

学 位 論 文 題 名

*aly/aly*マウスにおけるNK1.1⁺T細胞の欠損と胸腺構築

学位論文内容の要旨

はじめに

胸腺細胞の中に T cell antigen receptor (TCR) $\alpha\beta$ 鎖を細胞表面上に発現し、かつ natural killer (NK) 細胞特異的抗原である NK1.1 を発現するユニークな細胞亜群 (NK-T 細胞) が存在する。NK-T 細胞は通常の胸腺細胞とは異なり、CD4⁺CD8⁺細胞と CD4⁺CD8⁻細胞のみから構成される。また TCR β 鎖では 50%以上の細胞が V β 8 を発現するほか、V β 7、V β 2 の発現が主で、 α 鎖では主として V α 14-J α 281 を発現するなど、他のメジャーな胸腺細胞と比べて非常に偏った TCR レパートリーを形成している。細胞表面抗原の発現パターンは、一度活性化されたメモリー型 T 細胞のタイプに類似している。組織分布では、胸腺以外に骨髓、肝臓に多く認められ、成熟型 T 細胞の 10~30%を占めるが、脾臓では 1%内外、リンパ節にはほとんど認められない。また、NK-T 細胞は、通常の T 細胞が正の選択を受ける胸腺上皮細胞ではなく、CD4⁺CD8⁺胸腺細胞上の CD1 分子によって正の選択を受けるとされている。このように NK-T 細胞は、通常の T 細胞とは細胞系列が異なる亜群と考えられるが、その詳細については不明な点が多い。最近の報告では、自己免疫疾患との関連で *lpr* マウスやヒトの多発性硬化症の際に、NK-T 細胞が病態の進行に伴って減少することが明らかにされ、注目されている。

今回、申請者はリンパ節とバイエル板を完全に欠損する *aly/aly* (alymphoplasia の略) マウスの NK-T 細胞を解析し、このマウスには NK-T 細胞がほとんど存在しないことを見だし、また *aly/aly* マウスにおける NK-T 細胞の分化について検討した。

結果

aly/aly マウスの胸腺細胞を抗 TCR $\alpha\beta$ 抗体と抗 NK1.1 抗体で染色して FACS で解析すると、NK-T 細胞の割合は胸腺細胞全体の 0.05%であり、*aly/+*、B6 マウスの 0.61%、0.75%と比べて極端に少ないことが判明した。脾臓、骨髓においても、NK-T 細胞の割合は *aly/+*、B6 マウスと比べて約 1/2~1/4 程度であった。また、実数においても *aly/aly* マウスでは NK-T 細胞が減少していた。

aly/aly マウスにおける胸腺内 NK-T 細胞数の低下の原因が骨髓由来の前駆細胞側にあるのか、それとも胸腺内微小環境側にあるのかを調べるために、*aly/aly*、*aly/+* マウス間で骨髓移植実験を行った。その結果、*aly/+* マウスをレシピエントとした [*aly/+* $\rightarrow$ *aly/+*]、[*aly/aly* $\rightarrow$ *aly/+*] キメラマウスには、通常の割合の胸腺内 NK-T 細胞が認められたのに対して、*aly/aly* をレシピエントとした [*aly/+* $\rightarrow$ *aly/aly*]、[*aly/aly* $\rightarrow$ *aly/aly*] キメラマウスの胸腺内 NK-T 細胞数は、前者の

1/8～1/10 程度であることが判明した。従って、*aly/aly*、*aly/+*マウスの何れのNK-T細胞の前駆細胞も、正常な胸腺の中ではNK-T細胞に分化しうることが示唆され、*aly/aly*マウスの胸腺内NK-T細胞がほとんど存在しないのは、*aly/aly*マウスの胸腺内微小環境の異常によるものと考えられた。そこで、胸腺内微小環境の役割を直接確認するために、生後5週で胸腺摘出(ATx)した*aly/aly*マウスに致死量の放射線を照射し、*aly/aly*骨髄細胞で再建した[*aly/aly*→ATx, *aly/aly*]キメラマウスを作製した。このキメラの腎皮膜下に、デオキシグアノシンで処理して骨髄由来細胞を除去した正常マウスの胎児胸腺を移植した。その結果、*aly/aly*骨髄由来細胞が正常マウス胎児胸腺内で胸腺細胞へと分化し、移植後10週では正常胸腺と同程度に全胸腺中の0.9%がNK-T細胞であることが判明した。従って、NK-T細胞の分化には正常な胸腺の存在が必須であることが示された。

*aly/aly*マウスの胸腺を組織学的に*aly/+*マウスと比較して検討してみると、正常の構築を示す*aly/+*マウス胸腺に対して、*aly/aly*マウスの胸腺は髓質領域が極めて狭小であり、皮髓境界が不明瞭であった。また、胸腺皮質上皮細胞、髓質上皮細胞に特異的な抗体であるER-TR4、ER-TR5でそれぞれ免疫染色をしてみると、*aly/+*マウスと比べて*aly/aly*マウス胸腺では皮質領域がER-TR4で強く染色されたが、髓質領域のER-TR5による染色は微弱であった。次に、骨髄キメラマウスの胸腺を組織学的に見ると、[*aly/aly*→*aly/+*]キメラマウスでは*aly/+*マウスと同様に正常な胸腺構築を示したが、[*aly/+*→*aly/aly*]キメラマウスでは狭小な髓質と不明瞭な皮髓境界が認められ、*aly/aly*マウスの胸腺と同様の組織像を呈した。これらの組織像から*aly/aly*マウス胸腺の構築異常は、胸腺上皮細胞そのものの異常に起因するもので、この異常は正常胸腺細胞による再建によって修復されないことが判明した。

B6などの正常マウスでは、抗CD3抗体(2C11)の静脈内投与短時間(90分)後に脾細胞が大量のIL-4を分泌すること、このIL-4産生はNK-T細胞によることが知られている。そこで、NK-T細胞が少ない*aly/aly*マウスではどのような反応性を示すかをB6、*aly/+*マウスと比較した。その結果、2C11投与によって*aly/+*マウス脾細胞はB6マウスと同程度のIL-4を産生したが、*aly/aly*マウスではほとんどIL-4産生が認められなかった。また、*aly/aly*をレシピエントとした[*aly/+*→*aly/aly*]、[*aly/aly*→*aly/aly*]キメラマウスでも、IL-4の産生がほとんど認められず、*aly/+*をレシピエントとした[*aly/+*→*aly/+*]、[*aly/aly*→*aly/+*]キメラマウスの1/3～1/7程度であった。これらの結果は、IL-4産生能低下とNK-T細胞数減少が相関することを示す。しかし、IL-4産生能は*aly/aly*マウスの脾臓内NK-T細胞数の減少から予想される値よりもさらに下回っており、*aly/aly*マウスのNK-T細胞は細胞数が少ないのみならず、機能的にも不完全であることが判明した。

考察

*aly/aly*マウスの異常は常染色体劣性遺伝形式をとり、リンパ節、パイエル板の欠損以外に胸腺、脾臓に構造的な異常を示すと報告されている。また、血清IgA、IgGがほとんど検出されず、同種皮膚移植片の拒絶不全や遅延型過敏反応の減弱が見られるなど、B細胞とT細胞の両者に異常があると考えられている。しかし、*in vitro*のリンパ球反応はほ

は正常であるなど免疫学的には解明すべきことが多い。ヘテロ接合体の *aly/+* マウスは見かけ上正常である。今回、主として *aly/aly* マウスと *aly/+* マウスを用いて NK-T 細胞の分化と胸腺の構築異常の関係を解析した。その結果、*aly/aly* マウスには胸腺内 NK-T 細胞がほとんど存在せず、胸腺上皮細胞、特に髄質上皮に異常を示すことが判明した。また、この原因は NK-T 細胞の骨髄由来前駆細胞側ではなく胸腺内微小環境側にあることが、*aly/aly* マウスと *aly/+* マウスとの間の骨髄移植実験と胸腺移植実験によって明らかになった。本研究は、NK-T 細胞の分化には骨髄由来細胞だけではなく、正常な胸腺上皮細胞も必要であることを初めて示した。現在、NK-T 細胞異常と自己免疫疾患などの関連が世界的に注目を集めているが、今回の発見はこれらの疾患の病因を追求していく上で重要と考えられる。

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 池 隆 夫

学 位 論 文 題 名

*aly/aly*マウスにおけるNK1.1⁺T細胞の欠損と胸腺構築

胸腺細胞の中にT cell antigen receptor(TCR) $\alpha\beta$ 鎖を細胞表面上に発現し、かつ natural killer (NK) 細胞特異的抗原であるNK1.1を発現するユニークな細胞亜群(NK-T細胞)が約1%存在する。NK-T細胞は、通常のT細胞が正の選択を受ける胸腺上皮細胞ではなく、CD4⁺CD8⁺胸腺細胞上のCD1分子によって正の選択を受けることから、通常のT細胞とは細胞系列が異なる亜群と考えられるが、その詳細については不明な点が多い。今回、申請者はリンパ節とパイエル板を完全に欠損する *aly/aly* (alymphoplasia の略) マウスにおけるNK-T細胞の分化について検討した。

aly/aly マウスの胸腺NK-T細胞の割合は、胸腺細胞全体の0.05%であり、*aly/+*、B6マウスと比べて極端に少なかった。脾臓、骨髄においても、NK-T細胞の割合は *aly/+*、B6マウスと比べて約1/2~1/4程度であった。

aly/aly マウスにおける胸腺内NK-T細胞数の低下の原因が骨髄由来の前駆細胞側にあるのか、それとも胸腺内微小環境側にあるのかを調べるために、*aly/aly*、*aly/+*マウス間で骨髄移植実験を行った。その結果、*aly/+*マウスをレシピエントとした[*aly/aly*→*aly/+*]キメラマウスには、通常の割合の胸腺内NK-T細胞が認められたのに対して、*aly/aly* をレシピエントとした[*aly/+*→*aly/aly*]、キメラマウスの胸腺内NK-T細胞は、前者の1/10程度であることが判明した。

次に胸腺内微小環境の役割を直接確認するために、胸腺摘出(ATx)した *aly/aly* マウスに致死量の放射線を照射し、*aly/aly* 骨髄細胞で再建した[*aly/aly*→ATx. *aly/aly*]キメラマウスを作製した。このキメラの腎被膜下に、デオキシグアノシンで処理した正常マウスの胎児胸腺を移植した。10週後に移植胸腺内には、正常胸腺と同程度の割合の *aly/aly* 骨髄由来NK-T細胞が認められた。従ってNK-T細胞の分化には、正常胸腺が必須であることが判明した。

aly/aly マウスの胸腺は髄質領域が極めて狭小であり、皮髄境界が不明瞭であった。胸腺皮質上皮細胞、髄質上皮細胞に特異的な抗体であるER-TR4、ER-TR5でそれぞれ免疫染色をしてみると、*aly/+*マウスと比べて *aly/aly* マウス胸腺では髄質領域のER-TR5による染色が微弱であった。また[*aly/aly*→*aly/+*]キメラマウスでは *aly/+*マウスと同様に正常な胸腺構築を示したが、[*aly/+*→*aly/aly*]キメラマウスでは *aly/aly* マウスの胸腺と同様の組織像を呈した。これらの組織像から *aly/aly* マウス胸腺の構築異常は、胸腺髄質上皮細胞そのものの異常に起因することが判明した。

次に、*aly/aly* マウスに抗CD3抗体(2C11)を静注し、どのような反応性を示すかをB6、*aly/+*マウスと比較した。その結果、2C11投与によって *aly/+*マウス脾内NK-T細胞はB6

マウスと同程度の IL-4 を産生したが、*aly/aly* マウスではほとんど IL-4 産生が認められなかった。また、*aly/aly* をレシピエントとした [*aly/+*→*aly/aly*] キメラマウスでも、IL-4 の産生がほとんど認められず、*aly/+* をレシピエントとした [*aly/aly*→*aly/+*] キメラマウスの 1/3 ～1/7 程度であった。これらの結果から、IL-4 産生能低下は *aly/aly* マウスの脾内 NK-T 細胞数の減少のみならず、機能的分化異常によることが判明した。

本研究は、NK-T 細胞の分化には骨髓由来細胞だけではなく、正常な胸腺上皮細胞も必要であることを初めて示した。現在、NK-T 細胞異常と自己免疫疾患の関連が世界的に注目を集めているが、今回の発見はこれらの疾患の病因を追求していく上で重要と考えられる。

公開発表にあたって、副査の上出利光教授から、NK-T 細胞の分化に対する CD1 分子の役割についての文献的考察、NK-T 細胞の前駆細胞のホーミング異常の有無、抗 CD3 抗体投与による IL-4 産生のマウス系統差について、小池隆夫教授から、胸腺と脾臓 NK-T 細胞の違い、脾臓 NK-T 細胞の機能と V α 14 発現について、キメラにおける抗 CD3 抗体に対する反応性、*aly/aly* マウスにおけるシェーグレン等の自己免疫発症について、主査の小野江より NK-T 細胞の機能とフェノタイプの相関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、世界で初めて NK-T 細胞の産生と胸腺構築の関係を明らかにした研究成果を高く評価し、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断した。