

学位論文題名

Keratinocyte-Derived IL-7 Serves as a Growth Factor for Dendritic Epidermal T Cells in Mice

(角化細胞由来 IL-7 はマウス樹枝状表皮 T 細胞の増殖因子である)

学位論文内容の要旨

1. 目的

樹枝状表皮 T 細胞 (Dendritic epidermal T cells, DETC) はマウス表皮内に Thy1 抗原を発現し樹枝状の形態を有する $\gamma\delta$ T 細胞である。DETC が表皮内で増殖し生存するメカニズムを解明する目的で、我々は表皮角化細胞が DETC の増殖因子を分泌しているという仮説を検討した。我々及び他の研究から表皮内構成細胞は種々のサイトカイン (Epidermal cytokines) を産生することが明らかになって来ている [参考論文 (2)]。抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞 (Langerhans cell, LC) は IL-1 β , MIP-1 α , IL-6 を分泌 [参考論文 (1)] し、DETC は IL-2, IL-4, γ IFN を産生している [参考論文 (3)]。表皮の主要の構成細胞である表皮角化細胞 (keratinocyte, KC) は IL-1, IL-3, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, TNF- α など種々のサイトカインを産生している [参考論文 (1, 2)]。これらのサイトカインに加え、我々は表皮内に IL-7 の mRNA を検出したので IL-7 も Epidermal cytokines の一つと考えられた [参考論文 (1)]。これらの Epidermal cytokines のなかで DETC の増殖を促進したのは IL-2 と IL-7 であった [参考論文 (4)]。IL-2 は autocrine loop で DETC の増殖を促進することが知られているので、学位申請論文に於ては IL-7 の DETC に対する増殖・生存維持作用及び表皮内 IL-7 の由来について検討した。

2. 方法

1. 細胞: a) Epidermal cells; マウス腹部皮膚を 0.15% トリプシンで 4℃、16 時間処理後、真皮を分離した表皮を 0.3% トリプシンで 37℃、10 分間処理し表皮細胞浮遊液を調整した。FACS で分析すると Epidermal cell のおよそ 1% が DETC, 1% LC, 98% KC であった。Histopaque を用いた密度遠沈で培養液境界分画 (Interface epidermal cells, IEC) から DETC を 10-20% enrich した。さらに FACS を用いて IEC から Thy1 陽性細胞 (DETC) を分離調整した。b) 7-17 DETC; FACS で分離した AKR マウス由来 Thy1 陽性細胞を ConA と IL-2 の存在下で長期培養して樹立した。c) Pam 212; BALB/c マウス由来の表皮角化細胞株で培養上清は 300 万細胞/ml の密度で 18 時間培養した上清を集めた。

2. 増殖能の測定：細胞は完全RPM培地で96穴丸底プレート中で培養され、³H]thymidine (1 μ Ci/well)で16時間パルスした後、収穫され液体シンチレーションカウンターで³H]thymidineの取り込みを計測した。

3. RT-PCR: Epidermal cell, Pam 212細胞からmRNAを調整し、我々が以前発表した方法 [参考論文 (1)] で、IL-7 mRNAの発現を解析した。

3. 結果

マウス表皮からDETCをenrichしたIEC細胞分画 (10-20% DETC)とさらにそれをFACSでThy1陽性細胞(DETC)を集めた細胞分画の増殖に対するIL-7の影響を調べた。これらの細胞集団はmitogen (ConA)の刺激で増殖するが、IL-7はこの増殖をさらに増幅させる作用があった (図1)。次にIL-7のDETC細胞株 (7-17)の増殖に対する影響を検討した。ConA刺激によるDETCから分泌されるサイトカインの影響を除外する目的で7-17細胞をConAで刺激後7日間培養し良く洗った細胞に対するIL-7の影響を調べた。IL-7は単独でこのように処理した7-17細胞の増殖を誘導した。IL-7の増殖に対する作用はIL-2に比べ穏やかでしかも持続的であった (図2)。このIL-7による増殖は抗IL-7抗体で完全に抑制されたが、抗IL-2抗体では抑制されなかった。逆にIL-2による増殖は抗IL-2抗体で完全に抑制されたが、抗IL-7抗体では抑制されなかった。このことはIL-7はIL-2非依存性の機構によってDETCの増殖を誘導することを示している (図3)。次に7-17DETCのIL-7に対する増殖反応性は細胞のactivationの状態に依存しているかを検討した。ConA刺激後5日までのDETCはIL-7に反応してよく増殖するが、10日以上経過した細胞はIL-7で増殖しなかった (図4)。さらにそのようなIL-7不応性の細胞に対して生物活性を持っているかを検討した。増殖因子を含まない培地では7-17DETCは培養6日までに50%以上死んでしまうが、IL-7を加えるとほぼ100%の細胞を生存させることができた。またそれらの細胞はConAの刺激に反応した (図5)。以上より、IL-7は7-17DETCに対して増殖反応と生存維持作用という異なる二つの作用があると結論した。次に表皮内で共生するリンパ球(DETC)の生存と増殖を促進するこのサイトカインを表皮角化細胞が産生するかを検討した。RT-PCRにより、Epidermal cells及びマウス角化細胞株 (Pam 212)はIL-7 mRNAを発現しており、マウス角化細胞は恒常的にIL-7 mRNAを発現していると結論した (図6)。さらに表皮角化細胞が生物活性を持つIL-7を産生しているかを我々が確立した7-17DETCを用いたbioassayで検討した。Pam 212細胞上清は7-17DETCの増殖を促進し、その増殖を抗IL-7抗体で50%抑制した (図7)。残りの50%はPam 212が分泌するTNF- α の作用であった [参考論文 (4)]。このことから表皮角化細胞は生物活性をもったIL-7を分泌すると結論した。

4. 考察

DETCはマウス表皮内に角化細胞に直接接して常在する $\gamma\delta$ T細胞で、角化細胞が発現する接着分子及び分泌するサイトカインが表皮内でのDETCの生存及び機能に関与していると考えられる。本研究の結果、表皮角化細胞は生物活性をもったIL-7を産生し、IL-7はmitogenで刺激したDETCの増殖を促進し、さらにin vitroにおいてDETCの生存を支持することが明らか

にされた。IL-7は骨髄ストローマ細胞よりpre-B細胞の増殖を指標に同定された分子量25kDの糖蛋白で、胸腺細胞やT細胞の増殖も支持することが最近明らかとなった。IL-7のT細胞に対する作用機序はIL-7レセプターを介して直接増殖シグナルが伝達される場合とIL-2とそのレセプターの発現を介する系が報告されているが、DETCの場合はIL-2非依存性の機構によることが明らかとなった。またDETCのIL-7に対する反応性はDETCのactivationの状態に依存していた。IL-7はrestingな状態のDETCに対しては生存を維持する作用を持ち、activateされた細胞に対しては増殖因子として作用する。in vitroにおいてDETCはheat shockを与えた表皮角化細胞あるいはトランスフォームした細胞によってactivateされることが報告されている。DETCや他の上皮内 $\gamma\delta$ T細胞は周囲の上皮細胞が細菌・ウイルス感染したり、腫瘍化したり、ストレスが加わった時にactivateされると考えられている。DETCがこのようなシグナルによってactivateされたときに、周囲に存在する角化細胞が分泌するIL-7がDETCの増殖因子として働くことが考えられる。

5. 結語

以上より、表皮角化細胞は生物活性をもったIL-7を産生し、それは表皮内DETCの増殖・生存の維持に関与していると考えられる。このIL-7を介した表皮角化細胞のDETCに対する作用は、表皮内微小環境の中でDETCが物理的に生存し機能するのに重要な役割を演じていると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大 河 原 章
副 査 教 授 葛 巻 暹
副 査 教 授 皆 川 知 紀

学位論文題名

Keratinocyte-Derived IL-7 Serves as a Growth Factor for Dendritic Epidermal T Cells in Mice

(角化細胞由来 IL-7 はマウス樹枝状表皮T細胞の増殖因子である)

松江弘之提出の学位論文最終審査報告を致します。

樹枝状表皮T細胞 (Dendritic Epidermal T cells, DETC) はマウス表皮内にThy1抗原を発現し樹枝状の形態を有する $\gamma\delta$ T細胞であります。論文提出者は、DETCが表皮内で増殖し生存するメカニズムを解明する目的で、表皮角化細胞がDETCの増殖因子を分泌しているという仮説を検討しました。表皮内構成細胞は種々のサイトカイン (epidermal cytokines)を産生することが明らかになって来ております。また抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞 (Langerhans cell) はIL-1 β , MIP-1 α , IL-6を分泌し、DETCはIL-2, IL-4, γ IFNを産生していることが明らかにされております。他方、表皮の主要な構成細胞である表皮角化細胞 (keratinocyte)はIL-1, IL-3, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, TNF- α など種々のサイトカインを産生していることが知られております。これらのサイトカインに加え、松江らは表皮内にIL-7のmRNAを検出し、IL-7も epidermal cytokinesの一つと考えられることを報告しました。これらのEpidermal cytokinesのなかで、DETCの増殖を促進したのはIL-2とIL-7でありました。IL-2は autocrine loopでDETCの増殖を促進することが知られておりますので、本研究におきましては、IL-7のDETCに対する増殖・生存維持作用及び表皮内IL-7の由来について検討しました。

マウス表皮からDETCをenrichしたIEC細胞分画 (10-20% DETC)と、さらにFACSを用いてThy1陽性細胞(DETC)を集めた細胞分画の増殖に対してのIL-7の影響を調べました。これらの細胞集団はmitogenであるConAの刺激で増殖致しますが、IL-7はこの増殖をさらに増幅させる作用がありました。次にIL-7のDETC細胞株 (7-17)の増殖に対する影響を検討しました。その結果、IL-7は単独で7-17細胞の増殖を誘導しました。IL-7の増殖に対する作用はIL-2に比べ穏やかでしかも持続的でありました。このIL-7

による増殖は抗IL-7抗体で完全に抑制されましたが、抗IL-2抗体では抑制されませんでした。逆にIL-2による増殖は抗IL-2抗体で完全に抑制されましたが、抗IL-7抗体では抑制されませんでした。このことはIL-7はIL-2非依存性の機構によってDETCの増殖を誘導することを示しております。次に7-17DETCのIL-7に対する増殖反応性が、細胞のactivationの状態に依存しているかを検討しましたところ、IL-7は7-17DETCに対して増殖反応と生存維持作用という異なる二つの作用があることが判明致しました。次に表皮内で共生するリンパ球(DETC)の生存と増殖を促進するこのサイトカインを表皮角化細胞が産生するかを検討致しました。RT-PCRにより、epidermal cells及びマウス角化細胞株はIL-7mRNAを発現しており、マウス角化細胞は恒常的にIL-7mRNAを発現していることが示されました。さらに表皮角化細胞が生物活性を持つIL-7を産生しているかどうかを、7-17DETCを用いたbioassayで検討しましたところ、表皮角化細胞は生物活性をもったIL-7を分泌していることが確認されました。

口頭発表に当たり、葛巻教授からは、IL-7を発現させたtransgenic mouseにおいては、湿疹様皮膚炎が見られるかどうか、皆川教授からはIL-7以外のサイトカイン特に、beta-INF, gamma-INFとの関係はどうか、また上出教授からはIL-7のreceptorの検討をしているかどうか等のご質問を頂きましたが、申請者は概ね妥当な返答をなし得ました。更に後日、副査の葛巻教授、皆川教授からは個別にご審査を頂き合格と判定されました。

よって本論文は、表皮角化細胞は生物活性をもったIL-7を産生し、それは表皮内DETCの増殖・生存の維持に関与していること、またこのIL-7を介した表皮角化細胞のDETCに対する作用は、表皮内微小環境の中でDETCが物理的に生存し、機能するのに重要な役割を演じていることを明かにしたもので、博士・医学に値するものと判定されました。