

ヒト末梢血における CD8陽性単球の解析

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

CD8 は CD8 α および CD8 β がジスルフィド結合したヘテロダイマー、もしくは CD8 α のホモダイマーとして存在する膜型糖蛋白質で、主に細胞傷害性 T 細胞 (CTL) に発現している。我々は、全血に抗 CD8 α 抗体を添加し、溶血後に行ったフローサイトメトリー (FCM) において、健康人末梢血の単球中に CD8 α 陽性細胞 (CD8 陽性単球) を見出した。単球中に占める CD8 陽性単球の割合には個人差が見られ、その割合は多い人では 30%に達した。CD8 陽性単球において CD8 の mRNA 発現は確認されず、加えて、血清や細胞の分離操作により、CD8 陽性単球の検出率は低下した。これらのことから、単球上に検出される CD8 は単球自身が産生したものではなく、他の血球由来であると推察された。本研究では、CD8 陽性単球が検出されるメカニズムの解明を目的として検討を行った。

【材料、方法および結果】

1. CD8 陽性単球の発見

健康人末梢血全血に抗 CD14 抗体と抗 CD8 α 抗体または抗 CD8 β 抗体を反応させ、溶血後に FCM を行った。CD14 陽性の単球中に、CD8 陽性細胞を確認した。CD8 陽性単球の多くは CD8 β 陽性であった。

2. RT-PCR

全血から CD8 陽性単球と CD8 陰性単球、リンパ球をそれぞれ分取し、CD3 ϵ , CD8 α , CD8 β , CD14 の遺伝子発現を検討した。CD8 陽性単球において、CD8 α と CD8 β の mRNA 発現は認めず、単球上に検出される CD8 は、単球自身が産生したものではなく、他の血球由来であると考えられた。

3. 血清の関与

A) 全血に抗 CD8 α 抗体を添加後溶血させたサンプルと、PBMC を分離し、PBS に浮遊させた状態で抗体を反応させたサンプルについて、CD8 陽性単球の割合を比較した。前者に比べて後者では CD8 陽性単球の割合が低下し、CD8 陽性単球の検出に血清が必要であることが示唆された。

B) CD8 陽性単球の割合の高い個体および低い個体の血液を用いて、血清および PBMC を分離して入れ替え、CD8 陽性単球の割合を比較した。PBMC を CD8 陽性単球の割合の高い個体の血清に浮遊させた場合に CD8 陽性単球の割合が高く検出され、CD8 陽性単球は血清依存的に検出されることが示された。

4. 可溶性 CD8 (sCD8) の関与について

A) 6 検体の血液について CD8 陽性単球を検出し、併せて血清中の sCD8 濃度を測定した。CD8 陽性単球の割合と血清 sCD8 濃度との間に相関は見られなかった。

B) PBMC を sCD8 低値の血清、または sCD8 高値の血清に浮遊させ、CD8 陽性単球の割合を比較した。sCD8 高値の血清に PBMC を浮遊させた場合に CD8 陽性単球の割合は増加せず、血清中の sCD8 と CD8 陽性単球との関連性は否定された。

5. T リンパ球の関与について

A) CD14 陽性の単球のみを分離したサンプルでは、CD8 陽性単球の検出率は低下した。

CD8 陽性単球の検出には他の細胞の存在が必要であることが示唆された。

B) 全血から PBMC, CD14 陽性の単球, CD3 陽性の T リンパ球をそれぞれ分離した。PBMC をサンプルとしたもの, T リンパ球と分離培養した単球をサンプルとしたもの, T リンパ球と混合培養した単球をサンプルとしたものについて, CD8 陽性単球の割合を比較した。単球と T リンパ球の接触を阻害した分離培養では, CD8 陽性単球の割合が低下した。CD8 陽性単球の検出には, 単球と T リンパ球の接触が必要であると考えられた。

6. Fc の関与について

酵素処理により F (ab')₂ 化した抗 CD8 α 抗体を用いた場合に, CD8 陽性単球の検出率が減少し, CD8 陽性単球の検出には抗 CD8 α 抗体の Fc 部分が関与していると考えられた。

7. Fc 受容体の関与について

単球表面に発現する Fc γ R I (CD64), Fc γ R II (CD32), Fc γ R III (CD16) の 3 つの受容体に対し, それぞれの阻害抗体を用いて, CD8 陽性単球の検出率を検討した。Fc γ R II (CD32) に対する阻害抗体を用いた場合に, CD8 陽性単球の検出率が減少し, CD8 陽性単球の検出には抗 CD8 抗体の Fc 部分と単球上の Fc γ R II (CD32) の結合が関与していると考えられた。

8. 膜機能の関与について

A) 4.0%パラホルムアルデヒドを用いた膜固定により, CD8 陽性単球の割合が低下し, 細胞膜の流動性が CD8 陽性単球の検出に必要であると考えられた。

B) アクチン重合を阻害する Cytochalasin D 存在下で CD8 陽性単球の割合は低下し, 細胞骨格の変動が CD8 陽性単球の検出に関与していると考えられた。

9. CD8 以外の分子の移動について

全血に抗 CD8 α 抗体を反応させた後, 単球上の CD3 陽性所見もしくは $\alpha\beta$ TCR 陽性所見の変化を検討した。抗 CD8 α 抗体を反応させることにより, 単球上に検出される CD3 および $\alpha\beta$ TCR の陽性率が増加した。

【考察】

臨床検査領域での FCM において, 全血に抗体を添加した後に溶血させる方法 (全血溶血法) は, 一般的な方法である。この方法は, 少ない血液量で検査が可能であること, 血球の割合を正しく反映することなど, 数々の利点がある。本法において, 本来単球が発現していない CD8 が単球上に検出される現象は今までに報告がなく, 全血溶血法による FCM の盲点として重要な知見と考えられる。

CD8 陽性単球の検出メカニズムとして, 必要な血清因子の存在下において, T リンパ球上の CD8 に抗 CD8 α 抗体が結合することにより, 抗体の Fc 部分と単球上の Fc γ R II (CD32) が結合して T リンパ球と単球を架橋し, 細胞膜の流動性や細胞骨格の変動を伴って, CD8 が T リンパ球から単球上に移動すると考えられた。さらに, CD8 が T リンパ球から単球上に移動する際に, CD3 や TCR もともに単球上に移動する現象が観察されたことから, T リンパ球と単球との間には, 細胞膜の癒合を伴う密な接着が生じている可能性が高いと考えられる。このメカニズムを解明することは, 免疫担当細胞間の相互作用の多様性を理解するうえで重要である。

我々の実験系は *in vitro* の系であるが, *in vivo* における抗 CD8 抗体投与モデルとの関連性も注目される。関節炎等の自己免疫疾患モデル動物において, 抗 CD8 抗体の *in vivo* 投与により, 重症度の軽減や CTL 数の減少が見られたという報告がある。これらのモデルにおいて, 抗 CD8 抗体の投与が CTL の減少を誘導する機序としては, 補体依存性細胞傷害などが考えられているが, その他にも CTL 上の CD8 が抗 CD8 抗体を介して単球に移動し, CTL の減少や機能抑制がもたらされた可能性も考えられる。また, 抗 CD8 抗体が産生される病態として, 全身性エリテマトーデスやヒト免疫不全ウイルス感染症が知られている。これら抗 CD8 抗体が出現する個体においては, CTL 数の減少や機能抑制が生じることも報告されている。我々が捉えている抗 CD8 抗体による CTL から単球への CD8 の移動が, これらの病態における CTL の減少や機能抑制を説明付けるひとつのメカニズムである可能性も考えられる。今後さらに, 抗 CD8 抗体によって引き起こされる血球間の相互作用の病態生理学的な意義について, より詳細な解析を行う必要がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 笠 原 正 典

副 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 小野江 和 則

学 位 論 文 題 名

ヒト末梢血における CD8陽性単球の解析

本研究は、ヒト末梢血において、CD8 陽性単球が検出されるメカニズムについて検討している。必要な血清因子の存在下で、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 上の CD8 分子に抗 CD8 抗体が結合し、抗 CD8 抗体の Fc 領域が単球上の FcγR II (CD32) に結合することにより CTL と単球とが架橋され、CD8 とともに CD3、T 細胞受容体 (TCR) といった CTL 上の機能分子が、細胞膜や細胞骨格の流動性を伴って、単球上に移動する現象について、初めて明らかにしたものである。

質疑応答においては、副査である上出教授より、まず、CD8陽性単球の検出について、罹病時や、特定の疾患群においてはどのような変化が見られるかについて、質問がなされた。申請者は、風邪やワクチン接種等を行った程度では、CD8陽性単球検出の割合に大差は認めないものの、膀胱がん患者のBCG治療開始前後でCD8陽性単球の割合が著明に上昇したことを説明し、何らかの強い炎症反応によって、この現象が促進される可能性について言及した。また、生体におけるこの現象の意味付けについて、どのように考えているかと質問された。具体的には、炎症反応が亢進しているような局所においては、T細胞と単球が密接に接触を繰り返していることが予想されるが、こうした部位で単球とT細胞とが接着し分子のやりとりをしている可能性についてどのように考えるか、また、抗CD8抗体を介さない場合にもこの現象が起きるかどうか質問された。申請者は、現時点では、抗CD8抗体を添加しない場合には、CD8の移動は捉えられないとしながらも、生体内での特殊な環境下において同様の反応が起きる可能性はあると考えるという旨を返答した。また、FcγR IIは抑制性レセプターであり、活性化したB細胞においても発現することが知られているが、その点についてはどうかとの質問があった。同サンプル中の、B細胞については着目したことはないものの、顆粒球分画においては、単球と同様にCD8陽性所見が出現することを説明し、単球だけでなく、FcγR IIをもつ他の血球によっても、この現象が起きうる可能性があるかと返答した。今回申請者らが捉えている現象が、生体内でどのような局面もしくは病態で起き得るかも含め、今後とも是非研究を進め追及してほしいとのコメントが寄せられた。

次いで、小野江教授から、CD8陽性単球の多い個体と低い個体があるが、その中間はあるか、もしくは二群に分かれる印象か、と質問があった。申請者は、二群に分かれる印象であると返答した。また、CD8陽性単球の検出に関与する血清中の因子について、どのような可能性が考えられるか、と質問があった。申請者は、現時点では、同定するに至らないが、血清中の何らかの因子の多寡によってこの反応が起きると考えられると説明した。さらに、抗CD8抗体のisotypeをmouse IgG1以外のもので検討したかどうか、質問があった。例えばisotypeがIgMであれば、FcγRを介した反応は起きないはずである。申請者は、非常に興味深い、今のところ検討したことはない旨を返答した。

最後に、主査である笠原教授より、今回発見した現象は、パズルを読み解くような面白さがあったらとコメントがあった。また、現在捉えている in vitro での現象が、生理

学的、病理学的にどのような意味をもつかについて、今後の重要な検討課題となるとの指摘があった。

この論文は、大きく2点において評価される。1点は、臨床的にも研究目的でも頻用されている代表的なフローサイトメトリーの手法である全血溶血法のサンプル調整において、それまで全く報告のない偽陽性が検出されるメカニズムを明らかにした点である。もう1点は、細胞性免疫における重要な担当細胞であるCTLがそのkey moleculeであるCD8といった機能分子を、抗体を介して他の血球に奪われるという現象があることを発見した点である。この現象が現実には生体内で起きているかどうかに関しては現時点では明らかではないものの、今後の検討により解明される可能性が期待される。また、この現象を明らかにすることにより、生体内でおきている複雑な細胞間相互作用の一端が明らかになることが期待される。この現象はさらに、抗リンパ球抗体などの産生をきたす全身性エリテマトーデスのような自己免疫疾患や、ヒト免疫不全ウイルス感染症といった病態との関連性が考えられ、病理学的意義に関してもさらなる展開が期待される。

審査員一同は、上記のようにこ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合わせ申請者が博士(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。