

学位論文題名

トレロジェン産生細胞のフェノタイプとトレランス
誘導リンパ組織

—白血病モデルマウスを用いた骨髓キメラによる解析—

学位論文内容の要旨

I. 緒 言

T細胞抗原レセプター(TCR)の β 鎖 variable(V)領域が6番, 即ち $V\beta 6$ を発現する $V\beta 6^+$ T細胞は, minor lymphocyte stimulatory antigen(Mls)-1^a抗原とMHCクラスII分子複合体に反応する. 両者を自己抗原としてもつマウスでは, $V\beta 6^+$ T細胞は分化の過程で消去される. [Mls-1^b→Mls-1^a] 骨髓移植キメラでこの過程を分析すると, ドナー由来のMHCクラスII⁺ (特にI-E⁺) ストローマ細胞が重要な役割を果たすことが判明した. しかしこの組み合わせの骨髓キメラでは, ドナーストローマ細胞はMls-1^aを産生できない. 従って, ホスト細胞の産生するMls-1^a抗原が, ドナーのMHCクラスII⁺細胞に移行して, クラスII-Mls-1^a複合体を形成するものと考えられる. しかし, ホストMls-1^a産生細胞については, 詳細は不明である.

本研究ではプレB細胞白血病を発症するSL/Khマウスを用いて, 骨髓移植による白血病発症抑制効果を検討すると共に, Mls-1^a産生細胞について解析した. 先ずホスト抗原反応性T細胞のクローン消去をMls-1^a抗原をホスト抗原, $V\beta 6^+$ T細胞をホスト反応性細胞の一例として解析した. Mls-1^a抗原はマウス乳腺腫瘍ウイルス(MTV-7)の産物であるが, Mls-1^a抗原を白血病細胞特異抗原と想定すれば, 今回のシステムはgraft versus leukemia(GVL)を誘導し, 白血病再発予防に有効なモデルになると考えられる. 最後にトレロジェンであるMls-1^a抗原産生細胞のフェノタイプと, クローン消去が誘導されるリンパ組織の関係を解析した.

II. 実験方法

マウス : AKR/J(AKR)(H-2^k, Mls-1^a) は Jackson 研究所 より ,

C57BL/6(B6)(H-2^b, Mls-1^b), B10.BR(BR)(H-2^k, Mls-1^b), B10.D2(D2)(H-2^d, Mls-1^b)は静岡実験動物センター, SL/Kh(SL)(K^s, A^q, D^q)は日合博士(京大・病理)より供与されたものを免疫科学研究所で維持し, 用いた。

骨髓キメラ: コントロール骨髓キメラは従来の方法に従って, T細胞除去骨髓細胞を致死量X線照射マウスに移注し, 作製した。またドナー細胞を抗Thy1抗体で処理する際, 補体(C)を加えないことによって, マイナー移植細胞対宿主反応(GVHR)キメラを作製した。一部の実験では[BR→BR]同系骨髓キメラ作製後1週目に, (AKR×BR)F₁マウスのT細胞サブセットを静注した。

細胞表面解析: キメラ作製後5-7週目に各リンパ組織を採取し, 表面抗原を解析した。細胞精製はナイロンウールカラム通過後, 抗CD4又は抗CD8抗体で処理し, ダイナビーズで精製した。FACS解析は抗CD3ε鎖抗体(2C11), 抗Vβ8TCR抗体(F23.1), 抗Vβ6TCR抗体(44-22-1)で染色後, 従来の方法に従った。

混合リンパ球反応(MLR): MLRはAKRマウス, または(AKR×BR)F₁マウスよりCD4⁺またはCD8⁺T細胞分画を得, 抗CD44単クローン抗体で処理後, FACStarによりソーティングし, 刺激細胞とした。BR APC存在下で, 精製刺激細胞でBR T細胞を刺激し, 結果は既報のごとくBR T細胞中の芽球化したVβ6⁺T細胞の割合で判定した。活性化AKR刺激細胞によるMLRは, 抗Vβ8.2⁺抗体で固相化したプレートに, Vβ8.2⁺T細胞を除いたBRの反応細胞とAPC, さらに分画したAKRのT細胞を共培養し行った。

PCR: 全RNAはリンパ球分画又はT細胞より得, 逆転写を行った。逆転写により得たcDNAをMls-1^a特異的PCRプライマーによって増幅した。

Ⅲ. 結 果

1. アロ骨髓移植によるSLマウスの白血病発症の抑制。無処置SLマウスは生後36週以内にすべて白血病で死亡し, 10Gy照射後SL骨髓を移植した同系キメラも同程度の生存曲線を示した。しかしアロであるB6マウスの骨髓を移植した[B6→SL]キメラの場合は約70%が36週以後も生存し, アロ骨髓移植がSLマウスのプレB細胞白血病発症を予防することが確認された。

2. SLホストキメラにおけるVβ6⁺細胞の消去。SLマウスのMTV-7をPCRで調べた結果, SLマウスはMls-1^aであることが判明した。コントロール[D2→SL]キメラでは移植後5週で, 胸腺, リンパ節中のVβ6⁺T細胞の割合がそれぞれ, 1%, 0%と消去された。GVHR[D2→SL]群でのVβ6⁺T細胞の割合は, 胸腺で10%, リンパ節で6%と, 有意の消去は見られなかった。これらは従来報告された, T細胞白血病自然発症系マウスAKRをホストとした[D2→AKR]の結果と一致した。すなわちマイナーGVHRにより, Mls-1^aを産生するホスト側T細胞の完全除去が生じ, その結果Vβ6⁺細胞のクローン消去が誘導されなかったと考えられた。

3. Mls-1^aを産生するT細胞サブセット。MLR後のVβ6⁺T細胞の割合を見ると,

AKRマウスのCD8⁺T細胞刺激群では26.0%，CD4⁺T細胞刺激群では14.1%とCD8⁺T細胞が強い刺激活性を示した。また同じCD8⁺亜群の中では，メモリータイプと考えられるCD44⁺サブセット(61.8%)が，CD44⁻サブセット(20.8%)より強い刺激活性，即ち強いMls-1^a産生能を示した。

4. Mls-1^aT細胞サブセットによるVβ6⁺T細胞のクローン消去。骨髓移植後1週目に，[BR→BR]同系キメラに，(AKR×BR)F1マウスのCD8⁺CD44⁺T細胞を静注すると，Vβ6⁺T細胞が胸腺CD4⁺CD8⁻，CD4⁻CD8⁺細胞中，それぞれ3.0%，2.8%（コントロール：7.7%，13.0%），リンパ節CD4⁺，CD8⁺細胞中，それぞれ1.8%，3.1%（コントロール：7.3%，12.0%）と，有意のクローン消去が誘導された。しかしCD8⁺CD44⁻T細胞は，リンパ節中のVβ6⁺T細胞の消去はわずかながら誘導したが，胸腺では消去を生じなかった。

IV. 考 察

白血病に対する骨髓移植で，GVHRが有利に働く報告が増加してきた。即ちGVHRの主役のドナーT細胞によって，拒絶に働くホスト側のT細胞やNK細胞が除去されると同時に，白血病細胞を根絶やしにするGVLへとつながると考えられる。

今回の実験ではGVHRとコントロール[B6→SL]キメラ間に生存率の差は認められなかったが，GVHRキメラではホスト側T細胞の早期の消失が見られた。そしてMls-1^a+MHCクラスII反応性のドナーVβ6⁺T細胞が，このようなキメラでは長期間認められた。SL及びAKRの白血病は，いずれも腫瘍ウイルスによって生じることが知られている。これらのウイルス産物が腫瘍特異抗原として同定でき，この抗原に反応性を示すT細胞レパートリーが同定されれば，今回著者が解析したMls-1^a+クラスII抗原に対するVβ6⁺T細胞の系が，そのままGVLのシミュレーションとして応用できるのではないかと期待される。

今回明らかになったことは，Mls-1^aを産生する細胞は，T細胞の中でもCD8⁺CD44⁺分画にあることである。またVβ6⁺T細胞のクローン消去が，CD8⁺CD44⁺T細胞を静注した[BR→BR]キメラの胸腺，リンパ節で誘導されるのに対し，CD8⁺CD44⁻静注群ではリンパ節でのみ認められる点から，CD44分子の発現が，Mls-1^aの高い産生量と相関するのみならず，T細胞の組織分布にも影響を与えることが考えられた。すなわち胸腺内にトレロジェンのT細胞が入るためには，CD44分子が必要ではないかと考えられた。

V. 結 語

アロ骨髓移植によって，SLマウスでのプレB細胞白血病の発症を抑制した。本移植系においても，移植時のマイナーGVHRによって，Mls-1^a反応性T細胞クローンの消去が生じなかった。Mls-1^a産生細胞の解析の結果，CD8⁺CD44⁺細胞がMls-1^a抗原を効率よく産生し，胸腺，リンパ節においてVβ6⁺T細胞のクローン消去を

誘導することが判明した。従って、コントロール [D2→SL] キメラにおける Mls-1⁺産生細胞は、ホストCD8⁺CD44⁺T細胞と考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小野江 和 則

副 査 教 授 柿 沼 光 明

副 査 助教授 上 出 利 光

学 位 論 文 題 名

トレロジェン産生細胞のフェノタイプとトレランス 誘導リンパ組織

ー白血病モデルマウスを用いた骨髓キメラによる解析ー

本研究では、主としてプレB細胞白血病を発症するSL/Khマウスと、胸腺型白血病を発症するAKRマウスを用いて、骨髓移植による白血病発症の抑制効果を検討した。また宿主抗原反応性T細胞のクローン消去をMls-1*抗原を宿主抗原、 $V\beta 6^+$ T細胞を宿主抗原反応性細胞の一例として解析した。Mls-1*抗原は内因性マウス乳腺腫瘍ウィルス(MTV-7)の産物であるが、Mls-1*抗原を白血病細胞特異抗原と想定すれば、今回のシステムは graft versus leukemia (GVL)を誘導し、白血病再発予防法を開発していく上での有効なモデルになると考えられる。最後に、トレロジェンであるMls-1*抗原産生細胞のフェノタイプと、クローン消去が誘導されるリンパ組織の関係を解析した。

無処置SLマウスは、生後36週以内に全て白血病で死亡し、10Gy照射後SL骨髓細胞を移植した同系キメラも同程度の生存曲線を示した。しかしアロであるB6マウスの骨髓を移植した[B6→SL]キメラの場合は約70%が36週以後も生存し、アロ骨髓移植がAKRマウスの場合と同様、SLマウスのプレB細胞白血病発症を予防することが確認された。しかし、今回の実験ではGVHRとコントロール[B6→SL]キメラ間に生存率の差は認められなかった。SLマウスのMTV-7をPCRで調べた結果、SLマウスはMls-1*であることが判明した。コントロール[D2→SL]キメラでは移植後5週で、胸腺、リンパ節中の $V\beta 6^+$ T細胞の割合がそれぞれ1%、0%と消去された。移植時少数のドナーT細胞を混入させ、マイナーGVHRを誘導したGVHR[D2→SL]群での $V\beta 6^+$ T細胞の割合は、胸腺で10%、リンパ節で6%と、有意の消去は見られなかった。従って、マイナーGVHRにより、Mls-1*を産生する宿主側T細胞の完全除去が生じ、その結果 $V\beta 6^+$ T細胞のクローン消去が誘導されなかったと考えられた。

次にMls-1*産生細胞を同定するために、混合リンパ球反応でAKRマウス由来T細胞サブセットの刺激能を解析した。その結果、AKRマウスの $CD8^+$ T細胞が強い刺激活性を示すことが判明した。また同じ $CD8^+$ 亜群の中では、メモリータイプと考えられる $CD44^+$ サブセットが、

CD44⁻サブセットより強い刺激活性、即ち強いMls-1⁺産生能を示した。同様にMls-1⁺同系キメラを用い、*in vivo*のクローン消去アッセイでMls-1⁺産生細胞を解析した結果でも、(BR×AKR)F₁マウスのCD8⁺CD44⁺T細胞が強いMls-1⁺産生能を示し、また胸腺、リンパ節両者においてVβ6⁺T細胞のクローン消去を誘導した。しかし、CD8⁺CD44⁻T細胞は、リンパ節でのみVβ6⁺T細胞の部分的消去を示したにすぎなかった。

今回の研究で、GVHRキメラでは宿主側T細胞の早期の消失が見られた。そしてMls-1⁺+MHCクラスII抗原反応性のドナーVβ6⁺T細胞の産生が、このようなキメラでは長期間認められた。SLおよびAKRマウスの白血病は、いずれも腫瘍ウイルスによって生じることが知られている。これらのウイルス産物が腫瘍特異抗原として同定でき、このMls-1⁺+クラスII抗原に対するVβ6⁺T細胞の系が、そのままGVLのシュミレーションとして応用できるのではないかと期待される。また今回初めて明らかになったことは、CD44分子の発現がMls-1⁺の高い産生量と相関するのみならず、トレロジェン(Mls-1⁺)産生T細胞の組織分布にも影響を与えることである。

口頭発表にあたり、柿沼教授よりGVHRによる延命効果、AKRとSLマウスを用いた理由などについて質問があったが、申請者は大旨適切な解答を成し得た。また副査の柿沼、上出両教授には個別に御審査いただき、合格と判定された。以上、本研究は骨髄移植による白血病発症に対する予防効果を確認し、またGVHRによって宿主抗原反応性T細胞が長期間産生されるメカニズムを明らかにした。これらは将来graft versus leukemiaの導入につながるもので、博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。