

学 位 論 文 題 名

胸腺上皮細胞の抗原提示による $CD4^+$ T 細胞クローンの選択的活性化誘導の研究

学位論文内容の要旨

様々なタイプの細胞が抗原提示細胞 (APC) となり得ることが知られている。その中でも、表皮細胞、アストロサイト、胸腺上皮細胞といった組織特異的に存在する non-professional APC は、局所特異的免疫反応を誘導する可能性が考えられ、これらの詳細な解析が注目されている。実際、表皮細胞は偶発的に変異主要組織適合抗原複合体 (altered MHC) を発現し、そのため表皮細胞によりペプチド抗原提示をされた T 細胞は完全には活性化されないことが報告されている。また、胸腺上皮細胞は professional APC とは異なる様式で抗原提示活性を示すことから、胸腺細胞のセレクションに関与する可能性が報告されている。つまり、non-professional APC は有効な副シグナル分子を欠くことが多く、そのため抗原刺激された T 細胞は増殖反応やインターロイキン-2 (IL-2) 産生を欠き、アナジー状態に陥る。しかし、アナジー状態の T 細胞が細胞障害活性を示したり、IL-4 を産生することが報告されている。従って、non-professional APC は T 細胞のアナジー状態を誘導することで、生体にとって必要な T 細胞活性化反応を能動的かつ選択的に誘導していると考えられる。又、このようにして部分的に活性化された T 細胞が、末梢トレランスの成立に関与していることも示唆されている。従って、non-professional APC である胸腺上皮細胞の抗原提示能を詳細に解析することは胸腺細胞の分化を考える上でも重要なことと考えられる。

本論文においては、ハトチトクローム c 43 番から 58 番残基よりなるペプチド (p43-58) 特異的 $CD4^+$ T 細胞クローン (DB14) に誘導される様々なエフェクター機能 (細胞増殖反応、サイトカイン産生能、細胞障害活性、detachment 活性、細胞表面活性化抗原の上昇など) をパラメーターにして、non-professional APC (I-A^b L 細胞、胸腺髄質由来上皮細胞 (m-TEC)、胸腺皮質由来上皮細胞 (c-TEC)) の抗原提示能を詳細に比較検討した。その結果は以下の 3 点にまとめられる。

1. まず、胸腺上皮細胞を IFN- γ 存在下で培養することにより、細胞表面上に MHC class II, I-A^b 分子を発現誘導させた後、胸腺上皮細胞の抗原提示により誘導される T 細胞クローンの増殖反応を解析した。その結果、T ハイブリドーマ、幾つかの T 細胞クローン、ラインには増殖反応が誘導されたことから、胸腺上皮細胞上の I-A^b 分子は機能的であることが明らかとなった。しかし、DB14 T 細胞クローンには全く増殖反応が誘導されなかった。次に、他の幾つかの T 細胞クローンと DB14 のサイトカイン産生能を解析したところ、他の T 細胞クローンにおいては、増殖反応に比例したサイトカイン産生が認められ、DB14 においても、抗原高濃度において若干の IFN- γ , TNF の産生が認められた。しかし、DB14 のエフェクター機能の一つである細胞障害活性を解析したところ、I-A^b L 細胞による抗原提示後に、有意な DB14

の細胞障害活性が誘導されたのに対して、m,c-TECの抗原提示では細胞障害活性は全く誘導されず、有意な detachment 活性が誘導された。すなわち DB14は APCでありターゲット細胞である m,c-TECの膜透過性喪失、核断片化いづれも誘導しないが、m,c-TECを“剥がす“(peeling off) 活性が有意に誘導された。以上のことより m,c-TECの抗原提示によって、DB14 T細胞クローンのエフェクター機能が選択的に誘導されることが判明した。

2. 次に、m,c-TEC 抗原提示により誘導されたT細胞クローン、DB14のエフェクター機能、detachment 活性に関して解析した。1990年に Russel らが、detachment 活性は細胞障害活性とは異なるエフェクター機能であると報告している。この detachment 活性がT細胞の能動的な機能であることを確認するため、以下の実験を行った。まず、実際、m,c-TECの抗原提示によりDB14のチロシンリン酸化がおきているかどうかを確認するため、ウエスタンブロットを試行した。その結果、出現するバンドのパターンは異なるが、抗原刺激により有意にチロシンリン酸化が認められた。次に、このチロシンリン酸化が detachment 活性機能に関与しているか否かを解析するために、phosphotyrosin kinase (PTK) inhibitorであるゲニステインでDB14を処理後、その機能を解析した。その結果、ゲニステイン処理されたDB14では、I-A^bL細胞の抗原提示によって誘導される増殖反応、細胞障害活性がゲニステイン濃度依存性に抑制された。一方、c-TECの抗原提示により誘導される detachment 活性も、ゲニステイン濃度依存性に抑制されることから detachment 活性は PTK 依存性のT細胞エフェクター機能であることが判明した。

この detachment 活性と細胞障害活性との関係についてだが、1) IL-2 添加により m,c-TECの抗原提示によるDB14の増殖反応は回復した。この際、DB14の detachment 活性も増加するが、細胞障害活性への移行が認められないことが観察された。2) 細胞障害活性のターゲット細胞の膜透過性喪失と核断片化との相関性が認められたが、detachment 活性とDNA断片化との相関性は認められなかった。3) 他のT細胞クローン、ラインはあらゆるAPCに対して細胞障害活性を示さないが、I-A^bL細胞に対しては detachment 活性のみを示した。4) 上で述べたウエスタンブロットの解析より、I-A^bL cellsにより抗原提示された時とc-TECにより抗原提示された時のDB14におけるリン酸化バンドが異なったパターンを示した。以上のことから、細胞障害活性 detachment 活性は量的というよりはむしろ質的に異なる機能であると考えられた。

3. 胸腺上皮細胞の抗原提示により DB14の機能が選択的に誘導されることが判明した。アナジー状態のT細胞は細胞障害活性などの幾つかのエフェクター機能が発揮しうることが1993年に Dr.Germainをはじめ何人かの科学者により報告されている。そこで、この胸腺上皮細胞の抗原提示によるDB14の選択的機能、detachment 活性がアナジーに含まれる機能であるのかどうかを検討した。

m, c-TECの抗原提示によりDB14では活性化抗原 (CD69, IL-2R α chain, IL-2R β chain, CD44, cell volume)の有意な上昇、IL-2添加により増殖反応の回復が認められ、この状態はアナジーの特徴と極似していた。そこで実際に、DB14にアナジーが誘導されているか否かを restimulation assay にて調べた。DB14を、最初の抗原刺激でECDI処理した脾細胞をAPCに用いると、次の放射線照射脾細胞での抗原刺激に対して増殖低反応を呈しアナジー状態に陥る。しかし、最初に、胸腺上皮細胞で抗原提示した後、次の放射線照射脾細胞での抗原刺激においてDB14は増殖低反応は示さず、胸腺上皮細胞の抗原提示によりアナジーは誘導されていないことが判明した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小野江 和 則
副 査 教 授 上 出 利 光
副 査 教 授 小 林 邦 彦

学 位 論 文 題 名

胸腺上皮細胞の抗原提示による CD4⁺ T 細胞クローンの選択的活性化誘導の研究

表皮細胞, アストロサイト, 胸腺上皮細胞などの組織特異的 non-professional 抗原提示細胞 (APC) は, 局所特異的免疫反応を誘導する可能性が考えられている. 実際, 胸腺上皮細胞は professional APC とは異なる様式で抗原提示活性を示すことから, 胸腺細胞のセレクションに参与する可能性が報告されている. 従って, 胸腺上皮細胞の抗原提示能を詳細に解析することは, 胸腺細胞の分化を考える上でも重要なことと考えられる.

本論文においては, ハトチトクローム c43 番から 58 番残基よりなるペプチド(p43-58) 特異的 CD4⁺ T 細胞クローン(DB14) に誘導される様々なエフェクター機能をパラメーターにして, non-professional APC (I-A^b L 細胞, 胸腺髓質由来上皮細胞 (m-TEC), 胸腺皮質由来上皮細胞 (c-TEC))の抗原提示能を詳細に比較検討した.

まず, IFN- γ 存在下で培養し, 細胞表面上に I-A^b 分子を発現させた胸腺上皮細胞の抗原提示により, T ハイブリドーマ, 幾つかの T 細胞クローン, ラインには増殖反応が誘導された. 従って, 胸腺上皮細胞上の I-A^b 分子は機能的であることが明らかとなった. しかし, DB14 T 細胞クローンには全く増殖反応が誘導されなかった. また, 他の T 細胞クローンにおいては, 増殖反応に比例したサイトカイン産生が認められたが, DB14 は, 抗原高濃度において若干の IFN- γ , TNF の産生が認められるのみであった. 次に, 細胞障害活性を解析したところ, I-A^b L 細胞による抗原提示後に, 有意な DB14 の細胞障害活性が誘導されたのに対して, m,c-TEC の抗原提示では細胞障害活性は全く誘導されず, 著明な detachment 活性のみが誘導された. 以上より m,c-TEC の抗原提示によって, DB14 T 細胞クローンのエフェクター機能が選択的に誘導されることが判明した.

次に, detachment 活性が T 細胞の能動的な機能であり, m,c-TEC の抗原提示により DB14 のチロシンリン酸化がおきていることを確認するため, ウェスタンブロットを試行した. その結果, I-A^b 細胞で刺激されたものと出現するバンドのパターンは異なるが, m,c-TEC による抗原刺激後に DB14 細胞質に有意なチロシンリン酸化が認められた. また phosphotyrosin kinase (PTK) inhibitor のゲニステインで処理された DB14 では, c-TEC の抗原提示により誘導される detachment 活性が抑制されることから, detachment 活性は PTK 依存性の T 細胞エフェクター機能であることが判明した. さらに, detachment 活性は IL-2 添加により増加するが, 細胞障害活性への移行が認められなかった. また, detachment 活性と DNA 断片

化との相関性は認められなかった。以上より、細胞障害活性と detachment 活性は量的というよりはむしろ質的に異なる T 細胞機能であると考えられた。また m, c-TEC の抗原提示により、DB14 では活性化抗原 (CD69, IL-2R α chain, IL-2R β chain, CD44) および細胞容積の有意な上昇、また IL-2 添加による増殖反応の回復が認められ、この状態はアナジーの特徴と極似していた。そこで実際に、DB14 にアナジーが誘導されているか否かを restimulation assay にて調べたが、TEC の抗原提示によりアナジーは誘導されていないことが判明した。

以上より胸腺上皮細胞は通常の APC とは異なる部分的活性化を T 細胞に誘導することが明らかとなった。この活性化パターンは胸腺内における胸腺上皮細胞の機能を反映するものと考えられ、今後の胸腺機能の研究に一石を投じた。

公開発表にあたって、副査の小林邦彦教授より DB14 という特殊な T 細胞クローンを用いた結果をどのように生体内の現象と結びつけるのか、detachment 現象の分子メカニズムについて、上出利光教授より、胸腺上皮細胞によってアナジーが誘導されないことをむしろ能動的現象として捉えられないのか、detachment 活性の生理学的意味、主査の小野江より胸腺髄質と皮質上皮細胞の APC 活性の差について、副刺激分子について質問があったが、申請者は大概妥当な回答をした。審査員一同は胸腺上皮細胞によって示される特有な APC 活性を自分の豊富な実験結果を元に解明した成果を高く評価し、申請者が博士（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。