

学位論文題名

胸腺内NK-T細胞の選択の機構の解析

学位論文内容の要旨

免疫系の中心的役割を担うT細胞は、前駆細胞が胸腺内にて、最も幼若なCD4⁻/CD8⁻(DN)の段階から、CD4⁺/CD8⁺(DP)の段階を経て、ついにはCD4あるいはCD8が単独陽性(SP)の成熟T細胞となることが知られている。ところが近年、胸腺内にDNであるが成熟フェノタイプを示すT細胞が存在することが明らかとなり、これらのT細胞は、T細胞としてのT細胞受容体 α/β 鎖とCD3複合体を発現すると同時に、NK細胞マーカーとされるNK1.1を発現していることから胸腺内NK-T細胞と呼ばれている。これらのT細胞は同時にCD16やIL-2R β などの分子を発現しており、T細胞とNK細胞の中間的性格を示す新しいT細胞亜集団である。さらにこれらが発現するT細胞受容体は、 β 鎖は高頻度にV β 8.2を、 α 鎖はV α 14J α 281C α 鎖という極めて均一なT細胞受容体を発現している。このように胸腺内NK-T細胞は従来のT細胞とは全く異なるユニークなT細胞亜集団としてその選択の機構や細胞機能が注目されている。そこで、今回各種遺伝子欠損マウスの胸腺細胞を用いてFACS解析およびRNaseプロテクションアッセイを施行し、胸腺内NK-T細胞の選択の機構について調べることを試みた。

その結果、以下の事実が明らかとなった。

1) 胸腺内NK-T細胞のポジティブセレクションには β 2ミクログロブリン(β_2m)分子と会合したMHCクラスI分子ないしはクラスI類似分子による抗原提示が必要である。FACS解析により、 β_2m 欠損マウスではNK-T細胞は、全胸腺細胞数の0.08±0.02%(平均値±標準誤差)であり、NK-T細胞がほとんど存在しなかった。一方、I-A β 鎖欠損マウスではNK-T細胞は、全胸腺細胞数の0.45±0.05%とクラスII分子の有無は無関係であると考えられた。

2) 胸腺内NK-T細胞のポジティブセレクションにはTAP1分子を介するペプチド抗原提示は必要としない。

クラスI類似分子によって提示されるペプチドがセレクションに関与しているかどうかについて、ペプチドトランスポーター遺伝子を欠損したTAP1欠損マウスについて調べた。驚くべきことに、FACS解析の結果TAP1欠損マウスにおいても胸腺内NK-T細胞は0.55±0.23%存在した。

3) 胸腺内NK-T細胞の分化にはCD16分子の発現は必要としない。

T細胞とNK細胞はともに胎生期胸腺に存在するCD16⁺CD3⁻の共通の前期細胞から分化する。また、胸腺内NK-T細胞はCD16分子を発現していることにより、胸腺内NK-T細胞の分化におけるCD16分子の発現の必要性を、CD16分子の発現を欠く

FcR γ 鎖遺伝子欠損マウスについて調べた。FACS解析の結果、このマウスで胸腺内NK-T細胞は、 $0.85 \pm 0.39\%$ 存在することが明らかとなった。

4) 胸腺内NK-T細胞はV α 14陽性T細胞と同一のT細胞亜集団であると考えられる。これまでに胸腺内NK-T細胞に発現されているTCRは、極めて均一なV α 14J α 281C α 鎖を使用していることが知られている。そこで、胸腺内NK-T細胞の存在との相関を調べるため、各遺伝子欠損マウスの胸腺におけるV α 14J α 281C α 鎖のmRNAの発現をRNaseプロテクションアッセイを用いて解析した。その結果、各遺伝子欠損マウスにおいてFACSによる胸腺内NK-T細胞の発現の有無と胸腺におけるV α 14J α 281C α 鎖mRNAレベルの発現の有無は一致していた。

今回の結果1)、4)およびV α 14陽性T細胞がMHCクラスI分子のハプロタイプとは無関係にほとんどの系統のマウスに発現していることにより、胸腺内NK-T細胞のポジティブセレクションには、古典的MHCクラスI分子とは異なる多型性に乏しい“ β 2mと会合したクラスI類似分子”が必要であることが示唆される。

また結果1)、2)より胸腺内NK-T細胞がペプチドトランスポーター非依存的にクラスI類似分子を認識していることが明らかとなったがこれについて以下の推測が可能である。

まず第一に、胸腺内NK-T細胞はクラスI類似分子の枠組みだけを、ペプチドの存在とは無関係に認識している可能性がある。次に、胸腺内NK-T細胞はTAP1を介するペプチド抗原提示経路とは異なる別の抗原提示経路を介してペプチドを認識している可能性もある。さらには、胸腺内NK-T細胞は糖脂質や炭水化物のようなペプチド以外のものをクラスI類似分子とともに認識しているのかもしれない。

また、結果3)より胸腺内NK-T細胞の分化にはCD16分子の発現は必要ないことが証明されたが、現時点では、胎生期胸腺に存在するT細胞とNK細胞の共通の前駆細胞においてCD16分子が発現していることの意義は明らかでない。

NK-T細胞の生体内の機能については1)急性期骨髄拒絶反応に関与する、2)NK-T細胞が自己の骨髄細胞の増殖を制御する、3)IL-2添加下での培養によりNK-T細胞がLAK活性を持つ、4)胸腺内CD4⁺/CD8⁺T細胞に対してFas-Fasリガンドを介する細胞障害活性を持つ、5)IL-4の産生細胞である、などが報告されているが、未だ不明な点も多い。また、NK-T細胞は骨髄、肝臓、脾臓などで胸腺外分化しているという説と胸腺内分化しているという説があり、NK-T細胞の分化経路と選択機構の解明は、その機能とともに今後の研究課題であるといえよう。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 小 野 江 和 則

副 査 教 授 上 出 利 光

学 位 論 文 題 名

胸腺内 NK - T 細胞の選択の機構の解析

免疫系の中心的役割を担う T 細胞は、前駆細胞が胸腺内にて、最も幼若な CD4⁺/CD8⁻(DN)の段階から、CD4⁺/CD8⁺(DP)の段階を経て、CD4あるいはCD8のいずれかが単独陽性(SP)の成熟 T 細胞となることが知られている。ところが近年、胸腺内に DN であるが成熟フェノタイプを示す T 細胞が存在することが明かとなり、これらの T 細胞は、T 細胞受容体 α/β 鎖と CD3 複合体を発現すると同時に、NK 細胞マーカーとされる NK1.1 を発現していることから胸腺内 NK-T 細胞と呼ばれている。さらに、これらが発現する T 細胞受容体は、 β 鎖は V β 8.2 を、 α 鎖は V α 14J α 281C α 鎖という極めて均一な T 細胞受容体を発現している。このように胸腺内 NK-T 細胞は従来の T 細胞とは全く異なるユニークな T 細胞亜集団であり、その分化の機構や細胞機能が注目されている。

そこで今回、各種の遺伝子欠損マウス (β_2 ミクログロブリンノックアウトマウス、I-A β 鎖ノックアウトマウス、TAP1 ノックアウトマウス、FcR γ 鎖ノックアウトマウス) の胸腺細胞を材料として FACS 解析および RNase プロテクションアッセイを施行することにより、胸腺内 NK-T 細胞の分化とセレクションの機構について調べることを試みた。

その結果、以下の事実が明かとなった。

- 1) MHC クラス I 分子の発現を欠く β_2 m 欠損マウス、および MHC クラス II 分子の発現を欠く I-A β 鎖欠損マウスの胸腺における NK-T 細胞の存在頻度を FACS を用いて解析したところ、 β_2 m 欠損マウスの胸腺には NK-T 細胞がほとんど存在しないのに対し、I-A β 鎖欠損マウスでは、正常マウスと同程度存在した。
- 2) ペプチドがセレクションに関与しているかどうかについて、ペプチドトランスポーター遺伝子を欠損した TAP1 (transporter associated with the antigen processing 1) 欠損マウスについて調べたところ胸腺内 NK-T 細胞は正常のマウスと同程度存在した。
- 3) T 細胞と NK 細胞はともに胎生期胸腺に存在する CD16⁺CD3⁻の共通の前駆細胞から分化することが知られており、胸腺内 NK-T 細胞は CD16 分子を発現している。胸腺内 NK-T 細胞の分化において CD16 分子の発現の必要性について、CD16 分子の発現を欠く FcR γ 鎖遺伝子欠損マウスを用いて調べたところ、胸腺内 NK-T 細胞は、対照の B6 マウスと同程度存在した。
- 4) これまでに胸腺内 NK-T 細胞に発現されている T 細胞受容体は、極めて高頻度に、ホモジニアスな V α 14J α 281C α 鎖を使用していることが知られている。そこで、各遺伝子欠損マウスの胸腺内 NK-T 細胞の存在と、胸腺における V α 14J α 281C α 鎖の発現との相関を調べるために、各々のマウス胸腺での V α 14J α 281C α 鎖の mRNA

Aの発現をRNaseプロテクションアッセイを用いて解析した。その結果、各遺伝子欠損マウスにおいて、FACSによる胸腺内NK-T細胞の存在の有無と胸腺におけるV α 14J α 281C α 鎖mRNAの発現は一致していた。

以上の結果より、NK-T細胞の分化、増殖にMHC class I分子が必須であるが、MHC class II分子は無関係であることが明らかになった。しかし、TAP-1欠損マウスの胸腺内NK-T細胞の分化は全く正常であり、NK-T細胞が空のMHC class I分子（ペプチドと結合していない）または、TAP1ペプチドトランスポーターとは独立した別の経路により抗原提示されたペプチドと結合したMHC分子を認識している可能性が示唆された。また、NK-T細胞はCD16分子を発現しているので、CD16分子が全く発現しえないFcR γ 鎖欠損マウスを用いてCD16分子が胸腺内NK-T細胞の分化に必須であるかについて検討した結果、CD16分子の発現は胸腺内NK-T細胞の分化と無関係であり、CD16分子発現の意義については今後さらに検討を加える必要があると思われる。

試問に際し、小野江教授よりNK-T細胞に関してT細胞受容体 α 鎖の使用頻度、V α 14陽性細胞の分化の場合、ポジティブセレクションにおけるClass I分子あるいはClass I類似分子の重要性、CD16分子の役割について質問があったが、申請者は概ね適切な答弁をした。また、副査の小野江教授、上出教授による本研究に関しての審査と面接を受け、合格と判定された。

以上により、本論文は学位授与に値するものと判定した。