

学 位 論 文 題 名

肺胞T細胞の増殖刺激に対する反応性と
表面抗原に関する研究

学位論文内容の要旨

I. 研究目的

1979年頃より呼吸器病学において盛んに行われるようになった気管支肺胞洗浄（bronchoalveolar lavage, BAL）は、非侵襲的に肺胞領域の細胞や液性成分に関する情報を得る方法で、本法により主としてび慢性間質性肺炎に関する多くの知見が得られた。その中で特に肺サルコイドーシスでは最も頻回にBALが施行され、病態の解明が大きく進展した。

サルコイドーシスでは気管支肺胞洗浄液中（BALF）にCD4陽性のT細胞が増加する。これは病理組織所見でのリンパ球性胞隔炎を反映するとされており、肺サルコイドーシスにかなり特徴的な所見である。CD4陽性T細胞はいわゆる遅延型免疫反応の効果細胞であるため、このリンパ球性胞隔炎は肺における肉芽腫形成の潜在的ないし先行的病変であると考えられている。このリンパ球集積の機序に関し当初、interleukin-2（IL-2）がそれらの細胞より放出されクローン性に増殖するという報告がなされた。本研究ではこの知見の再検討に始まり、得られた結果を敷衍して肺胞T細胞一般の増殖シグナルに対する反応性を検討することを目的とした。

II. 対象および方法

① T細胞のIL-2産生

対象はサルコイドーシス患者27名（男8名、女19名）。胸部X線写真上の病期は0期6名、I期10名、II期10名、III期1名。末梢血のIL-2産生を比較した健常対象者は18名（男12名、女6名）。これらの対象者にBAL細胞、あるいは末梢血単核球から、ノイラミニダーゼ処理羊赤血球ロゼット法にてT細胞を分離した。それを2%牛胎児血清（FCS）添加RPMI-1640培地に浮遊させ、0.2%PHA-P存在下あるいは非存在下で37℃、5%CO₂下で48時間培養し、その培養上清中のIL-2活性を、IL-2依存性細胞株であるCTLL-2の増殖度を指標として測定した。

② リンパ球表面のT細胞抗原受容体（TCR）の発現

対象は健常者が6名(男3名, 女3名)。サルコイドーシス患者は14名(男5名, 女9名)。胸部X線写真上の病期は0期1名, I期8名, II期5名。BAL細胞あるいは末梢血単核球に $\alpha\beta$ 鎖TCRを認識する抗体であるFITC標識TCR-1を結合させ, フローサイトメーターにて陽性率を求めた。TCR+細胞のTCRの発現量は, 平均蛍光強度で評価した。

③ T細胞の細胞内遊離カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の測定

対象は9名のサルコイドーシス患者(男4名, 女5名)。胸部X線写真上の病期はI期4名, II期5名。T細胞に蛍光指示薬であるFura-2/AMを取り込ませ, 励起波長を切り替えることのできる蛍光分光光度計を用い, 励起波長340nmと380nmにおける510nmの蛍光強度比より算出した。刺激剤としてPHA-Pと, 抗CD3抗体であるT3を用いた。

④ リンパ球表面CD45RO抗原の発現の検討

・対象は健常者が5名(男4名, 女1名)。サルコイドーシス患者は8名(男5名, 女3名)。胸部X線写真上の病期は0期2名, I期4名, II期2名。抗体はFITC標識UCHL-1を用い, TCR抗原と同様に解析した。

Ⅲ. 結 果

サルコイドーシス患者において, 無刺激肺胞T細胞によるIL-2産生は認められなかった。一方PHA刺激時には明らかなIL-2産生が認められたものの, 自己末梢血T細胞の産生量に比して有意に低下していた。肺胞T細胞のIL-2産生量と, サルコイドーシスの胞隔炎の指標のひとつであるBALリンパ球比率との間には, 有意の負の相関を認めた。末梢血T細胞のIL-2産生量には, サルコイドーシス患者と健常者間に差を認めなかった。

健常者, サルコイドーシス患者ともに肺胞リンパ球ではTCRの陽性率は末梢血リンパ球より有意に上昇していた。一方同抗原発現量は健常者, サルコイドーシス患者ともに全例で肺胞T細胞の蛍光強度が減弱しており, いわゆるmodulationが認められた。このようなmodulationは特発性間質性肺炎(IIP), 膠原病による間質性肺炎, 塵肺などの種々の呼吸器疾患ばかりではなく, クロウン病, 潰瘍性大腸炎などの肺外疾患でも認められた。

サルコイドーシス患者肺胞T細胞の細胞内遊離カルシウムイオン ($[Ca^{2+}]_i$) 上昇応答は, PHA刺激時には末梢血T細胞よりも低下していたが, 抗CD3抗体刺激では肺胞での応答が亢進していた。

健常者, サルコイドーシス患者ともにmemory T細胞マーカーであるCD45RO抗原陽性率は, 末梢血リンパ球に比して肺胞リンパ球で全例において高値であった。

IV. 考案および結語

今回の検討ではこれまでの報告と異なり、サルコイドーシス肺胞T細胞による無刺激での IL-2 産生は確認し得なかった。また PHA 刺激下での IL-2 産生も、末梢血T細胞より減少していた。一方肺胞T細胞の TCR は発現が低下しており、T細胞が強い抗原刺激を受けた際に認められるいわゆる modulation 現象を示した。modulation を受けたT細胞は PHA などのレクチン反応性が低下するとされているので、先の PHA 低反応性はひとつには modulation の反映として解釈できると考えられた。

肺胞T細胞の PHA 低反応性は、PHA に対する $[Ca^{2+}]_i$ 上昇応答の面からも確認された。一方、抗 CD3 抗体刺激では PHA の場合とは対照的に、肺胞T細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇応答が末梢血T細胞より亢進していた。抗原刺激を受ける前のT細胞は naive T 細胞と呼ばれ、抗原刺激によって CD45RO 抗原陽性の memory T 細胞に分化するが、こうした対照的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇応答は、この memory T 細胞の特性に合致する。実際肺胞T細胞では末梢血T細胞に比して、memory T 細胞が多数を占めた。

以上よりサルコイドーシス肺胞T細胞は、何らかの抗原刺激下にあることが予想される。しかしながら興味あることは、この modulation と memory T 細胞の集積はサルコイドーシスばかりではなく、健常者でも認められたことである。従って肺胞腔への memory T 細胞の集積は、常在する塵埃や微生物の抗原刺激によっておこるかなり普遍的な現象である可能性も考えられた。しかし一方で、PHA 刺激によるサルコイドーシス肺胞T細胞の IL-2 産生は、BAL リンパ球数が多い、言い換えると肺胞T細胞の集積傾向が強いほど減弱していた。従ってそこには疾患の活動性、ないし病態による影響も反映されていると考えられた。

以上より今回の研究では、サルコイドーシスの肺胞T細胞機能の検討に始まって、肺胞T細胞一般に当てはまる特徴を明らかにすることができた。一方でサルコイドーシスに特徴的な病態が重畳されている面も認められた。今後肺胞T細胞の機能的解析を行うに際して、このような二面性を常に念頭に置く必要がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 上 義 和

副 査 教 授 皆 川 知 紀

副 査 教 授 上 出 利 光

目的：サルコイドーシスにおける肺胞T細胞の interleukin - 2 (IL - 2) 産生能の検討と、その結果を敷衍して肺胞T細胞一般の増殖シグナルに対する反応性を検討すること。

対象・方法：のべ29名の健常者とのべ58名のサルコイドーシス患者。肺胞T細胞は気管支肺胞洗浄 (BAL) によって得た細胞より、ノイラミニダーゼ処理羊赤血球法により分離した。IL - 2 は IL - 2 依存性の細胞株である CTLL - 2 の増殖度で定量した。T細胞抗原受容体 (TCR) の発現強度はフローサイトメーターでの平均蛍光強度で評価した。memory T細胞マーカーとして CD45RO の発現比率を同じくフローサイトメーターで測定した。細胞内遊離カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) は Fura - 2 を蛍光指示薬として、蛍光分光光度計で測定した。

結果：サルコイドーシス患者の PHA 刺激肺胞T細胞の IL - 2 産生能と $[Ca^{2+}]_i$ 上昇応答は、自己末梢血T細胞に比して有意に低下していた。また肺胞T細胞の IL - 2 産生量と、BAL リンパ球比率との間に有意の負の相関を認めた。一方抗 CD 3 抗体刺激では、肺胞T細胞での $[Ca^{2+}]_i$ 応答が逆に亢進していた。このような肺胞T細胞の特徴的反応性は、TCR 発現量の低下である modulation と、CD45RO 陽性の memory T細胞への分化で説明できると考えられたが、同様な変化は健常者でも認められた。以上より今回の研究は、サルコイドーシス肺胞T細胞の反応性には疾患特異的な面と、肺胞T細胞に共通する面のふたつが重畳されていることを明らかにした。

口頭発表に際し、皆川教授から down regulation のメカニズム、クローン病や潰瘍性大腸炎での同様な結果の解釈、サルコイドーシスの triggering factors について、上出教授より Ca flux は質的現象か、memory T cell の増加によるものか、CD 2 を介する刺激もあるか、小林教授からはサルコイドーシスにおける特異性について、リンパ球の compartmentalization について、小野江教授より IL - 2 receptor, $\gamma \delta$ TCR を調べたか、IL - 2 の確認などについて質問があった。申請者は概ね妥当に答えたと思う。

また皆川教授、上出教授からは個別に審査を受け、合格とのご返事を頂いている。

以上、本研究は肺胞T細胞の増殖刺激に対する反応性と表面抗原の特徴を明らかにしたもので、博士 (医学) に相当するものと認めた。