

学 位 論 文 題 名

ヒト胸腺細胞における Fas 抗原遺伝子発現の解析

—BSA 不連続濃度勾配法による胸腺細胞分画を用いた検討—

学位論文内容の要旨

【緒 言】

胸腺には、クローン選択前の未成熟な細胞から末梢血 T 細胞に相当する成熟細胞まで多様な細胞が含まれている。出生後のヒト胸腺細胞の大部分は、比較的短時間で死滅することから、選択されて成熟 T 細胞となる細胞は一部であり、ほとんどの細胞は排除される運命にあると考えられる。

最近、リンパ球のアポトーシスを直接誘導する細胞表面分子として Fas 抗原が見いだされ、マウスでは胸腺内クローン排除に関与している可能性が指摘されているが、ヒト胸腺細胞における解析は報告されていない。

本研究では、死滅しやすく多様なヒト胸腺細胞を最少の細胞障害下で分画するために、ウシ血清アルブミン (BSA) 不連続濃度勾配法を用いた。そして、種々の解析により各分画細胞群の性質を明かにするとともに、TCR 遺伝子再構成と Fas 抗原遺伝子発現を解析することにより、ヒト胸腺細胞の分化過程とアポトーシスの関連、特にクローン排除機構における Fas 抗原の役割について考察した。

【対象と方法】

2 歳以下の先天性心疾患患児の開胸術施行時に切除された 41 個のヒト胸腺から胸腺細胞を分離し解析の対象とした。

胸腺細胞を BSA 不連続濃度勾配法により BSA 濃度 10-14%: 分画 I, 14-16%: 分画 II, 16-18%: 分画 III, 18-20%: 分画 IV, 20-24%: 分画 V に分画した。各分画細胞群を、フロー・サイトメトリーによる側方散乱と表面抗原、レクチン・サイトカインに対する細胞表面への IL-2 レセプター α 鎖 (IL-2R α) 発現と増殖反応により解析した。さらに、各分画細胞群における TCR 遺伝子再構成をサザン・プロット法、Fas 抗原遺伝子発現を reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて解析した。

【結 果】

1. 分画 I から V の各分画には、それぞれ全体の $0.9 \pm 0.3\%$, $1.8 \pm 0.6\%$, $7.0 \pm 3.0\%$, $49.0 \pm 15.0\%$, $41.2 \pm 16.2\%$ (Mean $\pm$ S.D.) の胸腺細胞が含まれた (n=21)。
2. CD4⁺8⁺ 細胞は、全ての分画で 60% 以上を占め、BSA 濃度の高い分画において増加し、分画 V では 90% 以上を占めた。一方、CD4⁺8⁻ または CD4⁺8⁺ 細胞は、分画 I

に最も多く、高 BSA 濃度分画では減少した。

抗 TCR $\alpha\beta$ 抗体である WT31 と抗 CD3 抗体を用いた二重染色解析では、高 BSA 濃度分画で陽性細胞の割合が増加していた。分画 I における主体は CD3⁻WT31⁻ 細胞であったが、高輝度陽性 (CD3⁺HighWT31⁺High) 細胞も存在した。分画 III における CD3⁺ 細胞の主体は CD3⁺HighWT31⁺High 細胞であったが、分画 V では低輝度陽性 (CD3⁺LowWT31⁺Low) 細胞が大部分を占めた。

3. PHA・Con A 刺激により、分画 I・分画 III において CD3⁺ 細胞に IL-2R α 発現が誘導され、特に PHA 刺激に対しては主として CD3⁺High 細胞に発現した。
4. 分画 I 細胞群は、PHA・Con A 刺激により増殖した。分画 III 細胞群は、PHA・Con A 刺激に対しては増殖反応を呈さず、リコンビナント IL-2 (rIL-2) 添加により増殖した。分画 V 細胞群は、いずれの刺激下でも明かな増殖反応を示さなかった。
5. TCR β 鎖定常域 (C β) をプローブとしたサザン・ブロット解析では、C β ₁ 領域を含む切断片の減少を認めた。この減少は、分画 I では弱く、分画 V では明かであった。
6. 正常成人由来末梢血単核細胞は、無刺激下で Fas 抗原遺伝子を発現し、PHA+rIL-2 添加下 72 時間培養後には、発現の明かな増強を示した。

胸腺細胞では、分画 I 細胞群が最も強い Fas 抗原遺伝子発現を示し、末梢血単核球の無刺激下での発現と同程度であった。また、分画 III 細胞群における発現は分画 I 細胞群に比べ弱く、分画 V 細胞群における発現は検出できなかった。分画 I 細胞群における Fas 抗原遺伝子の発現は、抗 CD3 抗体添加下 3 時間培養により増強した。分画 III 細胞群は、抗 CD3 抗体添加下には増強を示さず、抗 CD3 抗体+rIL-2 添加により発現の増強傾向を示した。分画 V 細胞群は、いずれの添加によっても明かな発現を示さなかった。

【考 察】

分画ヒト胸腺細胞は、細胞レベルの解析結果から、3 群に分類する事が可能と考えられる。すなわち、1) PHA・Con A 刺激により IL-2R α を発現し IL-2 を産生して増殖できる分画 I に含まれる細胞群、2) PHA・Con A 刺激により IL-2R α を発現するが IL-2 を産生できず rIL-2 添加により増殖可能となる分画 III に含まれる細胞群、さらに 3) いずれの刺激に対しても IL-2R α をほとんど発現できず、増殖反応も示さない分画 V 細胞群、の 3 群である。

分画 I 細胞群は、PHA・Con A 刺激に対し IL-2R α を発現し増殖反応を呈する少数の CD3⁺HighWT31⁺High 成熟細胞群と、反応性を示さず多数を占める CD3⁻WT31⁻ 未熟細胞群の 2 群から成ると考えられる。

分画 III において主体を成す CD3⁺HighWT31⁺High 細胞は、PHA・Con A 刺激に対して IL-2R α を発現するが増殖反応を示さず、rIL-2 添加により増殖することから、分画 I に属する CD3⁺HighWT31⁺High 細胞に比し未熟な細胞と考えられる。

分画 V 細胞群は、側方散乱の小さな CD3⁺LowWT31⁺Low 細胞が大部分を占め、種々の刺激に対して反応を示さない細胞集団であることから、活性化あるいは増殖へ導

く細胞内へのシグナル伝達に機能的障害を持つ細胞群と考えられる。

C β 遺伝子再構成の解析結果は、C β allele が2本とも再構成している細胞が全ての分画で主体を成すことを示した。

分画 I において非再構成 allele を他の分画に比べ多く認めたことは、2つの可能性を示唆する。第1は、分画 I に含まれる CD3⁺High WT31⁺High 細胞が1本目の allele の再構成により機能的 TCR を発現している可能性であり、第2は、CD3⁻WT31⁻細胞内で C β 遺伝子が再構成していない可能性である。CD3⁻WT31⁻細胞群は、数的に分画 I の主体を成すため、後者の場合にはジャームライン切断片が相当量残存する結果が予想される。

分画 V 細胞群のほとんどの細胞において、C β 遺伝子 allele が2本とも再構成している所見は、これらの細胞が、非機能的な TCR を発現している可能性を支持すると考えられる。

各分画細胞群における Fas 抗原の発現については、抗 Fas 抗体による解析では細胞表面への有意の発現を認めなかったため、感度の高い解析を目的として RT-PCR 法による解析を行った。

末梢血単核細胞において、PHA+ rIL-2 添加下 72 時間培養後に明らかな Fas 抗原遺伝子発現の増強を示したことは、Fas 抗原遺伝子発現が、増殖反応と関連する可能性を示唆する。

ヒト胸腺細胞においては、分画 I 細胞群が最も強く Fas 抗原遺伝子を発現した。抗 CD3 抗体添加下に Fas 抗原遺伝子発現の増強を認めたことは、CD3⁺High 細胞群における発現を強く示唆する。分画 I に含まれる CD3⁺High 細胞群は、機能的な TCR を発現していると考えられるため、Fas 抗原遺伝子発現においても、末梢血成熟 T 細胞と同様に増殖反応を誘導する条件下で増強する可能性が考えられる。一方、TCR 複合体を発現していない CD3⁻WT31⁻細胞群における Fas 抗原遺伝子発現を仮定すると、胸腺におけるクローン選択との関連は希薄と考えられる。さらに、胸腺細胞の大部分を占め、機能的 TCR を発現せず、ほとんどが排除される細胞と考えられる分画 IV・V 細胞群においても、Fas 抗原遺伝子の発現は認めなかった。このことも、Fas 抗原遺伝子の発現がヒト胸腺内でのクローン選択において主要な役割を担っていないことを示唆する所見と考えられる。

【結 語】

ヒト胸腺細胞における Fas 抗原遺伝子の発現を、RT-PCR 法により初めて解析した。Fas 抗原遺伝子の発現は、少数の胸腺細胞における増殖反応と相関する可能性が示唆された。しかし、クローン排除機構としてのアポトーシスには、Fas 抗原の関与は希薄であり、それ以外の分子に担われている可能性が考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 ・ 教 授 松 本 脩 三

副 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 小野江 和 則

学 位 論 文 題 名

ヒト胸腺細胞における Fas 抗原遺伝子発現の解析

—BSA 不連続濃度勾配法による胸腺細胞分画を用いた検討—

骨髓に存在する血液幹細胞から生じたpro T細胞は胸腺に移動し、T細胞受容体 (TCR) 遺伝子の再構成と細胞表面への発現を経て、自己抗原とは反応せず多様な外来抗原分子と反応する成熟Tリンパ球へ分化する。この胸腺における分化・成熟過程において自己・非自己の認識を成立させるためのクローン排除を担う機構としてプログラム細胞死すなわちアポトーシスが想定されており、多様な遺伝子の発現や細胞内の生化学的変化を伴うと考えられている。リンパ球のこのアポトーシスを誘導する細胞表面膜分子としてFas抗原が見い出され、マウスにおいては胸腺におけるクローン排除に関与している可能性が指摘されている。ヒトでは末梢血単核球における解析の報告はあるが、ヒト胸腺細胞におけるこの抗原の発現に関し、現在まで報告されていない。

本研究では、死滅しやすい多様な細胞の集団であるヒト胸腺細胞を、in vitroにおける細胞障害を最少にとどめて分画するために、ウシ血清アルブミン(BSA)不連続濃度勾配法を用いて群に分画し、夫々のFas抗原遺伝子発現を解析した。即ち、分画I細胞群は、 $CD3^{-}WT31^{-}$ 未熟細胞と $CD3^{+High}WT31^{+High}$ 成熟細胞に大別でき、PHA・Con A刺激により後者にIL-2R α の発現と増殖反応を認めた。分画III細胞群は、 $CD3^{+High}WT31^{+High}$ 細胞が主体であったが、PHA・Con A刺激に対しIL-2R α は発現したが増殖せず、rIL-2添加により増殖反応を認めた。分画V細胞群は、 $CD3^{+Low}WT31^{+Low}CD4^{+8^{+}}$ 細胞が主体であり、PHA・Con A刺激およびrIL-2添加に対しIL-2R α を発現せず増殖しないため、細胞内へのシグナル伝達に機能的障害を持つ細胞群と考えられた。

TCR β 鎖定常域(C β)のサザン・プロットの結果は、全ての分画でC β alleleが2本とも再構成していることを示したが、分画Iには非再構成alleleも存在した。

胸腺細胞では、分画I細胞が最も強くFas抗原遺伝子を発現し、抗CD3添加で発現が増強したことから、 $CD3^{+}H1\leq h$ 細胞においてFas抗原遺伝子が発現していると考えられた。分画III細胞における発現は分画I細胞に比べ弱く、抗CD3とrIL-2を添加することにより増強傾向を示した。分画V細胞群ではFas抗原遺伝子の発現は検出できなかった。これらの結果は、胸腺細胞においても、末梢血成熟T細胞と同様に、Fas抗原遺伝子の発現が増殖反応と関連していることを示唆する。

また、胸腺細胞の大部分を占め、排除される細胞と考えられる分画IV・V細胞群に発現を認めなかったことは、Fas抗原がヒト胸腺におけるクローン選択に主要な役割を担っているとは即断出来ない可能性があるものと考えられた。Fas抗原は、アポトーシスを直接介在することが確認されている唯一の分子であり、以上の如くその胸腺細胞における発現を解析することは、クローン排除機構の解明の小さい乍ら一歩となる可能性があると考えられ、学位論文として評価した次第である。

報告後、副査の小野江・上出両教授及び細川教授から多くの具体的な質問を受け、又後日副査の両教授から各個に長時間の質疑と指導を頂戴したが、いずれも最終的には合意の線が得られ合格と判定された。