

学 位 論 文 題 名

aly/aly マウス由来 NK-T 細胞の分化と
胸腺上皮細胞の役割

学位論文内容の要旨

はじめに

マウスNK-T細胞は、 $CD4^{+}CD8^{-}$ と $CD4^{-}CD8^{-}$ のポピュレーションから構成され、通常のT細胞と比べて、T細胞レセプター (TCR) の発現量が低いことが知られている。また、刺激に対して早期に大量のIL-4とIFN- γ を産生することが報告されており、免疫反応の型を決定する役割を果たすことが示唆されている。さらに胸腺内NK-T細胞は、通常のT細胞と異なり、胸腺上皮ではなく、骨髄由来細胞上に発現するCD1分子によって positive selection されることが報告されている。

最近、リンパ節とパイエル板を欠損する *aly/aly* マウスが、C57BL/6(B6) マウスコロニー中に発見された。このマウスは胸腺と脾臓の構築異常を示し、各種免疫不全を呈する。またこれまで *aly/aly* マウスでは、NK-T細胞数、及びその機能が有意に低下しており、その原因が、*aly/aly* マウスの胸腺構築異常に起因することが北大免疫研で示されている。

本研究では、*aly/aly* マウスの胸腺内NK-T細胞の分化において、CD1分子が胸腺内のどのような細胞によって提示されるかを解析するために、*aly/aly* マウスをドナー、CD1分子を欠き同じくNK-T細胞を欠損する $\beta 2m^{-/-}$ 、あるいはCD1d1 $^{-/-}$ マウスをレシピエントとした骨髄キメラを作製し、胸腺内NK-T細胞の分化について分析した。さらに、NK-T細胞の分化に対する胸腺上皮細胞の直接的関与を調べる目的で、B6由来胸腺上皮細胞株を *aly/aly* マウスに胸腺内投与し、胸腺におけるNK-T細胞の産生を検討した。

方法と結果

1. 抗CD3抗体刺激に対するB6、*aly/+*、*aly/aly* マウスのNK-T細胞のサイトカイン産生能を解析した結果、*aly/aly* マウスでは他のマウスに比べて、IL-4、IFN- γ の産生が低下していた。このことから、*aly/aly* マウスのNK-T細胞の機能不全が証明された。
2. *aly/aly* マウスをドナー、 $\beta 2m^{-/-}$ をレシピエントとする骨髄キメラマウス（以下 [*aly/aly* $\rightarrow$ $\beta 2m^{-/-}$] とする）の胸腺、脾臓では、コントロールキメラマウス（[B6 $\rightarrow$ $\beta 2m^{-/-}$]、あるいは [*aly/+* $\rightarrow$ $\beta 2m^{-/-}$]）と同じレベルのNK-T細胞産生が認められた。また、[*aly/aly* $\rightarrow$ CD1d1 $^{-/-}$] キメラでも、正常レベルのNK-T細胞出現が認められた。
3. [*aly/aly* $\rightarrow$ $\beta 2m^{-/-}$] マウスで産生された胸腺NK-T細胞の表面マーカーをFACSscanで解析した結果、正常B6マウスのNK-T細胞と同様の表現形を示した。また、抗CD3抗体

による刺激に対して、[*aly/aly*→ $\beta 2m^{-/-}$]マウスの胸腺NK-T細胞は、正常レベルか、それ以上のIL-4、IFN- γ の産生能を示し、これらが機能的にも正常に分化したことが判明した。これらのことから、*aly/aly*マウスのNK-T細胞の分化には、胸腺環境側にCD1分子が発現される必要はないことが示された。

4. *aly/aly*マウス胸腺左葉に、B6由来の胸腺髄質上皮細胞(1C6)、胸腺皮質上皮細胞(4C18)、または*aly/aly*マウス由来胸腺上皮細胞、線維芽細胞株、メディウム単独を投与し、NK-T細胞の分化を解析した。右葉は無処置とした。まず、投与した胸腺上皮細胞株の定着を調べるために、1C6と4C18を5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) でラベルし、胸腺内投与4週後に、蛍光顕微鏡にて観察した。その結果1C6は主に胸腺髄質に、4C18は胸腺皮質に認められ、それぞれの由来する解剖学的位置に定着することが確認された。次に、各細胞株の胸腺内投与4週後に、胸腺を採取し、胸腺内投与した左葉と無処置右葉におけるNK-T細胞の割合を算出し、比較検討した。その結果、胸腺髄質上皮細胞である1C6投与によって、NK-T細胞の有意な増加が認められたが、4C18、*aly/aly*細胞株、またはメディウム投与では、変化は認められなかった。

5. 胸腺上皮細胞の胸腺内投与によるNK-T細胞の分化・増殖が、*aly/aly*マウス前駆細胞と正常胸腺上皮細胞との直接的な細胞接触によるのか、あるいは胸腺上皮細胞の産生する液性因子によるのかを調べるために、胸腺内投与に用いた胸腺上皮細胞株がコンフルエントな状態に増殖したプラスチックのプレートをセットした。次にこのプレート内でゲルフォームスポンジ上にセルロース膜を置き、*aly/aly*マウスの新生仔胸腺器官培養を行った。培養5日後、NK-T細胞の割合は、メディウムのみで培養したものとは比べ変化がなかった。この結果、及び胸腺左葉に1C6を投与した*aly/aly*マウスにおいても、右葉ではNK-T細胞の増加が全く認められなかったことから、NK-T細胞の分化と増殖の誘導には、NK-T前駆細胞と正常胸腺上皮細胞間の直接接触が必要と考えられた。

考察

本研究において、NK-T細胞欠損系である*aly/aly*マウス、 $\beta 2m^{-/-}$ マウス、またはCD1d1 $^{-/-}$ マウス由来の細胞構成の組み合わせにより、NK-T細胞の分化にとって必須の因子が相補的に充足されたことが示唆された。

さらに、*aly/aly*マウス胸腺内に注入された胸腺髄質上皮細胞株が、NK-T細胞の有意な増加を誘導したのに対し、胸腺皮質上皮細胞株、*aly/aly*上皮細胞株は増加を示さなかった。胸腺皮質上皮細胞と胸腺髄質上皮細胞は、抗原提示能において違いがあることが報告されている。今回、髄質上皮と皮質上皮間で、NK-T細胞の分化に与える機能にも差があることが判明した。さらに今回の結果は、*aly/aly*マウスにおいて、特に胸腺髄質の発達不良が著しいこととも一致すると考えられる。しかし、1C6細胞を投与した左葉のNK-T細胞の割合は、正常レベルには回復しなかった。胸腺内投与した胸腺上皮細胞数が、ホストの髄質上皮と比べて少ないことから、胸腺上皮細胞株と*aly/aly*マウスのNK-T前駆細胞との接触が不十分であったという可能性、また、正常無処置マウス胸腺内でNK-T細胞が一定のポピュレーションになるのは生後10週前後なので、今回の観察期間が短かったためとも考えられる。いずれにせよ、胸腺上皮細胞がNK-T細胞の分化にとって重要な役割を果たしていることが、今回初めて判明した。

リンホトキシン β レセプター $^{-/-}$ (LT β R $^{-/-}$)マウスと、*aly/aly*マウスの表現形の類似性が示されてきたが、LT β R $^{-/-}$ マウスの胸腺構築は正常であることから、*aly/aly*マウス

ではLT β R以外のレセプターからのシグナル異常が予想された。最近、*aly/aly*マウスの異常がNF- κ b-inducing kinase (NIK) の点突然変異によることが報告された。しかし、このNIK変異が、どのような経路で*aly/aly*マウスの胸腺髄質異常につながるかについては不明である。今後、*aly/aly*マウスのNIK変異に伴う、胸腺髄質上皮細胞の細胞膜分子等の変化の解析が必要であろう。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 上 義 和

副 査 教 授 小野江 和 則

副 査 教 授 西 村 孝 司

学 位 論 文 題 名

aly/aly マウス由来 NK-T 細胞の分化と 胸腺上皮細胞の役割

C57BL/6(B6)マウスコロニー中に発見された*aly/aly*マウスは、全身のリンパ節とパイエル板を欠損し、胸腺と脾臓の構築異常を示す。*aly*の本態がNF- κ B-inducing kinase (NIK) の点突然変異であることが最近報告された。またこれまで*aly/aly*マウスでは、NK-T細胞数、及びその機能が有意に低下しており、その原因が、*aly/aly*マウスの胸腺構築異常に起因することが北大免疫研で示されている。

本研究では、*aly/aly*マウスの胸腺内NK-T細胞の分化において、CD1分子が胸腺内のどのような細胞によって提示されるかを解析するために、*aly/aly*マウスをドナー、CD1分子を欠き同じくNK-T細胞を欠損する $\beta 2$ ミクログロブリン ($\beta 2m$) ノックアウト (-/-)、あるいはCD1d1-/-マウスをレシピエントとした骨髓キメラを作製し、胸腺内NK-T細胞の分化について分析した。さらに、NK-T細胞の分化に対する胸腺上皮細胞の直接的関与を調べる目的で、B6由来胸腺上皮細胞株を*aly/aly*マウスに胸腺内投与し、胸腺におけるNK-T細胞の産生を検討した。

抗CD3抗体刺激に対するB6、*aly/+*、*aly/aly*マウスのNK-T細胞のサイトカイン産生能を解析した結果、*aly/aly*マウスでは他のマウスに比べて、IL-4、IFN- γ の産生が低下していた。このことから、*aly/aly*マウスではNK-T細胞の産生のみならず、機能的にも異常があることが証明された。

*aly/aly*マウスをドナー、 $\beta 2m$ -/-をレシピエントとする骨髓キメラマウス（以下 [*aly/aly*→ $\beta 2m$ -/-]とする）の胸腺、脾臓では、コントロールキメラマウス（[B6→ $\beta 2m$ -/-]、あるいは[*aly/+*→ $\beta 2m$ -/-]）と同じレベルのNK-T細胞産生が認められた。また、[*aly/aly*→CD1d1-/-]キメラでも、正常レベルのNK-T細胞出現が認められた。

[*aly/aly*→ $\beta 2m$ -/-]マウスで産生された胸腺NK-T細胞の表面マーカーをFACSscanで解析した結果、正常B6マウスのNK-T細胞と同様の表現形を示した。また、抗CD3抗体による刺激に対して、[*aly/aly*→ $\beta 2m$ -/-]マウスの胸腺NK-T細胞は、正常レベルか、それ以上のIL-4、IFN- γ の産生能を示し、これらが機能的にも正常に分化したことが判明した。これらのことから、*aly/aly*マウス胸腺細胞上のCD1分子と、 $\beta 2m$ -/-マウスの胸腺構築が相補的に働き、NK-T細胞が正常に分化したと考えられた。

次に*aly/aly*マウス胸腺左葉に、B6由来の胸腺髄質上皮細胞株(1C6)、胸腺皮質上皮細胞

細胞株(4C18)、または aly/aly マウス由来胸腺上皮細胞株、線維芽細胞株、メディウム単独を投与し、NK-T細胞の分化を解析した。右葉は無処置とした。先ず、投与した胸腺上皮細胞株の定着を調べるために、1C6と4C18を5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidylester (CFSE) でラベルし、胸腺内投与4週後に、蛍光顕微鏡にて観察した。その結果1C6は主に胸腺髄質に、4C18は胸腺皮質に認められ、それぞれの由来する解剖学的位置に定着することが確認された。次に、各細胞株の胸腺内投与4週後に、胸腺を採取し、胸腺内投与した左葉と無処置右葉におけるNK-T細胞の割合を算出し、比較検討した。その結果、胸腺髄質上皮細胞である1C6投与によって、NK-T細胞の有意な増加が認められたが、4C18、 aly/aly 細胞株、またはメディウム投与では、変化は認められなかった。この結果から、NK-T細胞の分化と増殖の誘導には、胸腺環境側の中でも、胸腺髄質上皮細胞が重要な役割を果たすと考えられた。

口答発表に際し、副査の西村 孝司教授より、NK-T細胞のpositive selectionの機構の解明について必要なin vitroのモデル系について、小野江 和則教授より、NIKの異常とNK-T細胞産生異常の関係、脾臓において $[aly/+ \rightarrow \beta 2m-/-]$ より $[aly/aly \rightarrow \beta 2m-/-]$ のNK-T細胞の方がむしろ高いサイトカイン産生能を示したことに対する解釈、主査の川上 義和教授より本研究の臨床応用の可能性についての質問があったが、申請者は文献的考察も含め大概妥当な回答をなし得た。

本研究は、NK-T細胞が造血系細胞上に発現されるCD1分子と胸腺髄質上皮細胞両者によって、増殖・分化することを初めて明らかにした。

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。