

学 位 論 文 題 名

Unusual Patterns of Lysis of Fas Ligand Defective
T Cell Clones Derived From *gld/gld* Mice Suggest
a Role of Thy-1 in Triggering Some Forms
of Cytotoxicity

(*gld/gld* マウス由来 Fas Ligand 欠陥 T細胞クローンの示す
特異な細胞傷害活性によって示唆される Thy-1 抗原の役割)

学位論文内容の要旨

はじめに

現在のところT細胞による主な細胞傷害のメカニズムは、Fas、またはperforinによると考えられている。正常なFas Ligand (FasL) を持たない*gld* マウスと、Fasを欠損している*lpr* マウスでは、両者とも同じように、末梢リンパ組織に多数のThy-1⁻及びThy-1⁺TCR⁺CD8⁻CD4⁻ (DN) T細胞の集積による、重篤なlymphadenopathyの発症が認められる。また、両マウスではFasを介した細胞傷害が起こらない。

これまでC3H*gld/gld*マウスのリンパ節由来のDN T細胞よりいくつかのT細胞クローンを作成したが、これらのクローンはすべて細胞傷害性T細胞(CTL)であった。今回、これらのCTLクローンのうち、H-2^b反応性クローン・2C4 (Thy-1⁻)と、2F4 (Thy-1⁺)について解析した。これらは同一の抗原レセプター(TCR)の発現、アロ標的に対する同等の細胞傷害活性、pan-NK cell markerであるDX5の発現などの特徴を示した。さらに、これらのCTLクローンの細胞傷害の機序を調べるため、H-2^b (*lpr/lpr* と +/+) の標的細胞に対する細胞傷害性を解析した。これら2クローンは、Thy-1抗原の発現以外は同一の性状を示すにもかかわらず、細胞傷害活性には大きな差が認められたことから、Thy-1分子の重要性が示唆された。

材料と方法

マウス: C57BL/6 (B6 or B6 +/+), C3H/HeJ (C3H), B6.MRL-Fas^{*lpr*} (B6 *lpr/lpr*), C3H/HeJ-FasL^{*gld*} (C3H *gld/gld*) を用いた。

抗体及びフローサイトメトリー: Effector細胞は刺激後4-7日後に各種抗体で染色した。

細胞と細胞培養: C3H/HeJ-FasL^{*gld*}のリンパ節からナイロンウール非付着細胞を分離し、抗CD8, CD4, Ia 単クローン抗体(mAb)および補体で処理後、放射線照射したB6脾

細胞で刺激し、CTL lineを樹立した。その後、2回限界希釈にていくつかのクローンを選択し、実験には2C4 (Thy-1⁻) と2F4 (Thy-1⁺) を用いた。これらクローンはCon A上清、及び放射線照射したB6脾細胞による刺激下で維持した。

Con A プラストの作製：赤血球を除去した脾細胞を2μg/ml Con Aにて2日間培養後、0.1M methyl α-D-mannopyranosideで洗浄し、実験に用いた。

細胞傷害性試験：chromium-release assay、及びPKH2-GLによるtarget cellのラベル後に、フローサイトメトリーにてpropidium iodideで染色された細胞を検出する方法、両者を用いた。

TCR cloning：以下のプライマーを用い、5' RACE法にて行った。

3' primers (reverse transcription): TCR C_α 由来(CTGGTACACAGCAGGTTCTG)
TCR C_{β2} 由来(ACGTGGTCAGGGAAGAAGC)

1st PCR: 3' primer: TCR α chain用 (AGGTTCTGGGTTCTGGATGT)
TCR β chain用 (AGGAGACCTTGGGTGGAGTC)

5' primer: 5' RACE Anchor Primer

2nd PCR: 3' primer: TCR α chain用 (AGGTTCTGGGTTCTGGATGT)
TCR β chain用 (CTTGGGTGGAGTCACATTTC)
5' primer: adaptor primer (GGCCACGCGTCGACTAGTAC)

結果

- 1) 2C4(Thy-1⁻)、2F4(Thy-1⁺)のTCRを解析した結果、α、β両鎖とも一致し、これらが同一クローン株であることが判明した。
- 2) 2C4, 2F4ともにEL4 (H-2^b) に対する細胞傷害活性は高いが、NK細胞感受性標的細胞株であるYAC-1 (H-2^a) に対しては、2C4では低い活性を示し、2F4では中等度の細胞傷害活性が見られた。
- 3) 2C4はB6 target、*lpr* targetいずれに対しても同等の細胞傷害性を示した。しかし、2F4では、*lpr* targetに対する細胞傷害性が、B6 targetに対するものより低かった。
- 4) perforin inhibitorであるconcanamycin A (CMA) により、2C4のB6に対する細胞傷害性は大幅に抑えられたが、2F4においては残存した。
- 5) 2F4のB6 targetに対する細胞傷害性は、抗 Thy-1 mAb添加によって低下したが、*lpr* targetに対する傷害性には変化がなかった。
- 6) Thy-1以外の分子の関与を解析するため、FasおよびCTLA-4のようなnegative signalをT細胞に与える可能性のある分子の検索を行ったが、2C4, 2F4上には検出されなかった。また、target上にFasLは発現されていなかった。

以上のように、Thy-1⁻、Thy-1⁺両クローンは同一のクローンから派生した細胞と考えられ、さらに同レベルのperforinを発現しているにもかかわらず、細胞傷害性に差が認められた。この結果は、Thy-1⁺CD8⁺CD4⁻CTLクローンが、Fas及びperforin非

依存性の細胞傷害のメカニズムを利用し、このメカニズムはThy-1⁺CD8⁺CD4⁺CTLでは機能しない可能性を示唆する。従って、Thy-1分子が、CTLの細胞傷害性においてなんらかの関与をしていることが考えられる。これらのクローンはT細胞の細胞傷害活性におけるThy-1分子の機能を解明する上で、有効な実験戦略として活用されることが期待される。今後、2C4にThy-1分子を発現させ、2F4の細胞傷害性との比較を行うことが必要であろう。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小野江 和 則

副 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 西 村 孝 司

学 位 論 文 題 名

Unusual Patterns of Lysis of Fas Ligand Defective T Cell Clones Derived From *gld/gld* Mice Suggest a Role of Thy-1 in Triggering Some Forms of Cytotoxicity

(*gld/gld* マウス由来 Fas Ligand 欠陥 T細胞クローンの示す
特異な細胞傷害活性によって示唆される Thy-1 抗原の役割)

本論文では、自己免疫疾患モデル動物である *gld* マウス由来細胞傷害性 T 細胞 (CTL) クロームを用い、種々の条件下で細胞傷害活性を解析した。Thy-1 分子は古くから T リンパ球の表面マーカー分子として広く知られているが、その役割は今なお不明である。又、現在のところ T 細胞による細胞傷害の主なメカニズムは、Fas、または perforin によると考えられている。Fas Ligand (FasL) に点突然変異を示す *gld* マウスと、Fas 発現欠損の *lpr* マウスでは、末梢リンパ組織に多数の Thy-1⁺、または Thy-1⁺ 抗原レセプター (TCR) + CD8⁺ CD4⁺ (DN) T 細胞の集積による、重篤な lymphadenopathy の発症が認められる。また、両マウスでは Fas を介した細胞傷害が起こらない。今回、C3H *gld/gld* マウスのリンパ節由来の DNT 細胞より作製した CTL クロームのうち、H-2^b 反応性クロームの 2C4 (Thy-1⁻) と、2F4 (Thy-1⁺) の細胞傷害性の詳細について解析した。これらは同一の TCR、pan-NK cell marker である DX5 の発現などの特徴を示した。さらに、これらの CTL クロームの細胞傷害の機序を調べるため、H-2^b (*lpr/lpr* と *+/+*) マウスの標的細胞、腫瘍細胞に対する細胞傷害性を解析した。2C4、2F4 とともに EL4 (H-2^b) に対する細胞傷害活性は高く、同レベルであったが、NK 細胞感受性標的細胞株である YAC-1 (H-2^a) に対しては、2C4 では低活性を示し、2F4 では中等度活性が見られた。又、2C4 は B6 標的細胞、*lpr* 標的細胞いずれに対しても同等の細胞傷害性を示した。しかし、2F4 では、*lpr* 標的細胞に対する細胞

傷害性が、B6標的細胞に対するものより低かった。perforin inhibitorであるconcanamycin A (CMA)は、2C4のB6標的細胞に対する細胞傷害性を有意に抑制したが、2F4に対する活性抑制は部分的であった。さらに2F4のB6標的細胞に対する細胞傷害性は、抗 Thy-1 単クローン抗体(mAb)添加によって低下したが、*lpr*標的細胞に対する傷害性には変化がなかった。Thy-1以外の分子の関与を解析するため、FasおよびCTLA-4のようなnegative signalをT細胞に与える可能性のある分子の検索を行ったが、2C4, 2F4上には検出されなかった。また、標的細胞上にFasLは発現されていなかった。5'RACE法により2C4 (Thy-1⁻)、2F4 (Thy-1⁺) のTCRを解析した結果、 α 、 β 両鎖とも一致し、これらが同一クローン株であることが判明した。以上、Thy-1⁻ 2C4、Thy-1⁺ 2F4両クローンは同一のクローンから派生した細胞と考えられ、同レベルのperforinを発現しているにもかかわらず、細胞傷害性に差が認められた。この結果は、Thy-1⁺CD8⁺CD4⁺CTLクローンが、Fas及びperforin非依存性の細胞傷害のメカニズムを利用し、このメカニズムはThy-1⁻CD8⁺CD4⁺CTLでは機能しない可能性を示唆する。従って、Thy-1分子が、CTLの細胞傷害性においてなんらかの関与をしていることが考えられる。今後、2C4にThy-1分子を発現させ、2F4の細胞傷害性との比較を行うことが必要と考えられた。

公開発表において、副査の吉木教授より、Thy-1 transfectantの実験を加える必要性、Thy-1の機能、Thy-1ノックアウトマウスについての最近の知見について、西村教授より細胞傷害試験で腫瘍細胞に対する細胞傷害性とCon A blastに対するものの差について、Thy-1陰性クローンがFas陽性、陰性の標的細胞を区別して破壊する機序、この系でのFasによる細胞傷害メカニズムの関与について質問があった。主査の小野江より、Thy-1刺激による細胞内シグナル解析の指摘、2F4の、NK細胞標的細胞株に対する細胞傷害性と、NK細胞関連分子発現との関連についての質問があった。申請者は、これらの質問に対し、過去の文献的考察も含め、おおむね適切な回答を行った。

この論文は、Thy-1分子のT細胞の細胞傷害における重要性を示唆した点で高く評価され、今後T細胞の細胞傷害活性におけるThy-1分子の機能を解明する上で、有効な実験戦略として活用されることが期待される。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取得単位なども併わせ申請者が博士（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。