

学 位 論 文 題 名

同系混合リンパ球反応（SMLR）性T細胞
サブセットの解析

学位論文内容の要旨

T細胞は胸腺内で正、及び負の選択を受け、末梢リンパ組織に到達する段階で自己抗原に反応しないようにコントロールされている。しかし、ヒトやマウスにおいて、末梢成熟T細胞をin vitroで自己、又は同系の非T細胞と培養すると、増殖反応を起こすことが知られており、自己又は同系混合リンパ球反応（AMLRまたはSMLR）と呼ばれる。

SMLRは健常人、および正常マウスにおいて認められるが、生体内における生理的意義は未だ不明である。但し、一部の自己免疫疾患患者や、自己免疫自然発症マウス系統において、SMLRが減弱しているとの報告があり、免疫系の制御に何らかの役割を果たしていることが示唆されている。

最近、刺激細胞である非T細胞のうち樹状細胞（DC）が、T細胞刺激活性の高いユニークな能力を持つことが判明した。本研究では、末梢T細胞と同系DCによるSMLRを行い、SMLRに関与するT細胞亜群を解析した。

最初にナイロンウール精製脾T細胞を反応細胞、脾臓DCを刺激細胞としてSMLRを行い、また同時にCD4(+)T細胞と、CD8(+)T細胞サブセットの反応性を調べた。SMLR4日後に、未分画T細胞は、有意な増殖反応を示したが、CD4(-)T細胞分画を反応細胞とすると明らかに増殖反応は低下した。一方、CD8(-)T細胞分画は、未分画T細胞の場合と同等、或いはそれ以上の増殖反応を示した。

SMLRの増殖反応は、抗MHCクラス II単クローン抗体（mAb）により約40%に抑制された。一方、抗CD1 mAbはSMLRに対して影響を示さなかった。

次にSMLR4日目の時点での活性化マーカーおよび細胞分裂の状態を解析すると、CD4(+)T細胞に比べ、CD8(+)T細胞中に、活性化マーカーを発現し、分裂している細胞の割合が高かった。しかし、2日目ではCD4(+)T細胞中に活性化細胞が多かった。

ヒトAMLRにおいて、CD4(+)CD62L(+)T細胞が顕著に反応するとの報告があり、マウスSMLRにおいてこの点を検討した。CD62L(+)T細胞は単独で増殖可能で、未分画T細胞よりも高い反応性を示したが、CD62L(-)T細胞では増殖反応が有意に低下していた。しかし、固相化抗 α/β T細胞受容体（TCR） mAb刺激の場合は、CD62L(-)T細胞の増殖反応が、他分画に比べ常に高かった。SMLR4日目で見ると、CD62L(+)T細胞サブセットで分裂している細胞の大部分が、CD8(+)T細胞であった。

近年NK-T細胞が自己免疫制御に関与していることが示唆されている。SMLRにおいて、NK1.1(+)細胞を除くと、未分画のものに比べて高反応性を示した。しかし、NK1.1(+)細胞

をNK1.1(-)脾T細胞に加えてSMLRを行ったところ、直接の抑制効果は確認できなかった。この結果は、NK-T細胞の拘束分子に対する抗CD1 mAbが、SMLRに何ら影響を与えなかった結果と一致する。

最後にDO11.10 トランスジェニックマウス (tg) (BALB/cバックグラウンド) を用いてSMLRを行った。このマウスのT細胞は全て、I-A^d拘束性、OVAペプチド特異的TCRを発現する。BALB/cマウスではC57BL/6と同じくT細胞の増殖反応 (SMLR) が見られたが、DO11.10 tg T細胞においては増殖が全く見られなかった。

SMLRの生理的意義については不明だが、MHC不適合骨髄キメラより得たT細胞は、骨髄ドナーMHCに対するSMLRを欠く。又このキメラT細胞は、ホストMHCに対してMHC拘束特異性を獲得し、SMLR様の反応性を示すことが報告されている。従って、SMLRは胸腺上皮に発現しているMHC分子による正の選択を遺残的に示す反応系とも考えられる。

本研究では、未知の自己抗原に対する反応と考えられるSMLRに関与するT細胞亜群について検討した。そしてCD4(+)T細胞は単独で増殖出来るが、CD8(+)T細胞はCD4(+)T細胞非存在下では増殖が弱いことが判明した。

しかし、活性化マーカー及び細胞分裂状態の解析により、SMLR4日目の時点では、むしろCD8(+)T細胞が活性化し、分裂していることが判明した。これまでSMLRにおいて主として増殖するのは、CD4(+)T細胞であり、長期間の培養が必要と報告されている。現在のところ、今回の結果とこれらの報告との違いの理由は不明だが、刺激細胞としてDCを用いたことが影響しているかもしれない。CD8(+)T細胞の増殖がCD4(+)T細胞に依存することを考えると、SMLR3日目以前に反応増殖するCD4(+)T細胞によるヘルプ、恐らくサイトカイン、の存在下で、3-4日目にCD8(+)T細胞が増殖すると考えられた。

次にSMLRにおけるCD62L(+)T細胞と、CD62L(-)T細胞の反応性の解析より、SMLR早期において単独で増殖可能なのは、CD4(+)CD62L(+)T細胞サブセットであり、SMLR後期で分裂・増殖している細胞はCD8(+)CD62L(+)T細胞サブセットであることが示唆された。アロMLRでは、CD4(+)CD62L(-)T細胞が反応することから、SMLRが他の反応系と全く異なる免疫応答であることを示すものと考えられた。

最後にDO11.10 tg T細胞はSMLRで全く反応しなかった。このtg T細胞はH-2^dマウスの胸腺内で正の選択を受ける。従って、上で述べたように、SMLRがT細胞の正の選択を反映するならば、BALB/c (H-2^d) DCに対してtg T細胞も反応すると考えられたが、逆の結果が得られた。DO11.10 tg T細胞の正の選択には特定のリガンドが必要であり、DCはこのリガンドを提示できなかったか、あるいは、胸腺内の正の選択で働くリガンドとは異なるペプチドが、末梢T細胞の増殖には必要という可能性も考えられる。さらにDO11.10 tgではCD8(+)T細胞の正の選択が誘導されない。今回示したように、CD4(+)T細胞に続くCD8(+)T細胞の反応が、SMLRには重要なものかもしれない。

今回、アロMLRと異なり、SMLRを誘導するT細胞の中でCD8(+)CD62L(+)T細胞が重要な役割を果たすという結果を得た。これは、SMLRの生理的意義を考える上で貴重な手がかりとなると考える。

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 西 村 孝 司

学 位 論 文 題 名

同系混合リンパ球反応 (SMLR) 性 T 細胞 サブセットの解析

T細胞は胸腺内で正、及び負の選択を受け、末梢リンパ組織に到達する段階においては自己抗原に反応しないようにコントロールされている。しかし、ヒトやマウスにおいて、末梢成熟T細胞をin vitroで自己、又は同系の非T細胞と培養すると、増殖反応を起こすことが知られており、自己又は同系混合リンパ球反応 (AMLR, またはSMLR) と呼ばれる。

最近、刺激細胞である非T細胞のうち樹状細胞 (DC) が、T細胞刺激活性の高いユニークな能力を持つことが判明した。本研究では、末梢T細胞と同系DCによる改良型SMLRを開発し、SMLRに関与するT細胞亜群を解析した。

脾臓より得た未分画T細胞は、同系DCに対して有意な増殖反応を示したが、CD4陽性T細胞除去分画を反応細胞とすると、明らかに増殖反応は低下した。一方、CD8陽性T細胞除去分画は、未分画T細胞の場合と同等、或いはそれ以上の増殖反応を示した。また、SMLRの増殖反応は、抗MHCクラス II 単クローン抗体 (mAb) を加えることで有意に抑制された。これより、SMLRにおいて、CD4陽性T細胞は単独で増殖可能であるが、CD8陽性T細胞は、CD4T細胞依存性であることが示唆された。また、CD4陽性T細胞は、MHCクラス II 分子を認識していると考えられた。次にSMLR4日目の時点での活性化マーカー、および細胞分裂の状態を解析すると、CD4陽性T細胞に比べ、CD8陽性T細胞中に、活性化マーカーを発現し、分裂している細胞の割合が高かった。

近年NK-T細胞が自己免疫制御に関与していることが示唆されている。SMLRにおいて、NK1.1陽性細胞を除くと、未分画のものに比べて高反応性を示した。しかし、NK1.1陽性細胞をNK1.1陰性T細胞に加えてSMLRを行ったところ、直接の抑制効果は確認できなかった。

ヒトAMLRにおいて、CD4陽性CD62L陽性T細胞が顕著に反応するとの報告があり、マウスSMLRにおいてこれを検証した。CD62L陽性分画は未分画T細胞よりも高い反応性を示したが、CD62L陰性分画は増殖反応が有意に低下していた。しかし、固相化抗 α/β T細胞受容体 (TCR) mAb刺激の場合は、CD62L陰性分画の増殖反応が、他分画に比べ常に高かった。そこで再び細胞分裂の状態を解析すると、CD4陽性T細胞に関しては、それほど差

が無いが、CD8陽性T細胞ではCD62L陽性分画に比べ、CD62L陰性分画の分裂が弱く、SMLRにおいてCD62L陰性T細胞の増殖が弱いのは、主としてSMLR後期におけるCD8陽性CD62L陰性T細胞の増殖が弱いことに依ることが判明した。

最後にDO11.10 トランスジェニックマウス (tg) (BALB/cバックグラウンド) を用いてSMLRを行った。このマウスのT細胞は全て、I-A^d拘束性、OVAペプチド特異的TCRを発現する。BALB/cおよびDO11.10のT細胞をBALB/cのDCと培養すると、BALB/cマウスではC57BL/6と同じく増殖反応 (SMLR) が見られたが、DO11.10 tg T細胞においては、I-A^d分子に対して増殖が全く見られなかった。

口頭発表に際し、副査の上出教授から、自己免疫疾患における免疫反応の異常を検出する手段としてAMLRを行う場合、CD4陽性、CD8陽性T細胞のどちらが重要かとの質問があり、また、副査の西村教授からは、ここでのSMLRは、培養液中に存在するウシ胎児血清中の蛋白が関与しているのではないのか、今回の結果では、CD8陽性T細胞の増殖が目立つが、過去の報告との関連をどう考えるかとの質問があった。主査の小野江からは、今回の結果とは逆に、アロMLRの場合は、CD62L陰性分画の増殖が強いのをどう考えるかとの質問があった。これらの質問に対して、申請者は、自分の実験結果、過去の報告などを引用し、おおむね適切に回答した。

本研究は、SMLRに関与するT細胞亜群を解析し、時期により反応細胞が異なること、またCD8陽性CD62L陽性T細胞が、後期の反応には重要な役割を果たすことを初めて明らかにした。これらの結果はSMLRの生理的意義を明らかにする上で、貴重な手がかりとなると考えられる。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や単位取得なども併せ申請者が博士 (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。