胸腺内B細胞の分布と表現型が異なること, これらの差は胸腺ストローマによって決められることが判明した。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	小野江 和 則
副 査	教 授	武 市 紀 年
副 査	教 授	上 出 利 光

胸腺内には一定数のB細胞が存在し, これらは末梢のB細胞とは異なる亜群に属すると考えられている。最近, 胸腺内における自己抗原反応性T細胞クローンの消去に, これら胸腺内B細胞が関与しているという報告が提出されたが, これらB細胞の役割については, 依然として不明な

点が多い。本研究においては、胸腺内B細胞の分布と表現型について、種々のマウス、骨髓キメラマウスを用いて比較、解析した。

調べた大部分(16系統)のマウスにおいて、胸腺内B細胞は散在性に認められ、その数も全胸腺リンパ球中の0.5%を越えることはなかった。また、これら胸腺内B細胞の70~80%はLy-1陽性細胞であった。しかし、AKRとSJLマウス、及びこれらと他の系統間の1代雑種マウスにおいては、胸腺内B細胞数は加齢と共に増加し、生後25週では全胸腺リンパ球の2%を越えた。また、これらのマウスでは、髄質内のB細胞は、生後10週以後にはクラスターを形成し、これらのクラスター形成細胞の大部分は、Ly-1陰性であった。したがって、AKR、SJLマウス及びこれらと他の系統間の一代雑種においては、Ly-1陰性B細胞が加齢と共に胸腺内に増加し、これはクラスターを形成することが判明した。

次にこのような胸腺内B細胞の分布と表現型が、リンパ球そのものの性質によって規定されるのか、または胸腺骨格を構成する基質細胞によるのかを調べるために、致死線量放射線照射AKRまたはB10マウスに、それぞれB10またはAKRの骨髓移植を行い、異系骨髓キメラにおける胸腺内B細胞の性状を解析した。その結果、ドナーがB10、レシピエントがAKRの場合には、胸腺内B細胞はすべてB10由来のものと置換しているに関わらず、B細胞の比率は高く、またこれらの大部分はクラスター形成性のLy-1陰性B細胞であった。逆にAKRがドナー、B10マウスがレシピエントの場合には、AKR由来の胸腺内B細胞の比率は低く、また胸腺髄質内のクラスター形成も認められなかった。つまり、胸腺内B細胞の分布と表現型は、放射線抵抗性のレシピエント胸腺基質細胞によって決定されることが判明した。

また骨髓移植時に成熟型T細胞を加えて、移植細胞対宿主反応(GVHR)を誘導した骨髓キメラにおいては、GVHRを生じないキメラと較べて胸腺細胞数は著明に低下していたが、Ly-1陽性B細胞の比率は高かった。このような変化は、免疫抑制剤のサイクロスポリンA投与によってGVHRを抑えると認められなくなることから、Ly-1陽性B細胞の増加はGVHRの直接影響によると考えられた。

論文発表に際し、武市、上出、細川、柿沼、宮崎各教授より、胸腺内B細胞の生理的役割、lineageの違い、胸腺内B細胞と内在性ウィルスとの関連、骨髓キメラレシピエントマウスの加齢による影響、異なる組み合わせのキメラマウスの場合について、マウスの飼育条件、胸腺内基質細胞の種類について、サイクロスポリンAの量と影響について、T細胞のB細胞に対する影響などについて質問があったが、申請者は、おおむね適切な解答をなし得た。また、武市、上出両教授には、個別にご審査いただき合格と判定された。

以上、本研究は胸腺内Ly-1陰性B細胞の加齢に伴う増加とクラスター形成が、胸腺基質によって規定されること、これらは遺伝的に優性な形質であることを示した。また、本研究は胸腺内のLy-1陽性B細胞がGVHRなどのストレスに比較的抵抗性であることを示し、これらはいずれも新知見と考えられ、博士（医学）の学位に相当すると判断された。