

学位論文題名

HTLV-I LTR-env-pX 遺伝子導入ラットにおける
CD4⁺ CD25⁺ T 細胞の異常に関する検討

学位論文内容の要旨

I. 緒言

ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-I) は, gag, pol, env, pX の構造遺伝子からなるヒト感染性レトロウイルスである. HTLV-I は成人 T 細胞白血病 (ATL) の原因ウイルスであるのみならず, 痙性脊髄麻痺, ぶどう膜炎, 慢性関節症, 肺胞性気管支炎, シェーグレン症候群類似の唾液腺炎などの病因とも深く関連していることが明らかとなってきている. p40Tax (Tax) は宿主細胞のさまざまな遺伝子の発現や分子の働きを制御することが知られている. Tax をコードする env-pX 遺伝子を導入した HTLV-I LTR-env-pX 遺伝子導入ラット (env-pX ラット) では, 種々の血管膠原病を発症する. 本ラットの末梢リンパ球は疾患発症の有無に関わらず ICAM-1 や CD80/86 などの副シグナル分子を発現しており発症以前から活性化されやすい状態にあると考えられている. 正常個体では, 自己反応性 T 細胞は何らかの機構で除去または不活化されているものと考えられ, これらの機構として T 細胞性抑制機構が近年注目されている. env-pX ラットにおける自己免疫疾患の病因として, リンパ球の易反応性以外にも, 自己免疫反応抑制細胞の異常も関与している可能性を考慮する必要がある. 本研究では env-pX ラットにおける免疫制御系の異常の有無を明らかにするために, 正常ラットから脾細胞を採取し, env-pX ラットに投与して疾患発症の有無を病理組織学的に解析した. また, マウスにおいて自己免疫反応抑制能が報告されている CD4⁺CD25⁺ T 細胞について, ラットにおける成熟過程及び臓器分布について比較検討した. さらに CD4⁺CD25⁺ T 細胞を単離し, *in vitro* でその増殖反応性ならびに免疫反応抑制効果を比較検討した.

II. 材料と方法

1. 生後 7 週から 8 週齢の WKAH ラットより調製した脾細胞を疾患未発症の生後 7 週齢の env-pX ラットに定期的に投与し, 6 ヶ月後に犠牲死させ, 各臓器に関して病理組織学的検索を行った. 2. 出生直後および生後 5 日目, 10 日目, 14 日目, 21 日目の WKAH ラットならびに env-pX ラットのリンパ系組織より単核球を調製し, FITC 標識抗ラット CD4 抗体および PE 標識抗ラット CD25 抗体を反応させ, FACS 解析を行った. 3. 生後 7 週から 8 週齢の WKAH ラットならびに env-pX ラットを使用し, これらのラットの脾臓またはリンパ節より非附着系単核球を調製し, MACS を用いて CD4⁺CD25⁺ T 細胞を単離した. 4. 抗ラット CD3 抗体を固相化した 96 穴丸底プレートで, WKAH ラットならびに env-pX ラットの脾臓から単離した CD4⁺CD25⁺ T 細胞を 72 時間培養した. 抗 CD3 抗体を固相化しない場合を対照とし, 細胞増殖性を ³H-thymidine の取り込みにより定量した. 5. 抗ラット CD3 抗体を固相化した 96 穴丸底プレートに, WKAH ラットのリンパ節から採取した附着系細胞 (マイトマイシン処理後) と CD4⁺CD25⁺ T 細胞を混合した. これに, WKAH ラットまたは env-pX ラットの脾

臓から単離した CD4⁺CD25⁺ T 細胞を濃度勾配をつけて添加し、96 時間培養した。3H-thymidine の取り込みにより、細胞増殖性を定量した。

III. 結果

1. 正常脾細胞を定期的に投与された env-pX ラットでは、種々の血管膠原病の発症頻度が低下した。2. 正常 WKAH ラットのリンパ節では 生後 5 日目には CD4⁺ T 細胞中にわずかに検出されるようになり、生後 10 日目、14 日目とその比率は増加して 10% 程度まで上昇した。脾臓では、CD4⁺CD25⁺ T 細胞は出生直後から CD4⁺ T 細胞の 5% 程度に認められ、生後 14 日目には一過性にその比率が約 20% まで上昇し、その後は 5 から 10% で推移することが明らかとなった。一方、env-pX ラットの脾臓では正常ラットに認められた生後 14 日をピークとするような一過性の上昇が認められなかった。3. MACS を使用しラット脾臓からの CD4⁺CD25⁺ T 細胞を単離した。純度は約 85% で再現性高く CD4⁺CD25⁺ T 細胞を単離することが可能であった。4. 正常 WKAH ラットの脾臓から単離培養した CD4⁺CD25⁺ T 細胞は自律性増殖を示さず、抗 CD3 抗体を介した刺激に対しても増殖応答を示さなかった。これに対し、env-pX ラットから単離した CD4⁺CD25⁺ T 細胞は、抗 CD3 抗体を固相化していないプレートで培養した場合でも、正常 WKAH ラットから単離した同細胞と比較して有意な自律性増殖を示したうえ、抗 CD3 抗体を介した刺激に対しても有意な増殖応答を示した。5. *in vitro* で CD4⁺CD25⁺ T 細胞の増殖抑制能を確認する実験では WKAH ラットの脾臓から単離した CD4⁺CD25⁺ T 細胞を反応系に添加した場合、細胞数依存的に抗 CD3 抗体による増殖反応が抑制された。しかし、env-pX ラットの脾臓から単離した CD4⁺CD25⁺ T 細胞を添加した場合には、増殖反応は抑制されなかった。

IV. 考察

正常 WKAH ラットの脾細胞を付着系細胞と非付着系細胞に分け、固相化抗 CD3 抗体でリンパ球を刺激する反応系に添加してその抑制能を検討したところ、付着系細胞の分画には増殖反応抑制能は認められず、非付着系細胞分画に抑性能が認められた。この実験の結果ならびにマウスにおける知見から、ラット脾細胞に含まれる免疫反応抑制細胞の候補として CD4⁺CD25⁺ T 細胞を考えた。正常ラットにおける CD4⁺CD25⁺ T 細胞の経時的解析では、脾臓ではリンパ節とは異なる CD4⁺CD25⁺ T 細胞の比率変動が観察された。一方、env-pX ラットの脾臓における CD4⁺CD25⁺ T 細胞の比率は出生直後から正常 WKAH ラットとは異なっており、何らかの機能異常に反映されている可能性が考えられた。生後 7 週から 8 週齢のラット脾臓から CD4⁺CD25⁺ T 細胞を単離し、*in vitro* でその増殖反応性ならびに免疫反応抑制効果を検討したが、正常ラット由来の同細胞はマウス同様アナジーの状態にあると同時に、免疫反応抑制能を発揮したが、env-pX ラット由来の CD4⁺CD25⁺ T 細胞には自律性増殖や、抗 CD3 抗体を介した刺激に対して増殖反応が認められたうえ、免疫反応抑制能が認められなかった。導入遺伝子産物である Tax により CD4⁺CD25⁺ T 細胞自体にさまざまな遺伝子発現の異常が生じている可能性が考えられる。

V. 結語

自己免疫疾患を発症する env-pX ラットにおいて、マウスで自己免疫反応抑制細胞として知られている CD4⁺CD25⁺ T 細胞について解析した。env-pX ラットの脾臓では、成熟過程における CD4⁺CD25⁺ T 細胞の量的推移が正常ラットと異なっていた。また、成熟後の同細胞の機能に増殖不応答性の解除が認められ、免疫反応抑制能の欠落も示唆された。env-pX ラットの自己免疫疾患発症にはリンパ球の易反応性以外にも自己免疫反応抑制細胞の機能異常も関与している可能性がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 小 野 江 和 則
副 査 教 授 西 村 孝 司

学 位 論 文 題 名

HTLV-I LTR-env-pX 遺伝子導入ラットにおける CD4⁺ CD25⁺ T 細胞の異常に関する検討

ヒトT細胞白血病ウイルスI型(HTLV-I)の env-pX 遺伝子を導入した HTLV-I LTR-env-pX 遺伝子導入ラット(env-pX ラット)では、種々の自己免疫疾患を発症しリンパ球の易反応性を認める。申請者は env-pX ラットにおける免疫制御系の異常の有無を明らかにするために、正常ラットから脾細胞を採取し、env-pX ラットに投与して疾患発症の有無を病理組織学的に解析した。また、マウスにおいて自己免疫反応抑制能が報告されている CD4⁺CD25⁺ T 細胞について、ラットにおける成熟過程及び臓器分布について比較検討し、さらに CD4⁺CD25⁺ T 細胞を単離し、in vitro でその増殖反応性ならびに免疫反応抑制効果を比較検討した。

検討に際しては、①.生後7週から8週齢の WKAH ラットより調製した脾細胞を疾患未発症の生後7週齢の env-pX ラットに定期的に投与し、6ヵ月後に犠牲死させ、各臓器に関して病理組織学的検索を行った。②.出生直後および生後5日目、10日目、14日目、21日目の WKAH ラットならびに env-pX ラットのリンパ系組織より単核球を調製し、FITC 標識抗ラット CD4 抗体および PE 標識抗ラット CD25 抗体を反応させ、FACS 解析を行った。③.抗ラット CD3 抗体を固相化したプレートで、WKAH ラットならびに env-pX ラットの脾臓から単離した CD4⁺CD25⁺ T 細胞を72時間培養した。抗 CD3 抗体を固相化しない場合を対照とし、細胞増殖性を 3H-thymidine の取り込みにより定量した。④.抗ラット CD3 抗体を固相化した 96 穴丸底プレートに、WKAH ラットのリンパ節から採取した付着系細胞と CD4⁺CD25⁺ T 細胞を混合した。これに、WKAH ラットまたは env-pX ラットの脾臓から単離した CD4⁺CD25⁺ T 細胞を濃度勾配をつけて添加し、96時間培養した。3H-thymidine の取り込みにより、細胞増殖性を定量した。

その結果、env-pX ラットの脾臓では、成熟過程における CD4⁺CD25⁺ T 細胞の量的推移が正常ラットと異なっていた。また、成熟後の同細胞の機能に増殖不応答性の解除が認められ、免疫反応抑制能の欠落も示唆された。env-pX ラットの自己免疫疾患発症にはリンパ球の易反応性以外にも自己免疫反応抑制細胞の機能異常も関与している可能性を認めた。

質疑応答においては副査西村教授より固相化抗 CD3 抗体で刺激した場合の CD4⁺CD25⁺T 細胞、あるいは totalCD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞の反応性に関する質問があった。続いて、CD4⁺CD25⁺T 細胞の単離において purity が 80% 台であったが、混入した細胞についての影響についてどうか、CD4⁺CD25⁺T 細胞と類似した細胞として Tr1 細胞との違い、共通点、サイトカイン産生の違いに関する質問があった。次いで、副査小野江教授より過去における CD4⁺CD25⁺T 細胞の異常に関して過去に報

告があったか、ラット成長過程における CD4⁺CD25⁺T 細胞の動態、について、また、それとの env-pX ラットにおける疾患発症との関連性、MACSにおける positive selection において細胞への刺激を与える可能性について、CD4⁺CD25⁺T 細胞における CTLA-4 の発現について、CD4⁺CD25⁺T 細胞に CD4⁺CD25⁻T 細胞を混和した場合の反応性に関しての質問があった。最後に主査小池教授より env-pX ラットにおける CD4⁺CD25⁺T 細胞には clonality を認めるか、T 細胞レセプターは確認されているか、env-pX ラットにおける CD4⁺CD25⁺T 細胞の異常が疾患発症に関連する根拠、6 週目以降での CD4⁺CD25⁺T 細胞の応答性はどうかなどの質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は現在までの env-pX ラットや CD4⁺CD25⁺T 細胞に対する知見や関連する論文報告などを引用し、また申請者自身の考察を交えて概ね妥当な応答をした。

この論文は、env-pX ラットの CD4⁺CD25⁺T 細胞に機能異常が生じていることを示し、自己免疫疾患の発症に免疫制御系細胞の異常が関与する可能性を考察した点で高く評価され、今後の HTLV-I 関連疾患の病因解明の一翼を担うものとして期待される。

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。