

氏 名(本籍) あさ い けん いち
浅 井 健 一

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 第 6 7 7 号

学位授与年月日 平 成 16 年 3 月 4 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 乳牛の泌乳サイクルに伴う乳汁 T 細胞サブセットの機能
解析

論文審査委員 (主 査) 教 授 山 口 高 弘
(副 査) 教 授 佐 藤 英 明
教 授 勝 亦 瞭 一

論文内容要旨

第1章 序論

乳牛の乳腺は泌乳期と乾乳期から成る泌乳サイクルに伴い、その組織構造および機能に変化する。泌乳期は分娩直後の初乳分泌期とその後約10ヶ月にわたり活発に乳汁分泌が行われる時期からなる。この時期に妊娠したウシは分娩予定日の約2ヶ月前に搾乳を停止し、次の泌乳活動に備えての乳腺の退縮、再構築が行われる。泌乳期と乾乳期ともに、その乳汁 (mammary gland secretion: MGS) には乳腺上皮組織に由来する体細胞が含まれており、若干の上皮細胞と多数の白血球から構成される。MGS 中の白血球はマクロファージが最も多く、次いでリンパ球とごく少数の好中球が含まれる。リンパ球はT細胞、B細胞、non-T/non-B細胞から成るがT細胞が最も大きいポピュレーションを構成する。

乳腺内の細菌感染に対する感受性は、乾乳導入後の乳腺退行期と周産期、特に分娩後に増加することが知られている。これらの時期は泌乳期から乾乳期あるいは乾乳期から泌乳期への移行時であるが、泌乳期と乾乳期の乳腺の免疫システムが変化する時には、個々のシステムが十分に機能することができず生体防御能が一時的に低下している可能性が示唆される。

本研究では、T細胞が乳腺免疫の制御において中心的役割を担っていると推測し、MGS-T細胞の機能を詳細に解析することにより、泌乳期と乾乳期の免疫応答の違いを解明することを試みた。初めにMGS-T細胞を構成する各サブセット (CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、ACT2⁺T細胞、 $\gamma\delta$ ⁺T細胞) の泌乳サイクルに伴う構成比の変動を明らかにし、腸管上皮間T細胞および末梢血T細胞との比較を行った。次に、泌乳期および乾乳期のMGS-T細胞の個々のサブセットについて遺伝子発現能を解析した。これらの結果からT細胞による乳腺免疫機構とその制御について考察を行った。

第2章 泌乳サイクルに伴う乳汁T細胞の変動

MGSを遠心分離し体細胞を分離した後、比重勾配遠心法で単核球画分を回収した。この細胞をフローサイトメトリーで解析したところ (Fig. 1A~D)、リンパ球 (G1⁻GM1⁻) は約15~40%、マクロファージ (G1⁻GM1⁺) は約50~70%、顆粒球 (G1⁺GM1⁺) は約5~20%であった。リンパ球クラスターにゲートをかけ (Fig. 1A) 内部の細胞を解析すると (Fig. 1E、F) マクロファージ、顆粒球はほとんど存在せず大部分がCD2⁺細胞 (T細胞) であった。

リンパ球ゲート内のCD2⁺、CD4⁺およびCD8⁺T細胞の比率は泌乳サイクルの進行に伴って変動した (Table 1)。CD4⁺T細胞の比率は周産期 (Peripartum) から泌乳期にかけては低いが、乾乳期に入ると増加して中期以

降は高くなった。対照的に、 $CD8^+$ T 細胞の比率は周産期には低いが、泌乳期には高くなり、乾乳期に入ると再び低くなった。これらの結果から、MGS 中の T 細胞のサブセット構成は泌乳期には $CD8^+$ T 細胞優位 ($CD4/CD8$ 比 <1)、乾乳期には $CD4^+$ T 細胞優位 (同比 >1) になることが明らかになった。さらに、末梢血リンパ球の $CD4/CD8$ 比は約 2 であるので、この値よりも MGS リンパ球の $CD4/CD8$ 比は泌乳期に低く乾乳期に高いことが判明した。また、MGS リンパ球の $CD4/CD8$ 比の変動は乾乳導入後の増加と分娩直前の減少が顕著であった (Fig. 2)。このときの乳中体細胞数 (SCC) の変動は $CD4/CD8$ 比の変動と高い相関が認められた (Fig. 3)。泌乳期の MGS の優位な T 細胞サブセットである $CD8^+$ T 細胞の多くは ACT2 という分子を発現するユニークなサブセットであるが、乾乳期ではこの $CD8^+ACT2^+$ T 細胞は著しく減少した (Table 2)。

MGS から分離した単核球をコンカナバリン A (ConA) で刺激し mRNA を RT-PCR 法で検出した (Fig. 4)。その結果、乾乳期の MGS 単核球では PBMC と同じかそれ以上の高レベルの IL-2 および IL-4 mRNA が検出されたが、泌乳期の MGS 単核球ではこれらの mRNA は検出されなかった。IL-2 と IL-4 は共に T 細胞から産生されるサイトカインであるので泌乳期と乾乳期の MGS-T 細胞はマイトージェンに対する応答性が異なる、即ち機能的に異なる T 細胞であることが明らかになった。

第 3 章 乳汁 T 細胞と血中および腸管上皮間 T 細胞とのサブセット構成の比較

MGS-T 細胞のサブセット構成を初乳、泌乳期、乾乳期の 3 ステージにおいて、リンパ球ゲート内の T 細胞 ($CD2^+$ 細胞) 中のパーセンテージとして表した (Table 3、Fig. 5)。MGS-T 細胞は泌乳期には $CD8^+$ T 細胞優位 ($CD4/CD8$ 比 $=0.47$) で乾乳期には $CD4^+$ T 細胞優位 (同比 $=4.35$) であり、初乳は両時期の中間的なサブセット構成 (同比 $=1.15$) であった。本実験では 3 カラーのフローサイトメトリーを行うことにより $CD2^+CD4^-CD8^-$ 細胞の存在が初めて明らかになった。このサブセットは泌乳期に多く存在し (Fig. 5)、大部分が ACT2 と TCR $\gamma\delta$ 鎖を発現した (Fig. 6、7)。T 細胞レセプター (TCR) $\gamma\delta$ 鎖を発現している、所謂 $\gamma\delta$ T 細胞の MGS 中の存在も今まで報告が無かったが、本実験でその存在が確認できた。ACT2⁺T 細胞と同様に $\gamma\delta$ T 細胞は泌乳期の MGS に多いが乾乳期の MGS には少なく (Table 3)、大部分が $CD8^+$ T 細胞と $CD4^-CD8^-$ T 細胞から構成された (Fig. 6、7)。そして、 $\gamma\delta$ T 細胞の大部分は ACT2 を発現していた (Fig. 8)。初乳の ACT2⁺T 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞は泌乳期と乾乳期のその中間的な比率で存在した (Fig. 6、7)。

次に、腸管上皮間 (i-IE) および末梢血 (PB) T 細胞と泌乳期の MGS-T 細

胞のサブセット構成の比較を行った。i-IE-T細胞はCD8⁺T細胞優位（CD4/CD8比=0.13）で、CD4⁻CD8⁻T細胞の比率が高いこと（Table 4、Fig. 9）、ACT2⁺T細胞と γ δ T細胞の構成割合が高く、それらの大部分はCD8⁺T細胞とCD4⁻CD8⁻T細胞であること（Fig. 10、11）、 γ δ T細胞の大部分はACT2を発現しているACT2⁺ γ δ T細胞であること（Fig. 12）から、泌乳期のMGS-T細胞とサブセット構成が非常に類似していた。一方、PB-T細胞は泌乳期のMGS-T細胞とは異なりCD4⁺T細胞優位（CD4/CD8比=3.44）で、ACT2⁺T細胞と γ δ T細胞は非常に少なかった（Fig. 10）。

第4章 乳汁T細胞サブセットの機能解析

泌乳期と乾乳期のMGSから各T細胞サブセットをMACS磁気細胞分離法で単離し、抗CD3抗体で刺激した後、RT-PCR法でサイトカインと細胞表面分子のmRNA発現のプロファイリング解析を行った。

MGSのCD4⁺T細胞では泌乳期にIL-2、IFN- γ 、TGF- β のmRNAが、乾乳期にIL-2、IL-4、GM-CSF、IFN- γ 、TGF- β 、TNF- α 、CD40L、FasL、IL-2RのmRNAが検出され（Fig. 13）、それらの発現量は全て泌乳期より乾乳期の方が有意に高かった（Fig. 14A）。よって、CD4⁺T細胞の泌乳期、乾乳期間の遺伝子発現能の違いは主に量的なものと考えられた。一方、MGSのCD8⁺T細胞では泌乳期と乾乳期に発現したmRNAのプロファイルは大きく異なっていた（Fig. 14B）。IFN- γ 、IL-2、FasL、IL-2Rの発現量は泌乳期より乾乳期の方が有意に高く、反対にGM-CSF、TGF- β 、TNF- α 、*c-kit*の発現量は乾乳期より泌乳期の方が高く、特にTGF- β と*c-kit*において有意差が認められた。興味深いことに、*c-kit* mRNAは泌乳期のCD8⁺T細胞のみに検出され、反対にIL-4とCD40LのmRNAは乾乳期のCD4⁺T細胞のみに検出された（Fig. 14A、B）。

泌乳期のMGSの γ δ T細胞とACT2⁺T細胞はmRNA発現のプロファイルが泌乳期のCD8⁺T細胞のそれと非常に類似していた（Fig. 15、Fig. 16）。しかし、 γ δ T細胞のTGF- β 、TNF- α 、*c-kit*、IL-2R mRNAの発現量は泌乳期のCD8⁺T細胞のものよりも有意に高かった。さらに、ACT2⁺T細胞の*c-kit*とIL-2R mRNAの発現量はCD8⁺T細胞のものより有意に高かったが γ δ T細胞のものよりは低かった。よって、TGF- β 、TNF- α 、*c-kit*、IL-2R mRNAの発現量には γ δ T細胞>ACT2⁺T細胞>泌乳期のCD8⁺T細胞という関係があることが明らかになった。

第5章 総合考察

本研究において乳牛の MGS には T 細胞が含まれており、泌乳期には CD8⁺T 細胞が優位に、乾乳期には CD4⁺T 細胞が優位になり、CD4/CD8 比は泌乳サイクルに伴って変動することを見出した。この結果は泌乳期と乾乳期の乳腺免疫の調節に重要な役割を担う T 細胞サブセットが異なり、それが MGS-T 細胞サブセットの優位性に現れることを示すものであった。

MGS の CD8⁺T 細胞は mRNA 発現プロファイルが泌乳期と乾乳期で明らかに異なっていた。これは泌乳期の MGS-CD8⁺T 細胞では $\gamma\delta$ T 細胞と ACT2⁺T 細胞の比率が高く、乾乳期の MGS にはこの 2 つのサブセットはほとんど含まれないことが原因であると考えられた。それは同時に、 $\gamma\delta$ T 細胞と ACT2⁺T 細胞は泌乳期乳腺の機能維持や生体防御に深く関与していることを示唆するものである。

$\gamma\delta$ T 細胞、ACT2⁺T 細胞の mRNA プロファイルは泌乳期の CD8⁺T 細胞のそれと類似性が高く、TGF- β 、TNF- α 、*c-kit*、IL-2R mRNA の発現量はこれらのサブセットにおける $\gamma\delta$ T 細胞の比率に依存して増加した。よって、ACT2⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞に発現したこれらの mRNA は大部分が $\gamma\delta$ T 細胞 (ACT2⁺ $\gamma\delta$ T 細胞と CD8⁺ $\gamma\delta$ T 細胞) に由来することが示唆された。さらに、泌乳期の CD4⁺T 細胞はこれらの mRNA をほとんど発現しなかった。以上のことから、泌乳期の MGS-T 細胞において発現する TGF- β 、TNF- α 、*c-kit*、IL-2R の mRNA は、大部分が $\gamma\delta$ T 細胞に由来する可能性が高い。このことから TGF- β 、TNF- α 、*c-kit*、IL-2R は乳腺における $\gamma\delta$ T 細胞の機能に深く関係していると思われる。

TGF- β は T 細胞の増殖とサイトカイン産生を阻害することが知られている。本研究では CD4⁺T 細胞で検出された全ての mRNA の発現と CD8⁺T 細胞での IFN- γ 、IL-2、FasL、IL-2R mRNA の発現は乾乳期に比較して泌乳期で低下していた。CD4⁺T 細胞はほとんどが $\alpha\beta$ T 細胞であること、大部分が $\alpha\beta$ T 細胞から成る乾乳期の CD8⁺T 細胞は IFN- γ 、IL-2、FasL、IL-2R mRNA を発現することから、泌乳期には $\alpha\beta$ T 細胞のサイトカイン mRNA の発現が抑制されていることが示唆された。また、乾乳期と同様に泌乳期の CD8⁺細胞も、 $\gamma\delta$ T 細胞が多いとはいえ主体は $\alpha\beta$ T 細胞から成る。それにもかかわらず、その mRNA プロファイルは乾乳期の CD8⁺T 細胞のものとは明らかに異なり、 $\gamma\delta$ T 細胞のものに類似していた。この結果も泌乳期に CD8⁺ $\alpha\beta$ T 細胞のサイトカイン mRNA 発現が抑制されていることを支持するものである。一方、泌乳期の MGS に多く含まれる $\gamma\delta$ T 細胞では TGF- β mRNA の高発現が認められた。これらの結果は、泌乳期の乳腺において $\gamma\delta$ T 細胞から産生される TGF- β が $\alpha\beta$ T 細胞の mRNA の発現抑制、即ち低応答性を誘導することを示唆するものである (Fig.

18)。

TNF- α はマクロファージと好中球の活性化に重要なサイトカインであり、IFN- γ と協調的に働きこれら貪食細胞の貪食能と抗菌活性を増強する。よって、泌乳期乳腺では $\gamma\delta$ T 細胞から産生される TNF- α と IFN- γ は自然免疫を中心とする感染防御能を増強すると考えられる (Fig. 18)。

c-kit は SCF レセプターをコードするが、マウスの腸管上皮では上皮細胞は SCF を産生して IL-2 等のサイトカインと協調的に *c-kit* レセプターを発現する $\gamma\delta$ T 細胞の増殖と活性化を促す。ウシ乳腺において $\gamma\delta$ T 細胞は上皮内に局在する。よって、乳腺上皮と腸管上皮の類似性を考えると、乳腺においても上皮細胞から産生される SCF により $\gamma\delta$ T 細胞の活性化が行われると考えられる (Fig. 18)。IL-2R は T 細胞が活性化すると細胞表面に発現が増加する分子である。その mRNA が $\gamma\delta$ T 細胞で高発現していたことは、乳腺上皮での *c-kit* レセプターを介した $\gamma\delta$ T 細胞の活性化が起こることを支持するものである。

以上のことから、泌乳期の MGS- $\alpha\beta$ T 細胞は低応答性であり、これは *c-kit* レセプターを介して活性化した $\gamma\delta$ T 細胞の産生する TGF- β により誘導されたことが示唆された。これにより、泌乳期乳腺の $\gamma\delta$ T 細胞は上皮細胞の分泌機能を妨げるような過剰な免疫応答を抑制しているのかもしれない。その一方で、泌乳期乳腺の $\gamma\delta$ T 細胞は腸管上皮での粘膜免疫機構のように、乳腺上皮細胞と密接な連携のもとで全身免疫系とは独立した防御機構に深く関係していると考えられる。

ACT2⁺T 細胞は泌乳期の MGS と i-IE に特徴的に存在する T 細胞サブセットであった。しかし、ACT2⁺T 細胞に発現した mRNA は主に ACT2⁺ $\gamma\delta$ T 細胞に由来しており、ACT2⁺T 細胞特有な mRNA プロファイルというものは認められなかった。したがって、ACT2⁺T 細胞は特定の免疫学的エフェクター機能を持ったサブセットではなく、多種類のサブセットからなる粘膜指向性の細胞集団である可能性が高いと思われる。よって、ACT2 分子の機能は粘膜特異的ホーミングレセプターや上皮細胞と相互作用を行うための分子である可能性が考えられる (Fig. 18)。泌乳期には ACT2⁺T 細胞が ACT2 を接着分子として機能させ乳腺内へホーミングし、乾乳期には上皮組織の退縮により上皮細胞との相互作用が破綻し、ACT2⁺T 細胞は細胞死を起こすことが考えられる。ACT2 を発現する細胞はほとんどが CD8⁺T 細胞で、CD4⁺T 細胞はごく少数である。さらに、 $\gamma\delta$ T 細胞の大部分は ACT2 抗原を発現する。これらのことから、泌乳サイクルを通した T 細胞サブセットの構成割合の変動は乳腺内の ACT2⁺T 細胞の増減が一因であると考えられる。乾乳期の MGS では SCC の増加が起きたことから、乾乳期には乳腺組織の退縮により末梢血中の白血球が乳腺内に流入すると考えられる。その乾乳期の MGS で T 細胞の CD4/CD8 比が PB のそれよりも高くなることは、乳腺内に PB-T 細胞が流入したことに加え、乳腺内の ACT2

^{+}T 細胞が減少した結果、起こると考えることができる。

$CD4^{+}T$ 細胞、所謂ヘルパーT 細胞はウシにおいて、 $IFN-\gamma$ を産生する T ヘルパー1 (Th1) 細胞と $IL-4$ を産生する T ヘルパー2 (Th2) 細胞に大別される。本研究では泌乳期の MGS の $CD4^{+}T$ 細胞は $IFN-\gamma$ mRNA を発現したが $IL-4$ mRNA は発現せず、乾乳期のものは $IFN-\gamma$ と $IL-4$ mRNA を発現した。よって、Th1 細胞は泌乳期と乾乳期の MGS に存在するが Th2 細胞は乾乳期 MGS だけに存在することが明らかになった。そして、 $CD40L$ mRNA は乾乳期の $CD4^{+}T$ 細胞のみで発現し、 $FasL$ mRNA もまた乾乳期のみで発現した。 $CD40L$ と $FasL$ は B 細胞上のリガンドである $CD40$ 、 Fas に結合し、B 細胞の活性化と細胞死をそれぞれ誘導するため、T-B 細胞相互作用において重要な役割を担っている。 $CD40L$ による $CD40$ のクロスリンクは B 細胞の増殖と Ig 産生を誘導すると共に Fas を発現させ、B 細胞は Fas 依存性アポトーシスに感受性になる (Fig. 18)。さらに $IL-4$ と表面 Ig を介した刺激はこのアポトーシスシグナルから B 細胞を回避させ、一方、抗原認識なしに活性化した不要な B 細胞は Fas 依存性アポトーシスで排除される (Fig. 18)。以上のことから、乾乳期乳腺での優位な T 細胞サブセットである $CD4^{+}T$ 細胞の中の Th2 細胞は液性免疫応答を制御ならびに増強することにより感染防御に深く関与することが示唆された。さらに、乾乳期の乳腺では乳腺上皮組織が退縮するが、この時の乳腺上皮細胞には Fas が発現し、T 細胞に発現した $FasL$ によりアポトーシスが誘導される可能性が考えられる (Fig. 18)。

これまで述べたように、乳腺の免疫系、特に T 細胞サブセットの構成と機能は泌乳期と乾乳期で大きく異なることが明らかになった。乳腺の細菌感染に対する感受性が乾乳導入後と周産期、特に分娩後に増加するのは、泌乳期と乾乳期、あるいは乾乳期と泌乳期の移行期の間は両期の相異なる免疫系が共存するため、どちらの免疫系も十分機能発揮することができず生体防御能が一時的に低下することに起因するものと考えられる。

本研究では T 細胞による乳腺免疫機構、主として乳腺上皮内の T 細胞サブセットの役割について詳細に解析を行った。上皮細胞と T 細胞の相互作用、さらには全身免疫とのつながりなどが明らかになることにより、乳腺免疫のさらなる理解が得られる。このことが乳腺の生体防御機構の解明に役立ち、乳牛で深刻化している乳房炎の防除ならびに治療に貢献するものと考えられる。

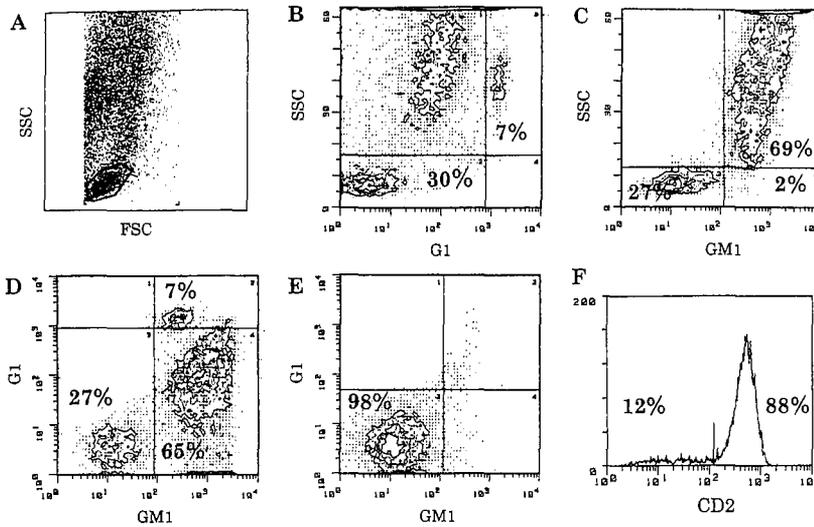


Fig. 1. Flow cytometry analysis of MGS cells. Panel A, B, C and D: Total MGS cells. Panel E and F: MGS lymphocytes gated as shown in Panel A.

Table 1. T cell subpopulations in the mammary gland secretions (MGS) and peripheral blood (PB) of cows at different stages of lactation cycle.

| Samples | Stage of lactation cycle (Number of samples) | % of positive cells (mean±SEM) | | | CD4/CD8 ratio (mean±SEM) |
|-----------------|---|--------------------------------|-----------|----------|-----------------------------|
| | | CD2 | CD4 | CD8 | |
| MGS lymphocytes | Peripartum A (2) | 38.0±2.8 | 16.5±4.9 | 25.5±9.2 | 0.73±0.46 |
| | Peripartum B (10) | 64.0±17.5 | 34.7±14.5 | 35.6±6.2 | 1.02±0.56 |
| | Early lactation (13) | 88.5±3.8 | 26.2±11.5 | 53.1±7.6 | 0.52±0.27 |
| | Late lactation (6) | 84.3±8.4 | 33.3±7.8 | 43.0±8.7 | 0.80±0.22 |
| | Early dry (4) | 68.5±19.8 | 35.3±9.3 | 25.8±9.9 | 1.47±0.38 |
| | Middle dry (6) | 87.2±4.1 | 68.3±8.4 | 16.3±1.8 | 4.26±0.92 |
| | Late dry (8) | 80.1±18.6 | 56.5±14.1 | 17.8±7.3 | 3.42±0.70 |
| PB lymphocytes | Late lactation (4) | 47.5±13.4 | 28.0±7.1 | 12.5±2.1 | 2.30±0.34 |
| | Late dry (4) | 58.5±0.7 | 37.0±2.8 | 19.5±3.5 | 1.95±0.43 |

Peripartum A: Within 48 h preparturition, Peripartum B: Within 48 h postparturition, Early lactation: Within 90d postparturition, Late lactation: Greater than 90 d postparturition, Early dry: Within 14 d after drying off, Middle dry: 14 to 45 d after drying off, Late dry: Greater than 45 d after drying off.

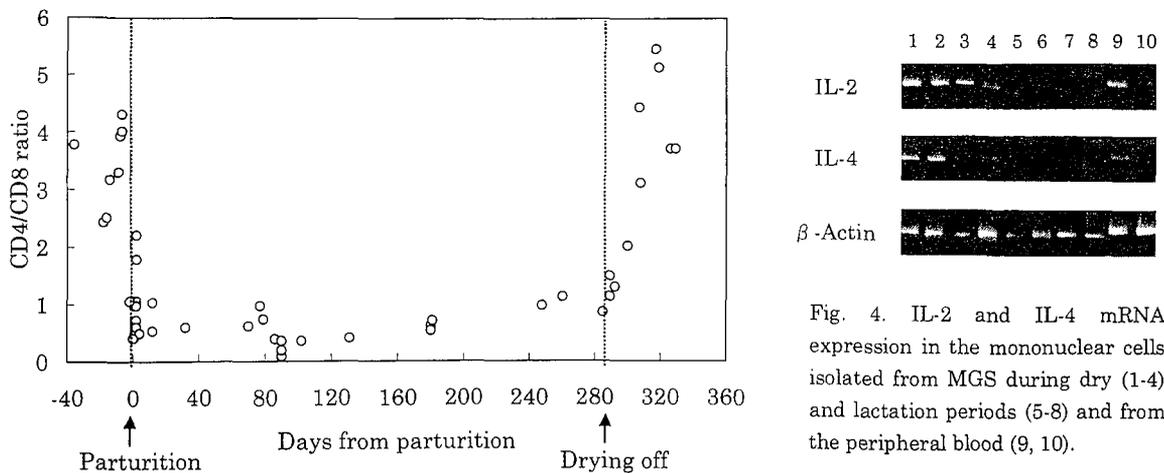


Fig. 2. Variation in CD4/CD8 ratios of T cells in MGS during the lactation cycles.

Fig. 4. IL-2 and IL-4 mRNA expression in the mononuclear cells isolated from MGS during dry (1-4) and lactation periods (5-8) and from the peripheral blood (9, 10).

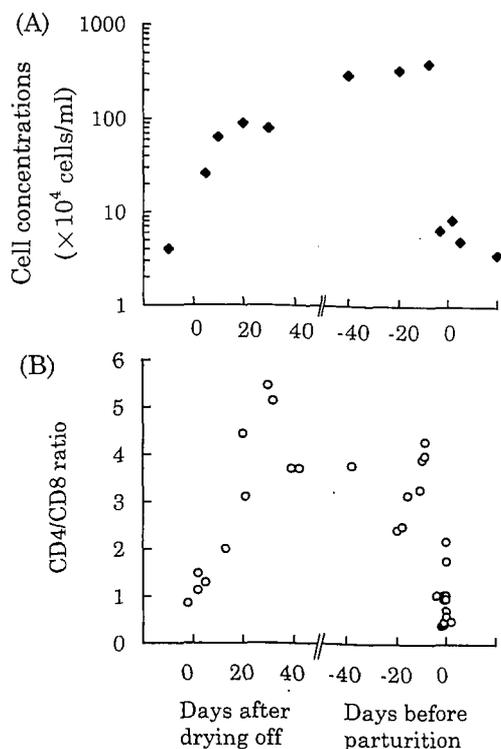


Fig. 3. Correlation between the variations in somatic cell concentrations (A) and CD4/CD8 ratios (B) of MGS during the dry period. Samples obtained during early dry period and late dry period were expressed as days after drying off and days before parturition, respectively.

Table 2. Percentages of T cells expressing CD8 and/or ACT2 antigens in MGS during lactation and dry period.

| Antigen | % of positive cells (mean \pm SEM) | |
|------------------------------------|--------------------------------------|--------------------|
| | Lactation period | Dry period |
| CD4 ⁺ | 23.8 \pm 15.4 (4) | 67.3 \pm 8.2 (6) |
| CD8 ⁺ | 54.0 \pm 11.2 (4) | 18.7 \pm 6.4 (6) |
| ACT2 ⁺ | 55.3 \pm 26.4 (4) | 8.3 \pm 1.3 (6) |
| CD8 ⁺ ACT2 ⁺ | 40.0 \pm 20.4 (4) | 5.2 \pm 0.8 (6) |

Values in parentheses are number of specimens.

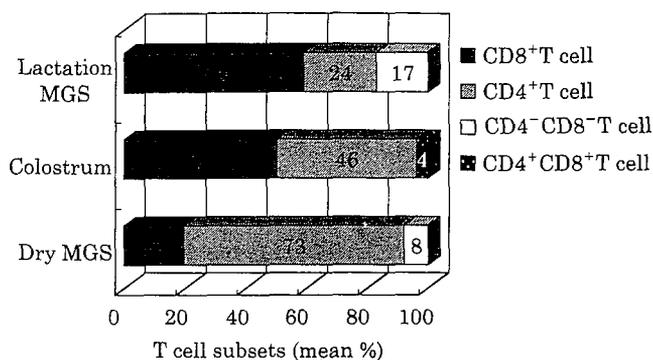


Fig. 5. Mean percent of T cell subsets in MGS. The percentages of T cell subsets are expressed as (the percent of positive cells)/(the percent of CD2⁺ cells) \times 100.

Table 3. T cell subpopulations in MGS at different lactation stages.

| Phenotype | Positive cells (mean percent \pm SEM) ^a | | |
|--|--|--------------------|-------------------|
| | Lactation MGS (n=12) ^b | Colostrum (n=8) | Dry MGS (n=12) |
| CD4 ⁺ | 24.0 \pm 13.9 | 50.2 \pm 8.7** | 72.5 \pm 8.8** |
| CD8 ⁺ | 58.8 \pm 12.7 | 45.7 \pm 7.9 | 19.5 \pm 6.7** |
| CD4 ⁻ CD8 ⁻ | 17.1 \pm 10.1 | 0 \pm 0** | 8.0 \pm 5.9* |
| CD4 ⁺ /CD8 ⁺ ratio | 0.47 \pm 0.36 | 1.15 \pm 0.44** | 4.35 \pm 2.17** |
| ACT2 ⁺ | 62.2 \pm 19.4 | 24.0 \pm 10.1** | 7.0 \pm 2.9** |
| CD4 ⁺ ACT2 ⁺ | 2.6 \pm 1.8 | 2.7 \pm 1.3 | 2.3 \pm 1.4 |
| CD8 ⁺ ACT2 ⁺ | 44.1 \pm 18.1 | 18.1 \pm 5.8** | 5.6 \pm 2.1** |
| CD4 ⁻ CD8 ⁻ ACT2 ⁺ | 16.6 \pm 14.2 | 0 \pm 0** | 0 \pm 0** |
| TCR γ δ ⁺ | 29.4 \pm 13.8 | 12.6 \pm 5.4* | 1.7 \pm 0.8** |
| ACT2 ⁺ TCR γ δ ⁺ | 26.1 \pm 13.4 | 10.7 \pm 5.6* | 0.3 \pm 0.5** |
| CD4 ⁺ TCR γ δ ⁺ | 1.1 \pm 1.6 | 1.0 \pm 0.7 | 0.8 \pm 0.9 |
| CD8 ⁺ TCR γ δ ⁺ | 12.7 \pm 4.9 | 8.7 \pm 0.9 | 1.9 \pm 0.7** |
| CD4 ⁻ CD8 ⁻ TCR γ δ ⁺ | 16.2 \pm 11.7 | 0 \pm 0** | 0 \pm 0** |

^a The percentages of T cell subpopulation are expressed as (the percent of positive cells)/(the percent of CD2⁺ cells) \times 100

^b Values in parentheses are number of samples.

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, as compared with the same subpopulation in lactation MGS.

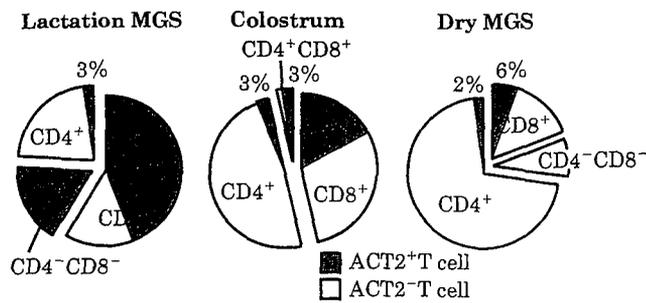


Fig. 6. ACT2⁺ T cell subpopulation in MGS at different lactation stages.

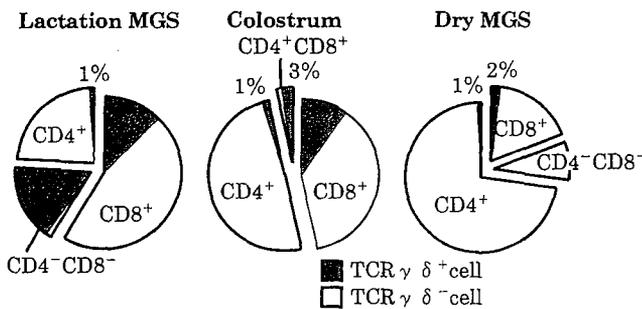


Fig. 7. TCR γ δ⁺ cell subpopulation in MGS at different lactation stages.

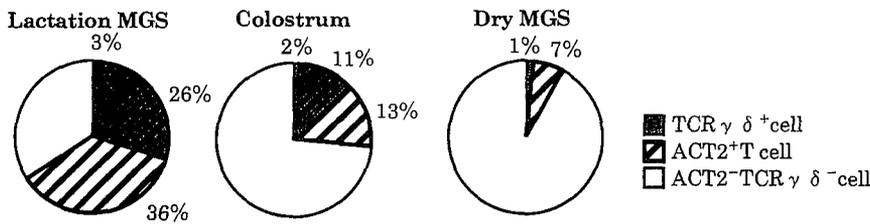


Fig. 8. Coexpression of TCR γ δ and ACT2 antigen on T cells in MGS at different lactation stages.

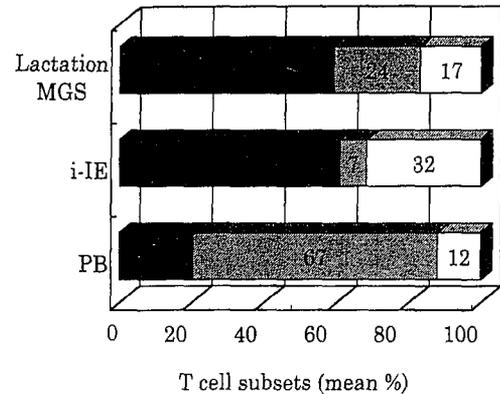


Fig. 9. Mean percent of T cell subsets in MGS during lactation period (Lactation MGS), intestinal intraepithelium (i-IE) and peripheral blood (PB). The percentages of T cell subsets are expressed as (the percent of positive cells)/(the percent of CD2⁺ cells) × 100.

Table 4. T cell subpopulations in MGS during lactation period (Lactation MGS), intestinal intraepithelium (i-IE) and peripheral blood (PB).

| Phenotype | Positive cells (mean percent ± SEM) ^a | | |
|--|--|------------|-------------|
| | Lactation MGS (n=12) ^b | i-IE (n=3) | PB (n=7) |
| CD4 ⁺ | 24.0±13.9 | 7.4±2.5** | 67.3±6.2** |
| CD8 ⁺ | 58.8±12.7 | 60.6±7.6 | 20.3±3.6** |
| CD4 ⁻ CD8 ⁻ | 17.1±10.1 | 32.0±5.6* | 12.5±4.6 |
| CD4 ⁺ /CD8 ⁺ ratio | 0.47±0.36 | 0.13±0.06 | 3.44±0.81** |
| ACT2 ⁺ | 62.2±19.4 | 79.7±14.7 | 7.3±2.6** |
| CD4 ⁺ ACT2 ⁺ | 2.6±1.8 | 1.6±1.7 | 4.6±1.9* |
| CD8 ⁺ ACT2 ⁺ | 44.1±18.1 | 60.0±14.7 | 3.5±2.5** |
| CD4 ⁻ CD8 ⁻ ACT2 ⁺ | 16.6±14.2 | 17.2±4.3 | 1.3±1.6* |
| TCR γ δ ⁺ | 29.4±13.8 | 23.3±2.1 | 3.1±1.9** |
| ACT2 ⁺ TCR γ δ ⁺ | 26.1±13.4 | 21.3±2.1 | 1.4±1.0** |
| CD4 ⁺ TCR γ δ ⁺ | 1.1±1.6 | 0±0 | 0±0 |
| CD8 ⁺ TCR γ δ ⁺ | 12.7±4.9 | 6.3±2.5** | 2.0±2.6** |
| CD4 ⁻ CD8 ⁻ TCR γ δ ⁺ | 16.2±11.7 | 16.1±1.3 | 1.8±2.4** |

^a The percentages of T cell subpopulations are expressed as (the percent of positive cells)/(the percent of CD2⁺ cells) × 100.

^b Values in parentheses are number of samples.

* p < 0.05 and ** p < 0.01, as compared with the same subpopulation in lactation MGS.

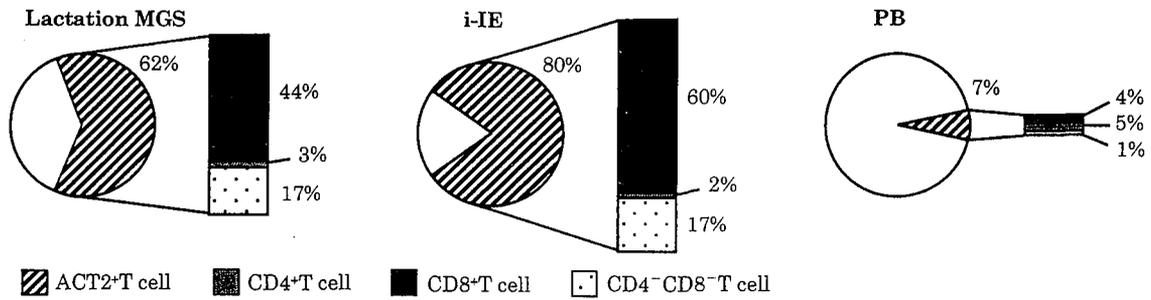


Fig. 10. ACT2⁺ cell subpopulation in MGS during lactation period (Lactation MGS), intestinal intraepithelium (i-IE) and peripheral blood (PB).

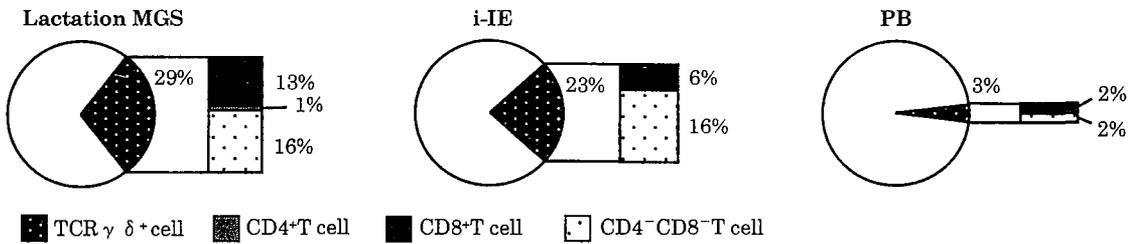


Fig. 11. TCR γ δ⁺ cell subpopulation in MGS during lactation period (Lactation MGS), intestinal intraepithelium (i-IE) and peripheral blood (PB).

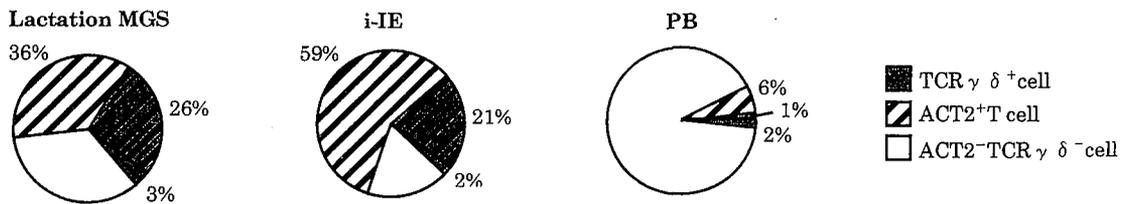


Fig. 12. Coexpression of TCR γ δ and ACT2 antigen on T cells in MGS during lactation period (Lactation MGS), intestinal intraepithelium (i-IE) and peripheral blood (PB).

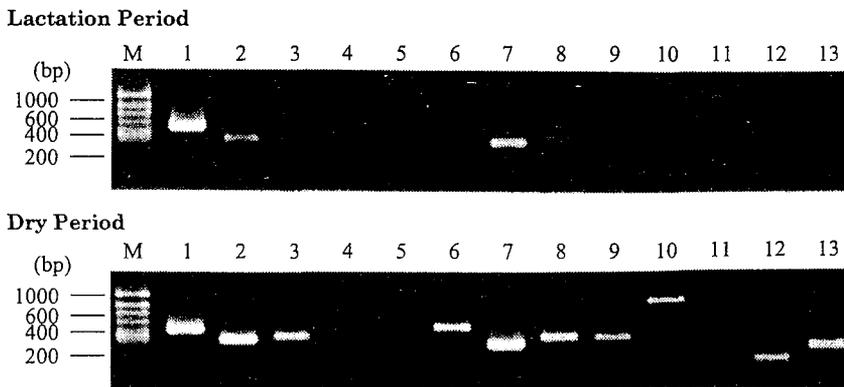


Fig. 13. Profile of mRNA expression of cytokine and cell surface molecules in CD4⁺T cells from MGS during lactation period and dry period. Lane 1: β-actin, lane 2: IL-2, lane 3: IL-4, lane 4: IL-6, lane 5: IL-10, lane 6: GM-CSF, lane 7: IFN-γ, lane 8: TGF-β, lane 9: TNF-α, lane 10: CD40L, lane 11: c-kit, lane 12: FasL, lane 13: IL-2R.

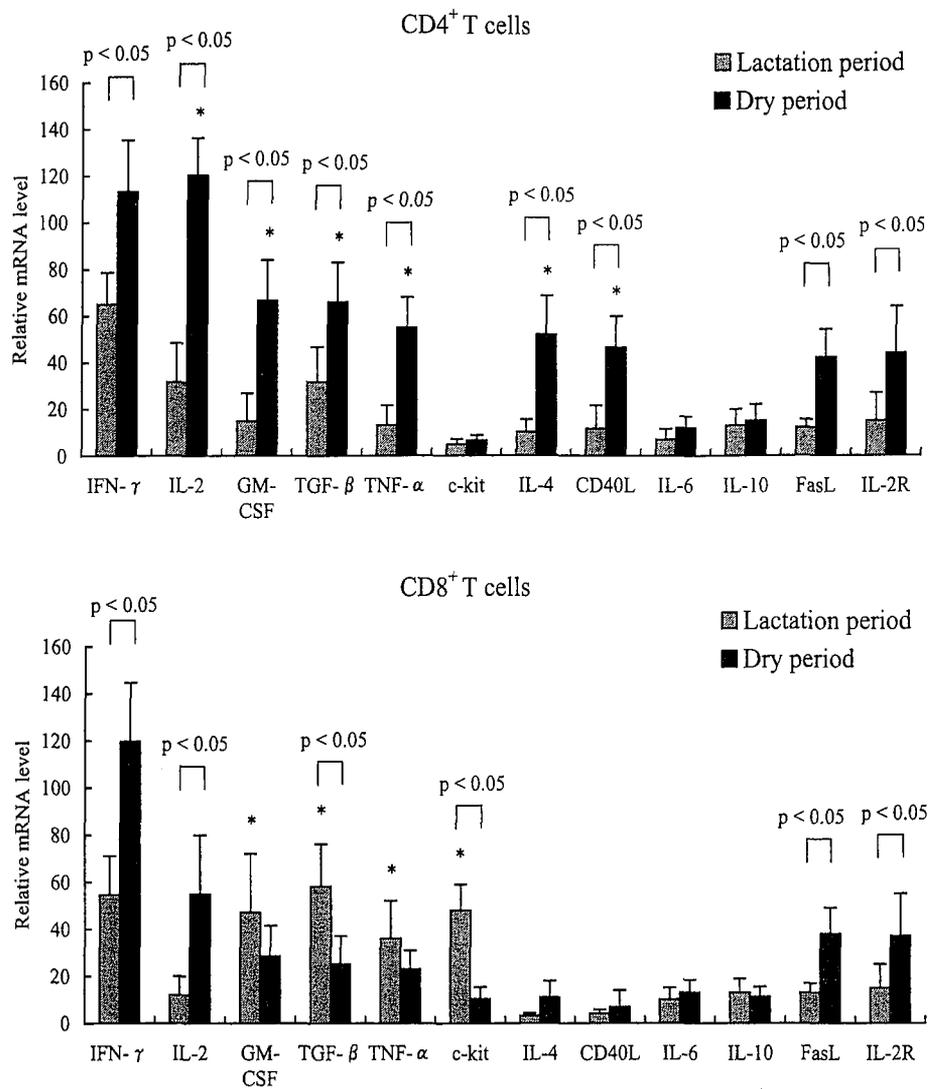
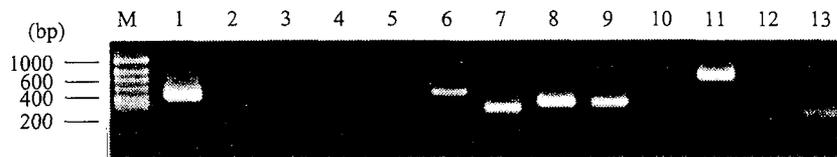


Fig. 14. Relative mRNA expression in CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells from MGS during lactation period and dry period. Levels of mRNA expression were expressed as (signal of the interest gene/signal of the β -actin gene) \times 100 for each sample. Results were expressed as mean \pm SEM (n = 4). Statistically significant differences between lactation period and dry period were shown in the figures. * P < 0.05, as compared with the other subpopulation during the same period.

γ δ T cells



CD8⁺ T cells

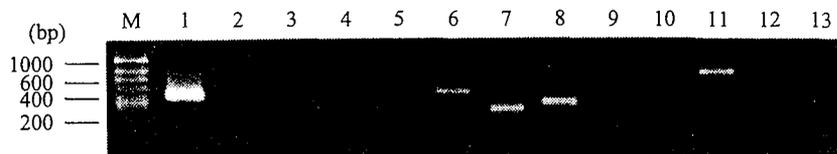


Fig. 15. Profile of mRNA expression of cytokine and cell surface molecule mRNA in γ δ T cells and CD8⁺ T cells from MGS during lactation period. Lane 1: β -actin, lane 2: IL-2, lane 3: IL-4, lane 4: IL-6, lane 5: IL-10, lane 6: GM-CSF, lane 7: IFN- γ , lane 8: TGF- β , lane 9: TNF- α , lane 10: CD40L, lane 11: c-kit, lane 12: FasL, lane 13: IL-2R.

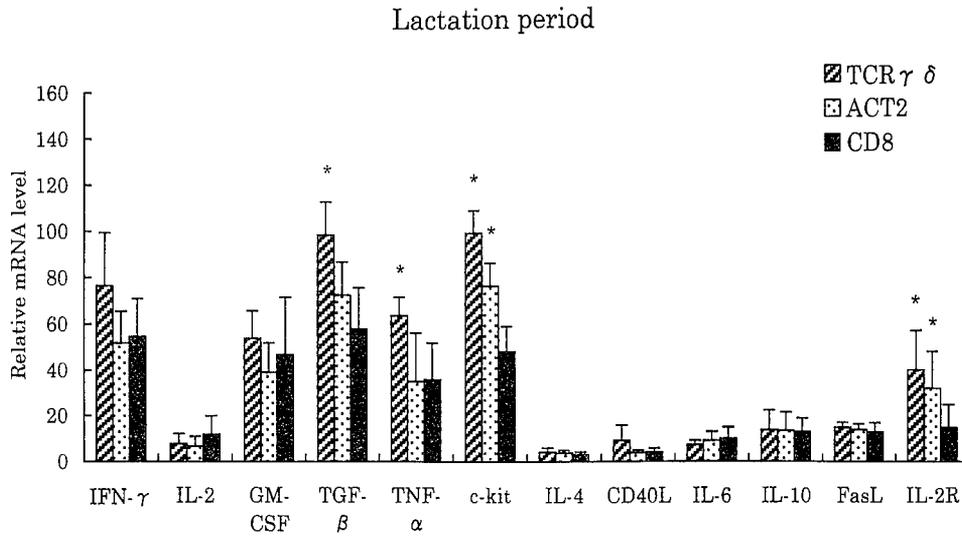


Fig. 16. Relative mRNA expression in $\gamma\delta$ T cells, ACT2⁺ T cells and CD8⁺ T cells from MGS during lactation period. Levels of mRNA expression are expressed as (signal of the interest gene/signal of the β -actin) \times 100 for each sample. Results are expressed as mean \pm SEM (n = 4). * P < 0.05, as compared with CD8⁺ T cells.

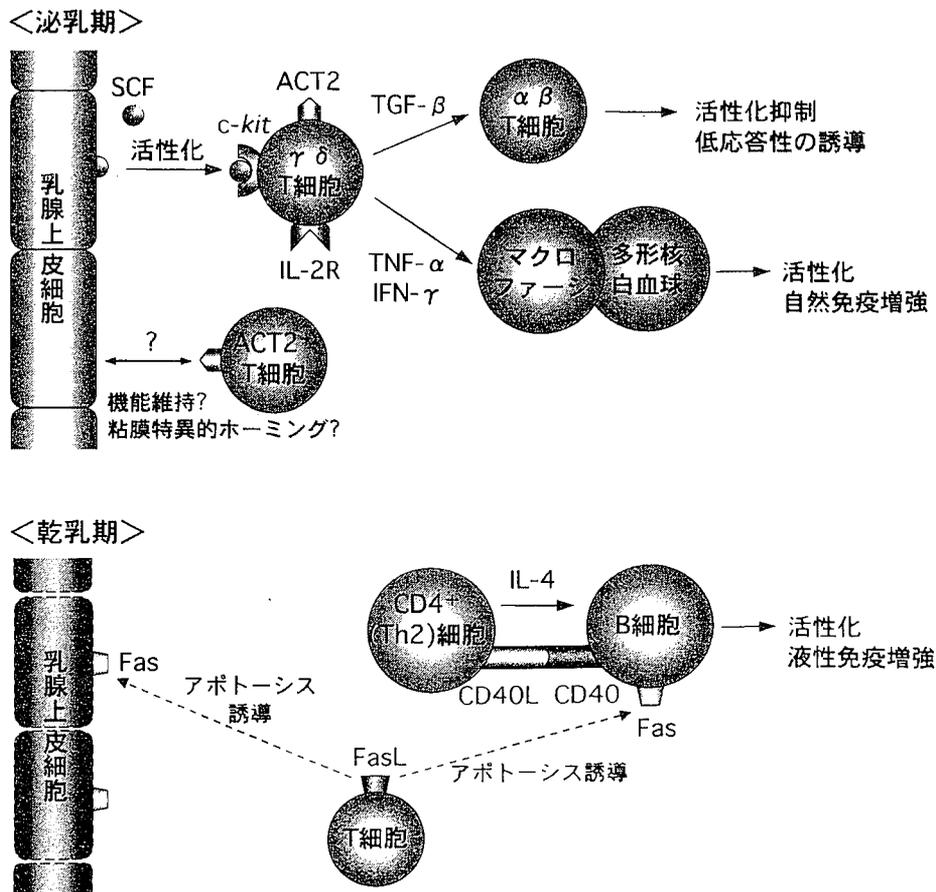


Fig. 17 泌乳期および乾乳期での乳腺免疫応答の特徴

論文審査結果要旨

乳牛の乳腺には泌乳期と乾乳期があり、泌乳サイクルに伴い、組織構造と機能が変化する。乳汁 (mammary gland secretion:MGS) には乳腺上皮由来のリンパ球である T 細胞, B 細胞, non-T/non-B 細胞等が含まれ, T 細胞が最大のポピュレーションを構成する。本研究では, T 細胞が乳腺免疫制御において, 中心的役割を担っていると推測し, MGS-T 細胞の各サブセット (CD4⁺T 細胞, CD8⁺T 細胞, ACT2⁺T 細胞, $\gamma\delta$ +T 細胞) の機能を詳細に解析し, 泌乳期と乾乳期の免疫機構とその応答の違いを解明することを目的とした。

CD4⁺T 細胞比率は周産期から泌乳期にかけては低いが, 乾乳期に入ると増加して中期以降は高く, 一方, CD8⁺T 細胞比率は周産期には低いが, 泌乳期では高くなり, 乾乳期に入ると再び低くなった。したがって, MGS 中の T 細胞サブセット構成は泌乳期では CD8⁺T 細胞優位 (CD4/CD8 比 < 1), 乾乳期では CD4⁺T 細胞優位 (同比 > 1) であることが判明し, CD4/CD8 比の変動は乾乳導入後の増加と分娩直前の減少が顕著であった。また, 泌乳期の MGS の優位な T 細胞サブセットである CD8⁺T 細胞の多くは ACT2 分子を発現するユニークなサブセットであること, 3 カラーのフローサイトメトリーにより CD2⁺CD4⁻CD8⁻細胞が存在することを初めて明らかにした。後者のサブセットは泌乳期に多く存在し, 大部分が ACT2 と TCR $\gamma\delta$ 鎖を発現することが確認された。さらに, 泌乳期の MGS-T 細胞のサブセット構成が, 消化管上皮間 (i-IE) T 細胞と非常に類似することが証明された。

次に, 泌乳期と乾乳期の MGS から各 T 細胞サブセットを MACS 磁気細胞分離法で単離し, サイトカインと細胞表面分子の mRNA 発現が解析された。CD4⁺T 細胞は泌乳期では IL-2, IFN- γ , TGF- β の mRNA を, 乾乳期では IL-2, IL-4, GM-CSF, IFN- γ , TGF- β , TNF- α , CD40L, FasL, IL-2R を発現し, 発現量は全て泌乳期より乾乳期の方が有意に高かった。一方, CD8⁺T 細胞は泌乳期と乾乳期で発現した mRNA のプロファイルは大きく異なった。IFN- γ , IL-2, FasL, IL-2R の発現量は泌乳期より乾乳期の方が有意に高く, GM-CSF, TGF- β , TNF- α , *c-kit* の発現量は乾乳期より泌乳期の方が高く, TGF- β と *c-kit* で有意差が認められた。*c-kit* mRNA は泌乳期の CD8⁺T 細胞で, IL-4 と CD40L の mRNA は乾乳期の CD4⁺T 細胞でのみ発現した。一方, 泌乳期 MGS の $\gamma\delta$ T 細胞と ACT2⁺T 細胞の mRNA 発現のプロファイルが同期の CD8⁺T 細胞と非常に類似した。 $\gamma\delta$ T 細胞の TGF- β , TNF- α , *c-kit*, IL-2R mRNA の発現量は泌乳期の CD8⁺T 細胞よりも有意に高く, ACT2⁺T 細胞の *c-kit* と IL-2R mRNA の発現量は CD8⁺T 細胞より有意に高かったが $\gamma\delta$ T 細胞より低かった。以上より, MGS の T 細胞サブセットのサイトカインと細胞表面分子の mRNA 発現が明らかにされ, TGF- β , TNF- α , *c-kit*, IL-2R の mRNA の発現量は $\gamma\delta$ T 細胞 > ACT2⁺T 細胞 > 泌乳期 CD8⁺T 細胞であることが示された。

本研究は, 乳腺の免疫系, 特に, T 細胞サブセットの構成と機能は泌乳期と乾乳期で大きく異なることを証明した。乾乳期の T 細胞は高応答性で, 泌乳期の T 細胞は低応答性であった。泌乳期の低応答性は *c-kit* レセプターを介して活性化した $\gamma\delta$ T 細胞が産生する TGF- β により, 過剰な免疫応答が抑制されるためと解釈された。また, 泌乳期乳腺の $\gamma\delta$ T 細胞は消化管粘膜免疫のように, 乳腺上皮細胞と密接な連携のもとで独立した防御機構を構築することが指摘された。以上のように, 本研究では乳腺免疫制御に関する T 細胞機能に関する多くの新知見と新しい見解が示された。このことは, 乳腺の生体防御機構の解明に役立ち, 乳牛で深刻化している乳房炎の防除ならびに治療法の開発に貢献するものであり, 高く評価される。よって, 審査員一同は, これを博士 (農学) の学位授与に値するものと判断した。