

学位論文題名

Lymphokine-activated killer cell activity
of CD4⁻CD8⁻TCR $\alpha\beta$ ⁺thymocytes

(CD4⁻CD8⁻T細胞リセプター $\alpha\beta$ ⁺胸腺細胞の
リンフォカイン誘導キラー細胞活性)

学位論文内容の要旨

I 緒言

CD4⁻CD8⁻胸腺細胞は、CD4⁺CD8⁺細胞を経て成熟型のCD4⁺CD8⁺T細胞またはCD4⁺CD8⁺T細胞へ分化することが知られている。しかし、CD4⁻CD8⁻胸腺細胞上の heat stable antigen (HSA)とT細胞抗原リセプター(TCR)の発現を解析すると、HSA⁻CD4⁻CD8⁻胸腺細胞内には成熟型のTCR $\alpha\beta$ ⁺細胞が認められる。このCD4⁻CD8⁻TCR $\alpha\beta$ ⁺胸腺細胞は、加齢と共に増加すること、偏ったTCR V β 鎖を発現していること、また、ナチュラルキラー細胞に特異的に発現すると考えられていたNK1.1抗原を発現していること等から、通常のT細胞とは異なった系列に属する細胞ではないかと考えられる。しかし、CD4⁻CD8⁻TCR $\alpha\beta$ ⁺胸腺細胞が何を認識し、どのような機能を担った細胞であるかは、依然として不明である。そこで、CD4⁻CD8⁻TCR $\alpha\beta$ ⁺胸腺細胞の機能を調べるために、CD4⁻CD8⁻TCR $\alpha\beta$ ⁺胸腺細胞のIL-2リセプター(IL-2R)の発現、及び各種細胞に対する細胞障害活性を解析した。

II 材料と方法

マウスはC57BL/10またはB10.BRマウスを用いた。CD4⁻CD8⁻TCR $\alpha\beta$ ⁺胸腺細胞における各種細胞表面抗原の発現解析は、抗体と補体もしくは磁気標識抗体を用いて精製したCD4⁻CD8⁻HSA⁻胸腺細胞を各種抗体及び蛍光色素標識抗体を用いて二重染色後、フローサイトメトリーにて解析した。CD4⁻CD8⁻TCR $\alpha\beta$ ⁺胸腺細胞は、CD4⁻CD8⁻HSA⁻胸腺細胞よりTCR $\alpha\beta$ ⁺細胞をソーティングにより採取した。各種腫瘍細胞に対する細胞障害性の解析はCr⁵¹リリースアッセイにより、また、胸腺細胞に対する細胞障害性はPKH-2色素ラベル法に行った。

III 結果

CD4⁻CD8⁻TCR $\alpha\beta$ ⁺胸腺細胞における各種細胞表面抗原の発現解析：CD4⁻CD8⁻TCR $\alpha\beta$ ⁺胸腺細胞は、IL-2R α 鎖の発現を伴わずIL-2R β 鎖のみを発現していることが判明した。また、CD4⁻CD8⁻TCR $\alpha\beta$ ⁺胸腺細胞は、NK1.1⁺、CD44⁺、ICAM-1⁺、MEL-14⁻であり、NK1.1抗原を発現していることを除いては、メモリーT細胞と同様な発現パターンを示していることが判明した。

CD4⁻CD8⁻TCR $\alpha\beta$ ⁺胸腺細胞のIL-2R β 鎖の機能：CD4⁻CD8⁻TCR $\alpha\beta$ ⁺胸腺細胞に発現しているIL-2R β 鎖が機能的なものかどうかを調べるために、CD4⁻CD8⁻TCR $\alpha\beta$ ⁺胸腺細胞をソーティン

グにより採取し、IL-2に対する反応性を解析した。CD4⁻8⁻TCRαβ⁺胸腺細胞は、比較的高濃度のIL-2存在下(1000U/ml)で強い増殖反応を示し、CD4⁻8⁻TCRαβ⁺胸腺細胞に発現しているIL-2Rβ鎖は機能的なリセプターであることが判明した。

CD4⁻8⁻TCRαβ⁺胸腺細胞の細胞障害性：次に、フレッシュなCD4⁻8⁻TCRαβ⁺胸腺細胞とIL-2存在下で培養後の細胞の各種腫瘍細胞(P815, EL-4, YAC-1)、胸腺細胞、脾臓細胞に対する細胞障害性を解析した。IL-2で培養前の細胞は、いずれの細胞に対してもほとんど細胞障害性を示さなかったが、IL-2存在下で1週間培養後では、各種腫瘍細胞及び胸腺細胞に対して細胞障害性を示すことが判明した。一方、脾臓細胞に対しては細胞障害性を示さなかった。すなわち、CD4⁻8⁻TCRαβ⁺胸腺細胞は、IL-2存在下で培養することにより腫瘍細胞及び胸腺細胞に対して細胞障害性を獲得することが判明した。そこで、細胞障害性を獲得する時期を解析すると、培養後3日目ではほとんど細胞障害性を示さなかったが、培養5日目から次第に細胞障害性を獲得することが判明した。しかし、培養3日目においても、抗CD3抗体存在下では、Fcリセプター陽性のP815細胞に対して細胞障害性(re-directed cytotoxicity)を示すことが判明した。

CD4⁻8⁻TCRαβ⁺胸腺細胞の細胞障害活性に関与する細胞亜群の同定：IL-2存在下で7日間培養後の細胞におけるNK1.1の発現を解析すると、約50%が陰性になっていた。そこで、ソーティングによりNK1.1⁺細胞を除き、NK1.1⁻細胞のP815細胞に対する細胞障害性を解析すると、NK1.1⁻細胞はP815細胞に対して細胞障害性を持たないことが判明した。一方、抗CD3抗体による re-directed cytotoxicity は、NK1.1⁻細胞にも認められ、NK1.1⁻細胞も細胞障害活性を持った細胞であることが判明した。従って、CD4⁻8⁻TCRαβ⁺細胞の腫瘍細胞の認識は、NK1.1抗原の発現と関係があると考えられた。そこで、CD4⁻8⁻TCRαβ⁺細胞の細胞障害性に関与する分子を解析するために、抗TCR, NK1.1, CD44, LFA-1抗体の細胞障害性を与える影響を調べた。その結果、抗TCRαβ, NK1.1, CD44抗体は、CD4⁻8⁻TCRαβ⁺細胞の細胞障害性を抑制しなかったが、抗LFA-1は著明に細胞障害性を抑制することが判明した。

IV 考察と結語

これまで機能が不明であったCD4⁻8⁻TCRαβ⁺胸腺細胞が、機能的なIL-2Rβ鎖を発現し、IL-2刺激により各種腫瘍細胞及び自己の胸腺細胞に対して細胞障害活性を獲得する細胞であることが判明した。従って、CD4⁻8⁻TCRαβ⁺胸腺細胞は、生体の免疫防御機構及び胸腺細胞分化に関与した細胞である可能性が考えられた。特に、CD4⁻8⁻TCRαβ⁺胸腺細胞は、加齢と共に増加し、胸腺が縮小し始める頃から顕著に認められることから、胸腺内におけるT細胞の産生を、細胞障害性によって制御している細胞ではないかと考えられた。さらに、LFA-1分子がCD4⁻8⁻TCRαβ⁺細胞の細胞障害性に関与していることが判明したが、細胞障害性の認められなかったNK1.1⁻細胞もLFA-1分子陽性であることから、LFA-1分子は腫瘍細胞の認識分子として働いているというよりは、むしろ腫瘍細胞認識の補助分子として機能している可能性が考えられた。一方、NK1.1の発現と細胞障害活性には強い相関関係が認められたにもかかわらず、細胞障害性は抗NK1.1抗体によって抑制されなかったことから、これらの細胞の腫瘍細胞認識にはNK1.1分子と異なるが、発現を共にする何らかの分子、もしくはNK1.1分子上の抗NK1.1抗体認識部位とは異なる部位が関与している可能性が考えられた。今後は、CD4⁻8⁻TCRαβ⁺細胞がどのような分子によって標的細胞を認識しているのか、また、生体内においても胸腺細胞に対して細胞障害性を持ち、胸腺細胞分化に影響を与えているのかどうか解明されなければならないと思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小野江 和 則

副 査 教 授 細 川 眞澄男

副 査 教 授 上 出 利 光

学 位 論 文 題 名

Lymphokine-activated killer cell activity of CD4⁻CD8⁻TCR $\alpha\beta$ ⁺thymocytes

(CD 4⁻CD 8⁻T細胞リセプター $\alpha\beta$ ⁺胸腺細胞の
リンフォカイン誘導キラー細胞活性)

CD4⁻CD8⁻、いわゆるdouble negative 胸腺細胞は、最も未熟なT前駆細胞と考えられてきたが、これらの中にheat stable antigen (以下HSA)陰性で、 $\alpha\beta$ 型のT細胞抗原レセプター (以下TCR)陽性の成熟型細胞が存在することが、最近判明した。

本論文は、このCD4⁻CD8⁻HSA⁻TCR $\alpha\beta$ ⁺ 胸腺細胞の表面マーカーを詳細に解析し、またこれらの細胞の機能を明らかにすることを目的とした。CD4⁻CD8⁻HSA⁻TCR $\alpha\beta$ ⁺ 胸腺細胞を精製し、細胞表面抗原の発現を解析したところ、これらはIL-2レセプター α 鎖を発現せず、IL-2レセプター β 鎖のみを発現していることが判明した。また、CD4⁻CD8⁻HSA⁻TCR $\alpha\beta$ ⁺ 胸腺細胞は、NK1.1⁺, CD44⁺, ICAM-1⁺, MEL-14⁻で、NK1.1 抗原を発現している点を除いては、メモリーT細胞と極めて類似の表現形を示していた。次に、これらの細胞をIL-2存在下で培養したところ、強い増殖反応を示した。従って、CD4⁻CD8⁻HSA⁻TCR $\alpha\beta$ ⁺ 胸腺細胞に発現しているIL-2レセプター β 鎖は、機能的なレセプターであることが判明した。また、IL-2存在下で1週間培養したCD4⁻CD8⁻HSA⁻TCR $\alpha\beta$ ⁺ 胸腺細胞の約半数はNK1.1⁻となり、残りの半数がNK1.1 強陽性となった。

次に、フレッシュなCD4⁻CD8⁻HSA⁻TCR $\alpha\beta$ ⁺ 胸腺細胞と、IL-2 存在下で培養後の細胞の、各種腫瘍細胞、胸腺細胞、脾臓細胞に対する細胞障害活性を解析した。IL-2で培養前のCD4⁻CD8⁻HSA⁻TCR $\alpha\beta$ ⁺ 胸腺細胞は、いずれの標的細胞に対してもほとんど細胞障害性を示さなかったが、IL-2 存在下で1週間培養後では、腫瘍細胞と同系、異系の胸腺細胞に対して、著明な細胞障害性を示すことが判明した。この細胞障害では、LFA-1-ICMA-1系が補助分子として働いており、活性は主としてNK1.1 陽性分画に担われていたが、培養後3日目の細胞ではほとんど認められなかった。しかし、抗CD3 抗体存在下のre-directed cytotoxicityは、培養3日目の細胞や、NK1.1⁻細胞でも認められた。

論文発表に際し、細川教授よりIL-2レセプターの親和性、IL-2レセプター γ 鎖の有無、NK, LAKあるいは γ 、 δ 型のキラーとの違い、胸腺における生理学的意味、上出教授より、NK1.1 $^{+}$ TCR $\alpha\beta^{+}$ 胸腺細胞がフレッシュな状態でre-directed cytotoxicityを示すか、これらの組織分布、感染との関わりなどについての御質問があったが、申請者は大旨妥当な解答を成し得た。

以上、本論文は、これまで機能が不明であったCD4 $^{-}$ CD8 $^{-}$ TCR $\alpha\beta^{+}$ 胸腺細胞が、機能的なIL-2レセプター β 鎖を発現すること、またこれらはIL-2刺激により各種腫瘍細胞および自己の胸腺細胞に対して細胞障害活性を獲得する細胞であることを始めて明らかにした。これらの結果は、CD4 $^{-}$ CD8 $^{-}$ TCR $\alpha\beta^{+}$ 胸腺細胞が生体の免疫防御機構、および胸腺細胞の産生、分化に参与する重要な細胞である可能性を示したもので、博士の学位に相当すると判定した。