

学位論文題名

胸腺内ペプチド抗原投与による胸腺細胞選択機構の研究

学位論文内容の要旨

I 目的

Tリンパ球の分化・成熟は、胸腺内での正、負の選択を介して誘導される。これら両選択は、T細胞抗原受容体(TCR)と自己の主要組織適合抗原複合体分子(MHC)および自己ペプチド分子との間の相互作用によると考えられている。これまでのところ正の選択においては、未熟胸腺細胞がTCRを介して、胸腺内に発現される自己MHCとペプチド複合体分子によって適当な刺激を受け、その結果自己MHC拘束性を獲得したTリンパ球が増殖すると考えられている。一方、負の選択においては、自己MHCと自己ペプチド複合体に強く反応するTCRを発現するT細胞が排除される。これらT細胞クローンの選択は、TCRを介した刺激を受ける点においては共通であるが、刺激の質または量によって、全く正反対の運命をたどることになるという、非常に興味深いテーマの一つである。しかし、未熟胸腺細胞が分化のどのような時期に、どのようなペプチド+MHC複合体によって選択を受けるかについては不明な点が多い。本研究では、コンジェニックマウスあるいはシンジェニックマウス間で骨髓移植を行い、この骨髓キメラマウスの胸腺内にペプチドを直接注入することにより、胸腺細胞の分化過程と正負の選択に関与するペプチド分子の性状の分析を行った。

II 結果

まず、Thy1コンジェニックマウス間で骨髓キメラを作製し、未熟胸腺細胞の胸腺内分化を解析した。胸腺内におけるドナー骨髓由来細胞の表面抗原の発現を解析することにより、骨髓移植後12日目から16日目の間に、CD4⁺CD8⁺ダブル陽性(DP)の未熟型胸腺細胞がCD4⁺CD8⁻、あるいはCD4⁺CD8⁺シングル陽性(SP)の成熟型胸腺細胞に分化していくことが判明した。また骨髓移植後21日目以降ではレシピエント由来の胸腺細胞がすべてドナー由来の胸腺細胞に置換していた。

次に、種々のハトチトクロームc43-58(p43-58)アナログペプチドとマウスのMHCクラスII分子(I-A^b)との結合親和性を解析した。用いたペプチドはp43-58のエピトープ部位である50番目のアスパラギン酸(D)をグルタミン酸(E)に置換(50E)、あるいは、バリン(V)に置換したもの(50V)、さらに、50E、50Vのアグレートープ部位である54番目のアスパラギン(N)をアラニン(A)に置換(50E54A、50V54A)、あるいはアルギニン(R)に置換(50E54R、50V54R)したものである。その結果、50Eと50Vは全く異なるT細胞クローンを刺激すること、またI-A^bとの結合能は、それぞれ、50E54A>50E>50E54R、50V54A>50V>50V54Rであり、エピトープとは無関係にアグレートープ残基による結合親和性のヒエラルキーが決定されることが判明した。

以上の結果に基づき、シンジェニックマウス間の骨髓移植後の適当な時期に、これらのアナログペプチドを直接マウス胸腺内に投与(i.t.)し、このペプチド抗原と自己MHC分子複合体が、未熟胸腺細胞の分化と選

扱にどのような影響を与えるか解析した。骨髄移植後 21 日目以降に、上記ペプチドを i.t.したキメラマウスの p43-58 アナログペプチド刺激に対する T 細胞増殖反応は、正常マウスのそれと変わらなかった。一方、骨髄移植後 13 日目に I-A^b に対して結合性が高い 50E54A を i.t.した場合、50E54A 特異的 T 細胞の反応性のみが低下しており反応性のヒエラルキーは 50E>50E54A となった。しかし、50V アナログペプチドに対する反応性には影響はなかった。同様に骨髄移植後 13 日目に I-A^b に対して結合性が低い 50E54R を i.t.した場合の T 細胞増殖反応については、いずれの p43-58 アナログペプチドに対しても明らかな変化は見られなかった。

III 考 察

骨髄移植後 28 日目以降では、胸腺はほぼ完全にドナー由来の細胞に置換されており、これらの CD4, CD8 発現パターンは正常成熟マウスのものと変わらなかった。また骨髄移植後の比較的早い時期の胸腺については、骨髄移植後 8 日目からわずかながらドナー由来 DP 細胞が出現し始め、再建後 16 日目には、明確な CD4SP 細胞、あるいは CD8SP 細胞ポピュレーションが出現した。これらの結果は、Thy1 コンジェニックマウス間で作製した骨髄キメラにおいては、完全異系キメラのものよりも早期に胸腺細胞の成熟化が進むことを示している。従って、骨髄移植後にドナー由来細胞が正または負の選択の最初のシグナルを受けるのは、12 日目から遅くとも 15 日目であると推察された。骨髄再建後 13 日目前後に抗原性ペプチドを投与した場合が、最も効果的に負の選択を誘導したという今回の結果は、この時期が厳密に重要であることを示唆する。

次に、p43-58 アナログペプチドと I-A^b 分子拘束性の T 細胞増殖反応についての解析結果より、50V と 50E アナログペプチド間には互いに交叉反応性がなく、50E 関連ペプチドと 50V 関連ペプチドは、末梢では異なる T 細胞レパートリーを活性化することが確認された。また、50E, 50E54A, 50E54R の 3 種の 50E 関連ペプチドに対する I-A^b 分子拘束性の T 細胞増殖反応では、エピトープ部分が同一なために互いに交叉反応性を示したが、反応性にはヒエラルキーが認められ (50E54A>50E>50E54R) 、これは I-A^b 分子とペプチド分子との親和性のヒエラルキーを反映していると考えられた。これら p43-58 アナログペプチドは、マウス胸腺内に発現されている I-A^b 分子にも、同様のヒエラルキーで結合すると考えられた。実際 I-A^b との結合性の高い 50E54A を骨髄移植後 13 日目に投与することにより、50E54A に対する反応性が特異的に低下することが観察された。50E54A の i.t.は 50V アナログに対する反応性には影響を与えなかった。従って、負の選択に関しては、エピトープ部位の 1 アミノ酸残基の置換によってクローンの選択が影響されることから、1 ペプチド:1 TCR クローンの関係が機能していると考えられた。また今回 13 日目の 50E54R の i.t.が、50E54A に対する反応性には全く影響を与えないことが判明した。このことは、負の選択に関与するペプチドは I-A^b と一定の親和性を持つことが必要であることを示唆する。最後に 13 日目に 50E54Ai.t.により、50E54A に対する反応性の低下と同時に、50E54A と 50E に対する反応性の逆転 (50E>50E54A) が認められた。これは 50E アナログペプチドの 54 番残基に特異的な T 細胞クローンが存在することを示す。従って、p43-58 アナログペプチドの 54 番残基が、アグレトープ以外にエピトープとしても機能する可能性が示唆された。この点は、現在クローンレベルで解析中である。

IV 結 語

1. Thy1 コンジェニックマウス間で作製した骨髄移植キメラ胸腺では、異系キメラと比べて骨髄移植後早期 (21 日目) にはほぼドナー細胞に置換した。
2. 移植後 12~16 日目に既にドナー由来の SP 胸腺細胞が出現した。

3. 骨髄移植後 13 日目に, I-A^bに親和性の低い 50E54R を i.t.した場合は T細胞の反応性に影響を与えなかった。しかし, 親和性の高い 50E54A を i.t.した場合には, 50E54A 特異的 T細胞の反応性の低下が認められ, これは負の選択によると考えられた。また 50E54A の i.t.は 50E 特異的 T細胞には影響しないことから, 54 番残基はアグレトープ以外に, エピトープとしても働くと考えられた。
4. 骨髄移植後 21 日目以後にペプチド抗原を i.t.した場合には, T細胞の反応性に有意の影響が見られなかった。従って, ペプチド抗原 i.t.による負の選択は DP から SP 細胞分化が始まる時期に限定されると考えられた。

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 教 授 細 川 眞澄男

学位論文題名

胸腺内ペプチド抗原投与による胸腺細胞選択機構の研究

Tリンパ球の分化・成熟は、胸腺内での正、負の選択を介して誘導される。これら両選択は、T細胞抗原受容体(TCR)と自己の主要組織適合抗原複合体分子(MHC)および自己ペプチド分子との間の相互作用によると考えられている。しかし、未熟胸腺細胞が分化のどのような時期に、どのようなペプチド+MHC複合体によって選択を受けるかについては不明な点が多い。本研究では、コンジェニックマウスあるいはシンジェニックマウス間で骨髄移植を行い、骨髄キメラマウスの胸腺内にペプチドを直接注入することにより、胸腺細胞の分化過程と正負の選択に関与するペプチド分子の性状の分析を行った。

まず、Thy1コンジェニックマウス間で骨髄キメラを作製し、未熟胸腺細胞の胸腺内分化を解析した。骨髄移植後12日目から16日目と比較的早期に、CD4⁺CD8⁺ダブル陽性の未熟型胸腺細胞がCD4⁺CD8⁻、あるいはCD4⁻CD8⁺シングル陽性の成熟型胸腺細胞に分化していくことが判明した。次に、種々のハトチトクローム c43-58 (p43-58) アナログペプチド、50E、50E54A、50E54R、50V、50V54A、50V54RとマウスのMHCクラスII分子(I-A^b)との親和性を解析した。その結果、50Eと50Vは全く異なるT細胞クローンを刺激すること、またI-A^bとの結合能は、それぞれ、50E54A>50E>50E54R、50V54A>50V>50V54Rであり、エピトープとは無関係にアグレトープ残基による結合親和性のヒエラルキーが決定されることが判明した。

以上の結果に基づき、シンジェニックマウス間の骨髄移植後の適当な時期に、これらのアナログペプチドを直接マウス胸腺内に投与(i.t.)し、未熟胸腺細胞の分化と選択にどのような影響を与えるか解析した。その結果、骨髄移植後13日目にI-A^bに対して結合性が高い50E54Aをi.t.した場合のみ、50E54A特異的T細胞の反応性が低下しており、50Eアナログに対する反応性のヒエラルキーは50E>50E54Aとなった。しかし、50Vアナログに対する反応性には影響は見られなかった。同様に骨髄移植後13日目にI-A^bに対して結合性が低い50E54Rをi.t.した場合のT細胞増殖反応については、いずれのp43-58アナログペプチドに対しても明らかな変化は見られなかった。

今回、I-A^bとの結合性の高い50E54Aを骨髄移植後13日目に投与することにより、50E54Aに対する反応性が特異的に低下し、50Eに対する反応性には影響を与えないことが判明した。従って、p43-58アナログペプチドの54番残基が、アグレトープ以外にエピトープとしても機能することが示唆された。また負の選択に関しては、エピトープ部位の1アミノ酸残基の置換によってクローンの選択が影響されることから、1ペプチド:1TCRクローンの関係が機能していると考えられた。

公開発表にあたって、副査の細川眞澄男教授より、自己抗原ではなくp43-58を用いたことの問題点、ペプチドのアフィニティーの差がどのような影響を与えるのか、柿沼光明教授から、アフィニティーとT細胞活性化の関係、TCRの識別するペプチドの大きさ、ペプ

チド it と iv 差, 反応 T 細胞の亜群について, 主査の小野江和則より syngeneic preference のメカニズム, MHC クラス II 結合性ペプチド投与による CD8⁺T 細胞の活性化等について質問があった。申請者は大概妥当な回答をした。

審査員一同は, TCR トランスジェニックを用いなければ実験的にはなかなか困難な胸腺細胞の負の選択について, 正常マウス間の骨髄移植キメラを題材とすることにより, ペプチドによるクローン消去を証明した成果を高く評価し, 申請者が博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと判定した。