

学位論文題名

Developmental and functional analyses of CD8⁺ NK1.1⁺ T cells in the class I restricted TCR transgenic mice

(MHC クラス I 拘束性 TCR トランスジェニックマウスにおける CD8⁺ NK1.1⁺ T 細胞の分化と機能の解析)

学位論文内容の要旨

はじめに

マウスの NK1.1⁺T(NKT)細胞は主に CD4⁺CD8⁻(CD4⁺NKT 細胞)と CD4⁻CD8⁻(double negative: DN NKT 細胞) のポピュレーションから構成され、胸腺、脾臓、肝臓、骨髄などのリンパ系臓器に分布する。NKT 細胞は、非多形性の MHC 様分子、CD1 を発現している CD4⁺CD8⁺胸腺細胞により正の選択を受けること、分化の場としては胸腺が重要な役割を果たしていることが判明している。NKT 細胞は、抗 CD3 抗体刺激により、通常の T 細胞と比較して早期に、かつ大量のサイトカイン (IL-4、IFN- γ) を分泌する。これらの作用により、腫瘍の拒絶反応、アレルギーや自己免疫疾患などの種々の免疫学的生体応答に関与していると考えられている。

最近 NKT 細胞のサブポピュレーションとして、CD4⁻CD8⁺ (CD8⁺NKT 細胞) のポピュレーションが存在することが報告されているが、その分化や機能については以前から報告のある CD4⁺NKT 細胞、DN NKT 細胞と比較して不明の部分が多い。

本研究では、MHC クラス I 拘束性 T 細胞受容体 (TCR) トランスジェニックマウス (Tgm) の 2C Tgm (V α 3.1/V β 8.2 ; L^d+LSPFPFDL に特異的 TCR ; クロノタイプ抗体 1B2) を種々の MHC バックのマウスと交配し、胸腺、脾臓、肝臓における、1B2⁺NKT 細胞の分化に対する MHC 分子の影響について検討した。また CD1 分子の役割について検討するため、CD1^{-/-}2C Tgm を作成し、同様の解析を行った。最後に正の選択の MHC バック、負の選択の MHC バックにおいて分化する 1B2⁺NKT 細胞のサイトカイン産生能について検討した。

方法と結果

1. T 細胞の分化に際して、TCR α 鎖の発現に関しては対立遺伝子排除が不完全に働く場合があることが知られている。内因性 TCR α 鎖の発現を完全に排除し、さらに異なる MHC バックを導入するため、2C Tgm を recombination activating gene (Rag) ノックアウトマウスと交配し、正の選択バックの 2C Tgm Rag1^{-/-} (H-2^{b/b})、負の選択バックの 2C Tgm Rag2^{-/-} (H-2^{b/d} もしくは H-2^{d/d}) を作成した。同様に 2C Tgm を B10.BR (H-2^{k/k}) と交配し、中立の選択バックの 2C Tgm (H-2^{k/k}) を作成した。

胸腺、脾臓、肝臓いずれの臓器でも、通常の T 細胞が負の選択を受ける 2C Tgm Rag2^{-/-} (H-2^{b/d}) の場合には、最も多くの割合の 1B2⁺ NKT 細胞が認められ、これらは主に DN NKT 細胞で、CD8⁺ NKT 細胞も少数分化しうることが判明した。正の選択バックの 2C Tgm Rag1^{-/-} (H-2^{b/b}) においては、CD8⁺ NKT 細胞が、メジャーポピュレーションとして分化した。CD8 分子には CD8 $\alpha\alpha$ と CD8 $\alpha\beta$ の 2 種があり、 β 鎖は TCR を介した細胞内シグナル伝達を増強する役割があることが判明している。2C Tgm Rag1^{-/-} (H-2^{b/b}) において分化する CD8⁺ NKT 細胞の CD8 分子は、 $\alpha\beta$ ヘテロダイマーであった。一方、2C Tgm Rag2^{-/-} (H-2^{b/d}) で分化する CD8⁺ NKT 細胞の CD8 分子は $\alpha\alpha$ ホモダイマーであった。中立の選択バックである 2C Tgm (H-2^{k/k}) では、いずれの臓器でも 1B2⁺ NKT 細胞はほとんど認められなかった。またいずれの H-2 バックの 2C Tgm においても CD4⁺ NKT 細胞は産生されなかった。

2. 1B2⁺ NKT 細胞の分化における CD1 分子の役割を検討するため、2C Tgm(H-2^{b/b}) を CD1^{-/-} マウス (H-2^{d/d}) と交配し、CD1^{-/-} 2C Tgm (H-2^{b/d} もしくは H-2^{d/d}) を作成した。CD1^{-/-} 2C Tgm においては、2C Tgm Rag2^{-/-} (H-2^{b/d} もしくは H-2^{d/d}) とほぼ同様の割合の 1B2⁺ NKT 細胞が認められた。以上の結果は、2C Tgm では H-2 タイプの違いが分化する 1B2⁺ NKT 細胞の割合とフェノタイプを決定する因子であること、CD1 分子は 1B2⁺ NKT 細胞の分化には関与しないことを示す。

3. 各 H-2 バックの 2C Tgm において分化した、1B2⁺ NKT 細胞のサイトカイン産生能を解析するために、2C Tgm Rag1^{-/-} (H-2^{b/b}) と 2C Tgm Rag2^{-/-} (H-2^{b/d}) に、抗 CD3 抗体 (2.0 μ g/PBS 200 μ l) を尾静脈より静注した。90 分後にこれらのマウスより脾臓を回収して 2 時間培養し、上清中の IL-4、IFN- γ の濃度を ELISA にて測定した。IL-4 はいずれのマウスでも産生されなかった。IFN- γ については、2C Tgm Rag2^{-/-} (H-2^{b/d}) において、対照の B6 マウスより強い産生がみられ、2C Tgm Rag1^{-/-} (H-2^{b/b}) においては弱い産生がみられた。IFN- γ 産生に主に寄与している細胞は、2C Tgm Rag1^{-/-} (H-2^{b/b}) においては CD8⁺ NKT 細胞であり、2C Tgm Rag2^{-/-} (H-2^{b/d}) においては DN NKT 細胞であった。

考察

これまで TCR Tgm を用いて、NKT 細胞の分化が解析され、クラス I 拘束性 TCR Tgm では、BM3.3 および H-Y について、クラス II 拘束性 TCR Tgm では DO11.10 についての報告がある。BM3.3 および H-Y Tgm では、いずれも負の選択の H-2 バックで、DN NKT 細胞の分化が促進されることが判明している。

本研究では、2C Tgm を用いて NKT 細胞分化を解析した。その結果、これまでの報告と同様、負の選択のバックでは DN NKT 細胞がメジャーポピュレーションとして分化した。しかし少数ながら負の H-2 バックにおいて、CD8⁺ NKT 細胞も分化しうること、また、正の H-2 バックでは CD8⁺ NKT 細胞がメジャーポピュレーションとして分化することが判明した。正常 B6 マウスでは CD8⁺ NKT 細胞はマイナーポピュレーションであることから、このことは興味深い現象と考えられた。実際従来報告されている invariant TCR をもつ NKT 細胞は、主に CD4⁺ と DN NKT 細胞より構成され、これらは抗 CD3 抗体刺激により IL-4 と IFN- γ を産生する。これに比較して本研究にて示した CD8⁺ NKT 細胞は IL-4 分泌能を欠いていた。

本研究において、NKT 細胞が従来考えられてきたように単一で均質なポピュレーション

ではないこと、また NKT 細胞の中でも CD4 または CD8 分子の発現の違いにより、機能に差異がみられることが明らかになった。

最近 CD8⁺NKT 細胞が CD8⁺T 細胞と比較して腫瘍細胞を殺傷する能力が強いことが報告されており、腫瘍性疾患治療に対する CD8⁺NKT 細胞の応用研究が重要と考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 孝 司
副 査 教 授 福 田 諭
副 査 教 授 小 野 江 和 則

学位論文題名

Developmental and functional analyses of CD8⁺ NK1.1⁺ T cells in the class I restricted TCR transgenic mice

(MHC クラス I 拘束性 TCR トランスジェニックマウスにおける
CD8⁺ NK1.1⁺ T 細胞の分化と機能の解析)

マウスの NK1.1⁺ T (NKT) 細胞は、主に CD4⁺ CD8⁻ (CD4⁺ NKT 細胞) と CD4⁻ CD8⁻ (double negative: DN NKT 細胞) のポピュレーションから構成され、胸腺、脾臓、肝臓、骨髄などのリンパ系臓器に分布する。マウスの NK1.1⁺ T 細胞のサブポピュレーションとして、CD4⁻ CD8⁺ (CD8⁺ NKT 細胞) が存在することが報告された。しかし、その分化や機能については不明の部分が多い。申請者は、MHC クラス I 拘束性 T 細胞受容体 (TCR) トランスジェニックマウス (Tgm) の 2C Tgm を種々の Rag^{-/-}、MHC バックのマウスと交配し、胸腺、脾臓、肝臓における、クロナタイプ陽性 (1B2⁺) NKT 細胞の分化に対する MHC 分子の影響について検討した。さらに CD1 分子の役割について検討するため、CD1^{-/-} 2C Tgm を作成し、同様に解析した。最後に正の選択の MHC バック、負の選択の MHC バックにおいて分化する 1B2⁺ NKT 細胞のサイトカイン産生能について検討した。その結果、胸腺、脾臓、肝臓いずれの臓器でも、通常の T 細胞が負の選択を受ける 2C Tgm Rag2^{-/-} (H-2^{b/d}) の場合には、最も多くの割合の 1B2⁺ NKT 細胞が認められ、これらは主に DN NKT 細胞で、CD8⁺ NKT 細胞も少数分化しうること、正の選択バックの 2C Tgm Rag1^{-/-} (H-2^{b/b}) においては、CD8⁺ NKT 細胞が、メジャーポピュレーションとして分化することが判明した。また 2C Tgm Rag1^{-/-} (H-2^{b/b}) において分化する、CD8⁺ NKT 細胞の CD8 分子は $\alpha\beta$ ヘテロダイマーであり、2C Tgm Rag2^{-/-} (H-2^{b/d}) で分化する CD8⁺ NKT 細胞の CD8 分子は $\alpha\alpha$ ホモダイマーであった。中立

の選択バックである 2C Tgm (H-2^{kb})では、いずれの臓器でも 1B2⁺NKT 細胞はほとんど認められなかった。またいずれの H-2 バックの 2C Tgm においても、CD4⁺NKT 細胞は産生されなかった。CD1⁺ 2C Tgm (H-2^{dd})においては、CD1^{+/+} 2C Tgm (H-2^{dd})とほぼ同様の割合の 1B2⁺NKT 細胞が認められた。以上の結果から、申請者は 2C Tgm では H-2 タイプの違いが、分化する 1B2⁺NKT 細胞の割合とフェノタイプを決定する因子であること、CD1 分子は 1B2⁺NKT 細胞の分化には関与しないと結論した。次に 1B2⁺NKT 細胞のサイトカイン産生能を *in vivo* で解析した。IFN- γ については、2C Tgm Rag2^{-/-} (H-2^{dd})において、対照の B6 マウスより強い産生がみられ、2C Tgm Rag1^{-/-} (H-2^{kb})においては弱い産生がみられた。IL-4 は、いずれのマウスでも産生されなかった。IFN- γ 産生に主に寄与している細胞は、2C Tgm Rag1^{-/-} (H-2^{kb})においては CD8⁺NKT 細胞であり、2C Tgm Rag2^{-/-} (H-2^{dd}) においては DN NKT 細胞であった。

学位発表後、副査の福田教授から、機能解析の刺激条件について、使用したマウスについて、臨床応用の可能性について、副査の小野江教授から、クラス I 拘束性 TCR トランスジェニックマウスとクラス II 拘束性 TCR トランスジェニックマウスで分化する NKT 細胞の違いについて、Th1/Th2 バランスについて、主査の西村教授から、CD4⁺NKT 細胞との違いについて質問がなされた。申請者は自身の研究結果、あるいは文献的知識に基づいて、誠実かつ、概ね適切に回答し得た。

この論文により、NKT 細胞が従来考えられてきたように単一で均質なポピュレーションではないこと、また NKT 細胞の中でも CD4 または CD8 分子の発現の違いにより、機能に差異がみられることが判明し、今後の NKT 細胞の研究に、示唆と方向性を与えた点が高く評価された。

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。