

学 位 論 文 題 名

自己免疫 MRL/Mp-lpr/lpr マウス CD4⁻CD8⁻
double negative T 細胞における接着分子の機能解析

学位論文内容の要旨

はじめに

MRL-lpr は全身性リンパ節腫脹とループス病態を示すマウスである。最近このマウスは、アポトーシスに関連する Fas 抗原の発現異常をきたし、自己反応性 T 細胞が胸腺内で除去されない可能性が示唆されている。MRL-lpr マウスの全身性リンパ節の腫脹は、CD4⁻CD8⁻ダブルネガティブ（double negative ; DN）T 細胞とよばれる異常 T 細胞の非腫瘍性増加によってもたらされる。しかし、腫脹しつつあるリンパ節内のリンパ球の約98%が細胞分裂活動期に属する細胞ではない。この異常 DNT 細胞は、マイトーゲン、抗原及び抗 CD3 抗体で刺激しても、増殖反応、Interleukin-2（IL-2）産生及び Interleukin-2 receptor（IL-2 R）の発現が非常に弱いことが分かっており、低反応性細胞群と考えられている。DNT 細胞が、どのような機序で末梢リンパ節に集積するのか、自己免疫病変形成にどのような役割を持つのか、いまだに解明されていない点が多い。接着分子の機能は、最近シグナル伝達分子としても注目されているので、そこで本研究は接着分子の面から MRL-lpr マウス DNT 細胞の機能について解析し、自己免疫病変形成にどのように関与しているのかを検討した。

材料と方法

1. マウス、抗体と試薬：MRL-lpr マウスと MRL/Mp-+/+（+/+）マウスを用いた。抗 Mel-14抗体、抗 LFA-1 抗体、抗 HSA 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体、抗ラットκ鎖抗体は American Type Culture Collection より購入した。抗 CD44抗体、抗 VLA-4 抗体は三宅博士（佐賀医科大学）より供与を受けた。ヒト フィブロネクチン（Paesel, Frankfurt, FRG）、ヒト ビトロネクチン（高研、東京）、ヒト タイプ I コラーゲン、マウス ラミニン、ヒアルロン酸と PMA は Sigma より購入した。スタウロスポリンは、日本協和メディクス（東京）より購入した。

2. 細胞の調整及び分画： マウスよりリンパ節を取り出し、単一浮遊細胞を作り、最後に完全培養液でそれぞれの細胞濃度を調整した。また、リンパ節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98%以上であった。

3. 細胞表面抗原の検索： 細胞に抗体を加え4℃で30分間、インキュベートした。細胞を洗浄後、さらに FITC 標識抗ラットκ鎖抗体を加え、4℃で30分、インキュベートした。その後、細胞を PBS に浮遊させ FACSscan にて解析した。三重染色は、抗体に続いてビオチン標識抗ラットκ鎖抗体、更に Duochrome を加えた。非特異染色を防ぐため5%ラット血清を加えた後、FITC 標識と PE 標識抗体にて染色した。細胞を PBS に浮遊させ FACSscan にて解析した。

4. re-directed 細胞障害活性の測定： 調整したエフェクター細胞をU底96穴マイクロプレートに分注し、⁵¹Cr でラベルした EL-4, YAC-1 または P815細胞を標的細胞 (10⁴/well) として加えた。更に種々の適当な濃度の抗体を加えて、37℃, 5%CO₂ インキュベーター内で培養した。4時間後、1500rpm10分間遠心し、上清に遊離した⁵¹Cr 量をγカウンターにて測定した。

re-directed 細胞障害活性の測定方法は、DNT 細胞が発現する抗原に対する IgG クラスの抗体を加えると、抗体の Fab 部分により DNT 細胞と結合する。一方、この抗体の Fc 部分は標的細胞が発現する Fcγ レセプターに結合し、抗体を介するエフェクター細胞と標的細胞との結合が行われる。

5. セリンエステラーゼの測定： 細胞を NP-40含有 PBS に浮遊させ、4℃にて30分振盪しながら細胞を溶解した。細胞溶解液と反応液を30分間隔で反応させた後、BLT-エステラーゼの吸光度は ELISA リーダーにて波長405nm で測定した。

結 果

MRL-lpr マウス DNT 細胞における接着分子の量的発現異常について解析した。+/+マウスと比較して、MRL-lpr マウス DNT 細胞は CD44, HSA, CD45R の発現が亢進していた。

更に MRL-lpr マウス DNT 細胞における接着分子の質的発現異常について解析した。+/+マウス末梢血リンパ球は PMA で処理すると、Mel-14抗原の発現低下が起こる。しかし、MRL-lpr マウスでは PMA による発現低下の抑制が認められた。

次に、接着分子を介する DNT 細胞の細胞障害活性の有無を検討した。MRL-lpr DNT 細胞の表面抗原に対する種々の抗体を加えると、抗 CD 3, CD44, Mel-14, HSA, CD45R 抗体によって有意の細胞障害活性が誘導された。しかし、抗 LFA-1, 抗 VLA-4, 抗 Thy-1

抗体では、細胞障害活性が認められなかった。あらかじめ EL-4 細胞を抗 Fc γ レセプター抗体で処理した。その後、抗 CD44 等の抗体を加えても、細胞障害活性は誘導されなかった。更に Fc γ レセプターを発現していない YAC-1 細胞を標的細胞とした場合には、CD44 等に対する抗体を加えても細胞障害活性が引き起こされなかった。一方、Fc γ レセプター陽性である P815 細胞を標的細胞とした場合では、EL-4 細胞と同様に細胞障害活性が誘導された。

次に、DNT 細胞でみられた現象が、DNT 細胞に特異的であるかどうかを検討した。MRL-lpr マウス由来 CD4 T 細胞と +/+ 細胞の場合には、Mel-14 抗原や CD44 抗原が発現しているにもかかわらず、抗 CD44 及び抗 Mel-14 抗体により re-directed 細胞障害活性は引き起こされなかった。

抗 CD3 抗体による細胞障害活性の誘導は、抗 LFA-1 抗体で抑制されたのに対して、抗 CD44、抗 Mel-14、抗 HSA、抗 CD45R による MRL-lpr マウス DNT 細胞細胞障害活性は、抗 LFA-1 抗体で抑制されなかった。またセリンエステラーゼ (Serine Esterase : SE) の含有量は、正常マウスと較べると、MRL-lpr マウス DNT 細胞では、加齢とともに有意な増加が認められた。

種々の細胞外マトリックスをコーティングした上に MRL-lpr マウスの DNT 細胞を加え、lpr マウス DNT 細胞に細胞障害活性が誘導されるか否かを検討した。ラミニン以外のフィブロネクチン、ヒアルロン酸、タイプ I コラーゲン、ビトロネクチンとの反応により有意な細胞障害活性の誘導が認められた。

考 察

本研究では、自己免疫 MRL-lpr マウスに出現する CD4⁺CD8⁻DNT 細胞における接着分子の量的および質的異常について検討を加えた。

MRL-lprDNT 細胞は PMA による Mel-14 抗原の shedding が完全に起こらない。このことは、末梢血リンパ球が HEV と接着後、血管内皮細胞上に長時間留まる可能性を示唆している。結果として、リンパ節中に異常 T 細胞の増加がもたらされると考えられる。さらにリンパ節実質中に入った DNT 細胞が CD44 抗原を強く発現しているため、リンパ節中の細胞外基質例えばコラーゲン、フィブロネクチン等と結合して実質中に留まり、その結果、リンパ節腫脹を形成する可能性を示唆するものである。

これまで CD44 と Mel-14 抗原には少なくとも活性型と非活性型の二種類が存在することが知られており、MRL-lpr マウス DNT 細胞における CD44 と Mel-14 抗原はすでに in vivo で活

性化されている可能性が強く示唆される。

接着分子を介する re-directed 細胞障害活性の生理的意義を考えると、おそらく生体内においては、MRL-lpr 異常 DNT 細胞が自己抗原などで活性化されて、DNT 細胞の CD44 や Mel-14 抗原が活性型に変換され、引き続き血管内皮上や細胞外基質として存在するヒアルロン酸やファイブロンネクチンなどとの結合を介して、細胞障害活性が誘導され、細胞及び組織の破壊を惹起すると思われる。更に、本研究は、接着分子が細胞の接着のみならず、細胞機能発現へのシグナル伝達分子としても機能しうることを示唆するものである。

結 論

- (1), MRL-lpr マウス DNT 細胞上では、CD44, HSA, CD45R 等の接着分子の発現が亢進していること及び Mel-14 抗原の shedding 異常が存在することを明らかにした。
- (2), MRL-lpr マウス DNT 細胞は、CD44, Mel-14, HSA 或は CD45R を介して、CD 2 及び LFA-1 非依存的な細胞障害能を有しており、CTL, NK, LAK 細胞とは明らかに異なる機序で標的細胞（自己組織）を障害し、自己免疫病変の形成に関与していると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 武 市 紀 年

副 査 教 授 小野江 和 則

MRL/Mp-lpr/lpr (MRL-lpr) マウスは、ヒト全身性エリテマトーデスのモデル動物である。このマウスは常染色体性単一劣性の遺伝様式を示し、lpr/lpr 遺伝子型のマウスでは全身リンパ節の腫脹を呈する。リンパ節腫脹は、正常マウスの末梢リンパ組織では認められない CD4⁺CD8⁻T (ダブルネガティブ T; 以下 DNT) 細胞の非腫脹性増加によってもたらされている。最近、このマウスではプログラムされた細胞死 (アポトーシス) を制御する Fas 抗原の発現異常をきたし、胸腺内でネガティブセレクションによって胸腺細胞が除去されないため、DNT 細胞を含む異常な T 細胞が末梢へと流出している可能性が示唆された。しかしながら、DNT 細胞が自己免疫病変形成に関与しているのか、あるいはどのような機序で末梢リンパ節に集

積するのか、解明されていない。

本研究では細胞間相互作用あるいは細胞と細胞外基質の結合を制御する接着分子について検討を加え、MRL-lpr マウス DNT 細胞においては、接着分子の量的及び質的異常が存在することを明らかにし、しかもこの異常が病変形成に関与する可能性を示唆する結果を得た。

正常マウス T 細胞と比較すると、MRL-lpr マウス由来 DNT 細胞では、ヒアルロン酸、コラーゲン、フィブロネクチン等をリガンドとしてもつ CD44 抗原や熱安定抗原(以下 HSA 抗原)の発現量が増加していた。さらにリンパ節傍皮質域の高円柱内皮細胞(以下 HEV)の糖鎖抗原をリガンドとしてもち、ホーミングレセプターとして機能する Mel-14 抗原のホルボルエステル刺激による細胞表面よりの遊離異常が存在することが判明した。これらの結果は、末梢血リンパ球が HEV と接着後、正常では Mel-14 抗原の遊離により大部分のリンパ球が末梢血を循環する経路にとどまるのに対し、HEV 上に長時間留まり、リンパ節中へと移動し、リンパ節中のコラーゲンやフィブロネクチンと CD44 抗原を介して接着し、リンパ節腫脹をもたらしている可能性を示唆するものである。

更に MRL-lpr マウス由来 DNT 細胞では、CD44 抗原、Mel-14 抗原、HSA 抗原等細胞間相互作用を媒介する接着分子を、それぞれの抗体によって架橋することにより細胞障害活性を発現することを示した。この細胞障害活性はナチュラルキラー細胞や細胞障害性 T 細胞とは異なり、LFA-1 抗原、CD 2 抗原に非依存性であった。DNT 細胞をフィブロネクチンで刺激することによっても細胞障害活性が出現することより、生体内で DNT 細胞が組織障害性を出現し、病変形成に関与していることが示唆された。

論文発表に際し、小野江、武市、松本各教授より、MRL-lpr マウスにおいて組織障害の程度と DNT 細胞の集積が相関しているか、Mel-14 抗原の遊離は DNT 細胞以外の細胞でもおこるか、接着分子発現の増加はいかなる機序によるか、活性化に伴う二次的な現象か、自己抗原によって刺激されているためか、また、本研究でもちいた抗体による抗原架橋に伴う細胞障害活性のもつ意味など多くの質問がなされた。申請者は、一部説明に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、武市、小野江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、MRL-lpr マウス DNT 細胞において、接着分子の量的及び質的な異常が存在することを明らかにし、これらの接着分子を抗体により架橋することにより、また、生体に分布するリガンドで接着分子を刺激することにより DNT 細胞が細胞障害活性を発現することを明らかにした。これらはいずれも新発見であり、博士(医学)の学位に相当すると判定した。