

たなか さち

氏名（本籍地） 田中沙智

学位の種類 博士（農学）

学位記番号 農博第964号

学位授与年月日 平成21年3月25日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項

研究科，専攻 東北大学大学院（博士課程）農学研究科応用生命科学専攻

論文題目 ウシ $\gamma\delta$ T細胞サブセットの性状と活性化機構

博士論文審査委員（主査）教授 山口高弘

教授 豊水正昭

准教授 麻生久

准教授 米山裕

准教授 北澤春樹

論文内容要旨

第一章 緒言

胸腺に移入する骨髄由来の造血幹細胞は T 細胞に分化する。胸腺で分化した T 細胞は末梢血から二次リンパ組織であるリンパ節や脾臓に移行する。成熟した T 細胞は、リンパ組織で抗原刺激などによって活性化、ならびに増殖し、免疫応答に与る。

T 細胞は受容体によって、 $\alpha\beta$ T 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞に大別される。 $\alpha\beta$ T 細胞には、CD4 を発現するヘルパー T 細胞と CD8 を発現するキラー T 細胞が存在する。ヘルパー T 細胞はサイトカインを産生して B 細胞の抗体産生を促し、またキラー T 細胞やマクロファージの細胞傷害活性を増強する。キラー T 細胞はウイルスや細菌感染した細胞を殺傷する細胞傷害活性を有する。 γ 鎖と δ 鎖の T 細胞受容体を持つ $\gamma\delta$ T 細胞は、ヒトやマウスの血中での割合は 5~10% であるが、粘膜部位では T 細胞の約半分を占め、外来抗原を認識して病原体を排除するなどの初期の免疫応答を行うことから、自然免疫においても機能を発揮する T 細胞として注目されている。

ウシ $\gamma\delta$ T 細胞は、Workshop Cluster 1 (WC1) と CD8 の発現パターンによって、WC1⁺CD8⁻ $\gamma\delta$ T 細胞、WC1⁻CD8⁺ $\gamma\delta$ T 細胞 (CD8⁺ $\gamma\delta$ T 細胞) と WC1⁻CD8⁻ $\gamma\delta$ T 細胞の 3 サブセットに分類され、WC1 と CD8 を両方とも発現する $\gamma\delta$ T 細胞は存在しない (図 1)。WC1 分子とは、215kDa の膜糖タンパク質であり、ウシの $\gamma\delta$ T 細胞でのみ発現し、ヒトやマウスの T 細胞では認められない。機能的には、WC1 は細胞周期を促進させる転写因子の発現とその DNA への結合を促進させることで $\gamma\delta$ T 細胞の増殖を促進させることが知られている。WC1⁺ $\gamma\delta$ T 細胞はレプトスピラ菌やマイコバクテリア菌などの感染病原体を認識して活性化し、そして増殖する。また、マイクロアレイ解析では、WC1⁺ $\gamma\delta$ T 細胞が WC1⁻ $\gamma\delta$ T 細胞より細胞増殖に関連する遺伝子の発現が高いことが明らかにされている。WC1⁺ $\gamma\delta$ T 細胞は、仔ウシの末梢血中に非常に高い割合で存在することから、幼若期のウシの免疫機能の恒常性の維持に重要な役割を持つと考えられて

いる。一方、CD8⁺γδT 細胞は脾臓や粘膜組織に多く存在するが、その機能は十分に理解されていない。以上のことから、WC1 分子の発現の有無が、ウシγδT 細胞サブセットの機能に深く関与することが予測される。しかしながら、ウシγδT 細胞サブセットの分化や存在様式、ならびに活性化に伴う機能の詳細は理解されていない。

本研究では、1) 末梢血γδT 細胞サブセットの出現割合と形態ならびに機能特性、2) 免疫系組織におけるγδT 細胞サブセットの局在と機能特性、3) γδT 細胞サブセットの活性化に伴う機能的特徴、4) 活性化γδT 細胞サブセットにおける IL-2 シグナル伝達機構を明らかにすることを目的とした。本研究により、γδT 細胞サブセットの性状と活性化機構が究明され、これらサブセットの生体での役割が明らかにされる。

第2章 末梢血γδT 細胞サブセットの出現割合と形態ならびに機能特性

ウシの末梢血に存在する WC1⁺γδT 細胞は成長に伴って割合が低下し、増殖活性を持つことが知られている。一方、CD8⁺γδT 細胞については成長に伴う変動パターンは不明であり、末梢血中ではアポトーシス誘導遺伝子の発現が高いことが知られている。このように、ウシ末梢血中のγδT 細胞サブセットの機能的特徴は十分に理解されていない。本章では、末梢血中の WC1⁺γδT 細胞と WC1⁻γδT 細胞の存在割合と、形態ならびに機能特性を解析した。

黒毛和種牛の末梢血γδT 細胞サブセットの割合をフローサイトメーターで解析したところ、WC1⁺γδT 細胞の割合は、成長に伴って有意に減少したが、CD8⁺γδT 細胞の割合は、成長に伴う変動はなく、一定して低い割合であった(図 2)。このことから、成長に伴うγδT 細胞の割合の低下は、主に WC1⁺γδT 細胞の減少に起因することが示された。また、CD4⁺T 細胞は成長に伴って増加したが、CD8⁺T 細胞の割合には変動が見られなかった。

γδT 細胞サブセットを Magnetic cell sorting (MACS) 法により、WC1⁺γδT

細胞と WC1⁻γδT 細胞を調整し、形態学的に解析した。透過電子顕微鏡 (TEM) による微細構造の観察では、WC1⁺γδT 細胞は比較的大きく、核が多形化するものが認められ、ユークロマチンが多く、細胞小器官の発達が認められた。一方、WC1⁻γδT 細胞は比較的小さく、核は円形をしており、細胞質の発達は乏しかった (図 3)。しかしながら、ギムザ染色による光学顕微鏡観察では、WC1⁺γδT 細胞と WC1⁻γδT 細胞間で大きな違いは見られなかった。

末梢血γδT 細胞サブセットの機能特性を解析するため、ConA 刺激下で 24 時間培養を行い、フローサイトメトリーで活性化マーカー (IL-2Rα) の発現を解析した。その結果、WC1⁺γδT 細胞は IL-2Rα の発現が高く、ConA 刺激によってさらに活性化されることが判明した。一方、WC1⁻γδT 細胞は ConA 刺激ではほとんど活性化されなかった (図 4)。

次に、MACS 法によって分離した WC1⁺γδT 細胞と WC1⁻γδT 細胞を ConA 刺激下で 12 時間培養を行い、RT-PCR 法によりサイトカイン mRNA 発現を解析した。その結果、WC1⁺γδT 細胞は、IL-2、IL-6、GM-CSF、IFN-γ、TNF-α、TNF-β、TGF-β の mRNA を発現した。一方、WC1⁻γδT 細胞は ConA 刺激の有無に関わらず TGF-β mRNA のみの発現で、その他のサイトカイン mRNA 発現は認められなかった (図 5)。上記の ConA 刺激による WC1⁺γδT 細胞と WC1⁻γδT 細胞の反応性の違いが、細胞に対する ConA の結合性によるものかを明らかにするために、MACS 法で調整した WC1⁺γδT 細胞と WC1⁻γδT 細胞に、FITC 標識の Concanavalin A (ConA) を添加して 12 時間後、ConA の結合能を測定した。その結果、ConA に結合した細胞は、WC1⁺γδT 細胞では 25.3% であり、WC1⁻γδT 細胞では 7.9% であった (図 6)。このことより、末梢血γδT 細胞サブセットの細胞表面の糖鎖構造は発現が異なることが示された。

さらに、WC1⁺γδT 細胞と WC1⁻γδT 細胞を ConA 刺激下で 12 時間培養を行い、アポトーシス関連遺伝子の発現について解析した。アポトーシス抑制遺伝子である Bcl-xL と Bcl-2 の mRNA 発現は、WC1⁺γδT 細胞で発現し、WC1⁻γδT

細胞では発現しなかった (図 7)。一方、アポトーシス誘導遺伝子である Caspase-3 と Caspase-8 の mRNA 発現は、WC1⁺γδT 細胞と WC1⁻γδT 細胞の無刺激区と ConA 刺激区で共に発現した (図 7)。以上のことから、WC1⁺γδT 細胞と WC1⁻γδT 細胞ではアポトーシスは誘導されるが、WC1⁺γδT 細胞では WC1⁻γδT 細胞とは異なりアポトーシスの抑制機構が作用することが示された。

本章において、ウシ末梢血の WC1⁺γδT 細胞は活性化状態で機能的であったが WC1⁻γδT 細胞は不活性化状態であること、ConA の結合性が異なることが示された。これらの結果より、末梢血中のγδT 細胞は WC1 分子発現の有無により機能が異なることが判明した。

第3章 リンパ組織におけるγδT 細胞サブセットの局在と機能特性

前章において末梢血中のγδT 細胞サブセットは、活性化の状態が異なることが示された。しかしながら、γδT 細胞サブセットがリンパ組織に移行後の活性化状態については十分に理解されていない。本章では、ウシの胸腺、リンパ節、脾臓でのγδT 細胞サブセットの存在割合と局在を明らかにし、組織に移行した WC1⁺γδT 細胞と WC1⁻γδT 細胞の機能的特性を解析した。

胸腺と脾臓ではγδT 細胞の出現割合は末梢血とほぼ同程度であったが、γδT 細胞サブセットの割合は末梢血とは異なり、WC1⁺γδT 細胞よりも CD8⁺γδT 細胞が多く存在した。リンパ節では、γδT 細胞の割合は最も少なく、WC1⁺γδT 細胞は CD8⁺γδT 細胞と同様に少ない割合で存在した (図 8)。免疫組織化学的染色により、胸腺でのγδT 細胞サブセットの局在は共に髄質で観察されたことから、γδT 細胞サブセットは胸腺内で分化することが示された (図 9)。リンパ節では、WC1⁺γδT 細胞はリンパ小節周囲の帽状域に、CD8⁺γδT 細胞は帽状域とリンパ小節内部に局在した (図 10)。脾臓では、WC1⁺γδT 細胞は白脾髄の周囲に、CD8⁺γδT 細胞は白脾髄の周囲と赤脾髄に局在した (図 11)。この様に、リンパ節と脾臓では、γδT 細胞サブセット間で局在に違いが認められた。

リンパ節へのホーミングレセプターである接着分子 (CD62L) の発現を解析したところ、末梢血とリンパ組織において、WC1⁺γδT 細胞はほぼ全ての細胞が CD62L を発現した。一方、WC1⁻γδT 細胞はリンパ節では高い割合で CD62L を発現し、その他の組織での発現割合は低かった (図 12)。リンパ組織のγδT 細胞サブセットにおける活性化マーカーの発現を解析したところ、WC1⁺γδT 細胞は末梢血と同様に活性化状態であった。一方、個体差は認められるものの、WC1⁻γδT 細胞はリンパ節、脾臓へ移行後、活性化マーカーを発現することが示された (図 13)。γδT 細胞サブセットのサイトカイン mRNA 発現に関して、リンパ節と脾臓の WC1⁺γδT 細胞と WC1⁻γδT 細胞は共に IFN-γ、TNF-α、TNF-β、TGF-β の mRNA を発現した (図 14)。また、γδT 細胞サブセットにおけるアポトーシス抑制遺伝子の発現は、WC1⁺γδT 細胞と WC1⁻γδT 細胞で共にアポトーシス抑制遺伝子である Bcl-xL と Bcl-2 の mRNA を発現した (図 15)。

以上のことから、ウシγδT 細胞サブセットは胸腺で分化し、リンパ節と脾臓では、主として T 細胞領域に局在して、免疫反応に関与することが示された。リンパ節と脾臓では、WC1⁺γδT 細胞と WC1⁻γδT 細胞は共に、活性化して機能状態であることが明らかとなった。

第 4 章 γδT 細胞サブセットの活性化に伴う機能的特徴

IL-2 は T 細胞の増殖と分化を促すサイトカインである。IL-2 はヒトやマウスの末梢血ナイーブγδT 細胞を機能的なエフェクター型のγδT 細胞に活性化させることが知られている。本章では、ウシγδT 細胞サブセットを IL-2 刺激し、その活性化に伴い組織型のエフェクター細胞に分化するかを解析した。また、活性化したγδT 細胞サブセットの機能的特徴を検討した。

末梢血単核球 (PBMC) を IL-2 (20U/ml) で 1、3、7 日間の刺激を行い、γδT 細胞サブセットの割合変化をフローサイトメーターで検討した。その結果、WC1⁺γδT 細胞は刺激 1 日目で増加し、WC1⁻γδT 細胞は刺激 3 日目で増加した

(図 16)。また、 $\gamma\delta$ T 細胞サブセットの増殖活性を PKH26 染色後、フローサイトメーターで解析したところ、IL-2 刺激をした $\gamma\delta$ T 細胞サブセットは、 $\alpha\beta$ T 細胞より増殖活性が高いことが示された。

$\gamma\delta$ T 細胞サブセットにおける IL-2R α の発現は、IL-2 刺激した1日目に WC1⁺ $\gamma\delta$ T 細胞は約 80%であるのに対し、WC1⁻ $\gamma\delta$ T 細胞は約 35%であった(図 17)。このことから、WC1⁺ $\gamma\delta$ T 細胞は IL-2 の刺激に対して WC1⁻ $\gamma\delta$ T 細胞より速やかに活性化することが示された。一方、CD62L の発現は 7 日間の IL-2 刺激により、WC1⁺ $\gamma\delta$ T 細胞は 95.5%から 43.4%に、WC1⁻ $\gamma\delta$ T 細胞では 55.5%から 38%に低下した(図 18)。したがって、IL-2 刺激により $\gamma\delta$ T 細胞サブセットが活性化すると、CD62L の発現が低下することが示された。

IL-2 刺激した $\gamma\delta$ T 細胞サブセットでのサイトカイン mRNA 発現は、WC1⁺ $\gamma\delta$ T 細胞と WC1⁻ $\gamma\delta$ T 細胞で共に、調べた全てのサイトカイン mRNA を発現した(図 19)。細胞傷害活性に関連する遺伝子発現は、WC1⁺ $\gamma\delta$ T 細胞と WC1⁻ $\gamma\delta$ T 細胞は共に、IL-2 刺激により Perforin と GranzymeB の mRNA 発現を増加させ、IL-2 の刺激の有無に関わらず、恒常的に Bo-lysin と NKp46 の mRNA を発現した(図 20)。次に、 $\gamma\delta$ T 細胞サブセットの細胞傷害活性をヒト癌細胞株である K562 細胞をターゲット細胞として測定した。WC1⁺ $\gamma\delta$ T 細胞と WC1⁻ $\gamma\delta$ T 細胞は IL-2 刺激後、共に同程度の細胞傷害活性を示した(図 21)。

以上のことから、WC1⁺ $\gamma\delta$ T 細胞と WC1⁻ $\gamma\delta$ T 細胞の多くの機能的特徴が解明され、特に IL-2 刺激により WC1⁺ $\gamma\delta$ T 細胞が速やかに活性化されること、7 日間の IL-2 刺激において、 $\gamma\delta$ T 細胞サブセットは共に組織型のエフェクタータイプに分化することが判明した。

第5章 活性化 $\gamma\delta$ T 細胞サブセットの IL-2 シグナル伝達機構

IL-2 レセプターは、 α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖の 3 つのサブユニットから構成されており、IL-2 が IL-2R β に結合すると、細胞内では転写因子である Stat5 がリン酸

化され、リン酸化 Stat5 が核内に移行して IL-2R α の転写が開始する。その結果、細胞表面の IL-2R α の発現が増加し、活性化状態となる。前章において、WC1⁺ γ δ T 細胞が WC1⁻ γ δ T 細胞より速やかに活性化されることが判明した。そのため、IL-2 シグナル伝達に関して、 γ δ T 細胞サブセット間での違いが予想される。しかしながら、IL-2 による γ δ T 細胞サブセット間での活性化に伴うシグナル伝達について現在のところ理解は得られてない。本章では、活性化に伴う WC1⁺ γ δ T 細胞と WC1⁻ γ δ T 細胞の IL-2 シグナル伝達系の相違を検討した。

MACS 法で調製した WC1⁺ γ δ T 細胞と WC1⁻ γ δ T 細胞を 0~24 時間の IL-2 刺激を行い、活性化マーカーである IL-2R α の mRNA 発現を β -actin を内部標準として半定量解析を行った。その結果、IL-2R α の mRNA は WC1⁺ γ δ T 細胞では無刺激でも発現が見られ、24 時間の IL-2 刺激によって時間依存的に発現が増加した。一方、WC1⁻ γ δ T 細胞では無刺激で発現が非常に低く、24 時間刺激後でも発現増加は認められなかった (図 22)。また、 γ δ T 細胞サブセットの IL-2R α 発現をフローサイトメトリーで解析した。その結果、WC1⁺ γ δ T 細胞では IL-2 刺激後 18 時間までに IL-2R α 発現が有意に増加したが、WC1⁻ γ δ T 細胞の有意な増加は認められなかった (図 23A)。さらに、WC1⁺ γ δ T 細胞は 2.5U/mL の低濃度の IL-2 で、IL-2R α 発現を誘導した (図 23B)。一方、 γ δ T 細胞サブセットにおける IL-2R β 、IL-2R γ の発現は、WC1⁺ γ δ T 細胞と WC1⁻ γ δ T 細胞で共に、同程度に発現した (図 24)。

最後に、IL-2R α の転写因子であるリン酸化 Stat5 の発現をフローサイトメトリーで解析した。WC1⁺ γ δ T 細胞は無刺激の状態でもリン酸化 Stat5 を発現し、IL-2 刺激 30 分後まで、常に WC1⁻ γ δ T 細胞より高い割合でリン酸化 Stat5 を発現した (図 25)。

以上のことから、IL-2 刺激の γ δ T 細胞サブセットの活性化の制御に、Stat5 のリン酸化は重要なファクターとして関与し、 γ δ T 細胞サブセットの活性化はその発現に依存することが判明した。低濃度の IL-2 刺激による速やかな WC1

$\gamma\delta$ T 細胞の活性化は Stat5 のリン酸化状態に起因することが明らかとなった。

第6章 総括

本研究において、ウシ $\gamma\delta$ T 細胞サブセットの特徴と活性化機構について、以下の新規な知見が得られた (図 26)。

- 1) 末梢血中の WC1⁺ $\gamma\delta$ T 細胞は活性化状態で機能的であり、WC1⁻ $\gamma\delta$ T 細胞は不活性化状態である。
- 2) $\gamma\delta$ T 細胞サブセットは胸腺で分化し、リンパ節と脾臓では WC1⁺ $\gamma\delta$ T 細胞と WC1⁻ $\gamma\delta$ T 細胞は共に、活性化して機能状態にある。
- 3) IL-2 刺激により、WC1⁺ $\gamma\delta$ T 細胞が速やかに活性化し、7 日間の IL-2 刺激において WC1⁺ $\gamma\delta$ T 細胞と WC1⁻ $\gamma\delta$ T 細胞は組織型のエフェクタータイプに分化する。
- 4) $\gamma\delta$ T 細胞サブセットの活性化の制御には、Stat5 のリン酸化が重要なファクターとして関与し、WC1⁺ $\gamma\delta$ T 細胞では WC1⁻ $\gamma\delta$ T 細胞より IL-2 の刺激に対して高い割合で Stat5 のリン酸化が起こる。

以上のことから、ウシ $\gamma\delta$ T 細胞サブセットは WC1 分子の発現により、機能が異なることと、二次リンパ組織においては活性化してサイトカインを産生して、抗原の排除に関与することが示唆された。また、 $\gamma\delta$ T 細胞サブセットの活性化は Stat5 のリン酸化によって制御され、WC1⁺ $\gamma\delta$ T 細胞が活性化されやすいことが判明した。本研究におけるウシ $\gamma\delta$ T 細胞サブセットの活性化と機能に関する新知見は、ウシの免疫系を理解する上で重要であり、ウシ $\gamma\delta$ T 細胞サブセットの機能を考慮したウシの感染症抵抗性や感染症予防法の開発など、今後の畜産分野の発展に大きく貢献するものと確信する。

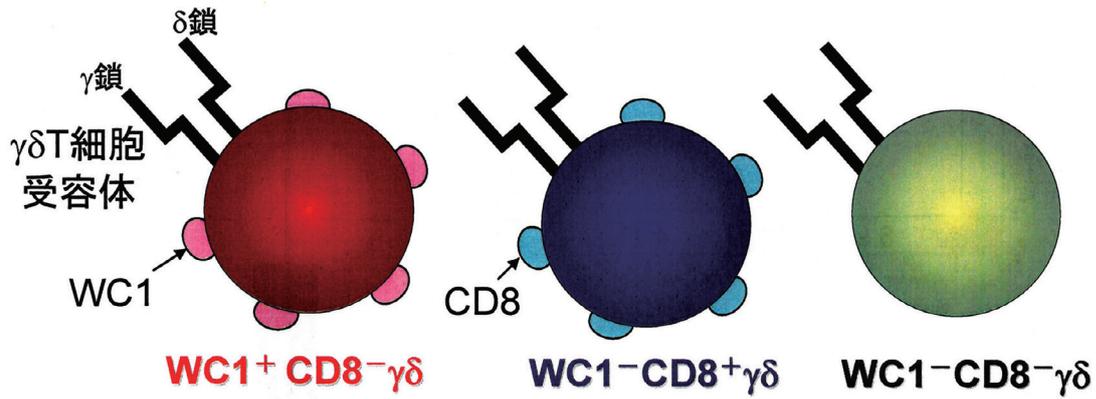


図1. ウシ $\gamma\delta$ T細胞サブセットの分類

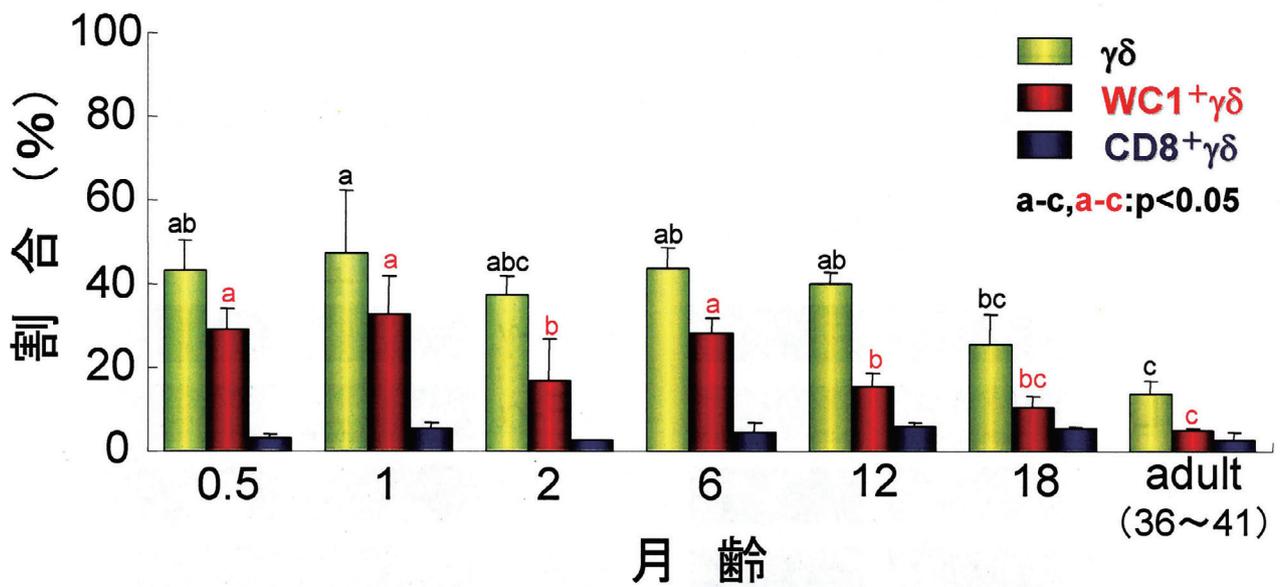


図2. 成長に伴う末梢血での $\gamma\delta$ T細胞サブセットの出現割合

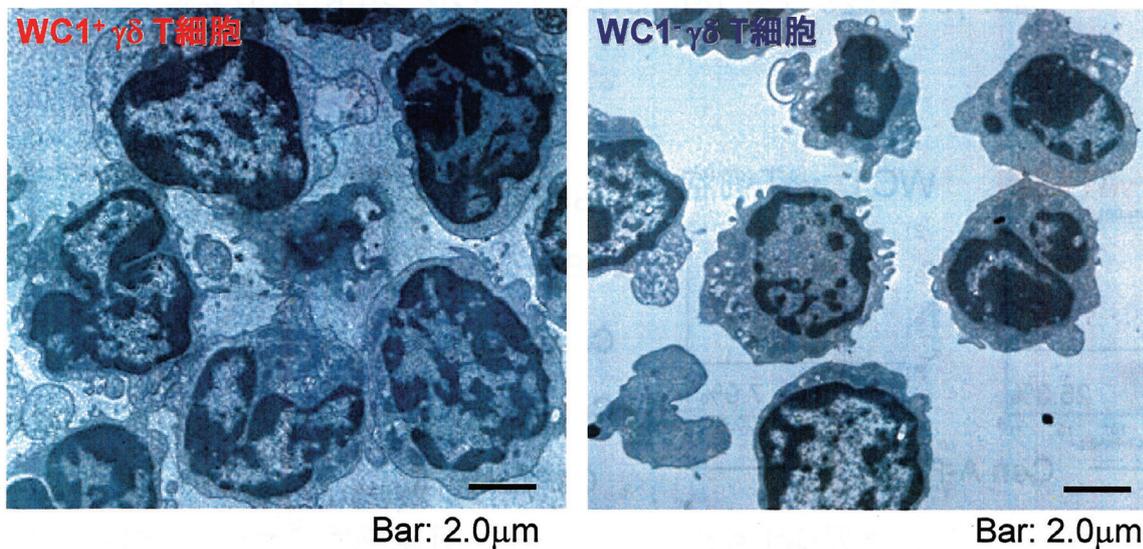


図3. $\gamma\delta$ T細胞サブセットの微細構造

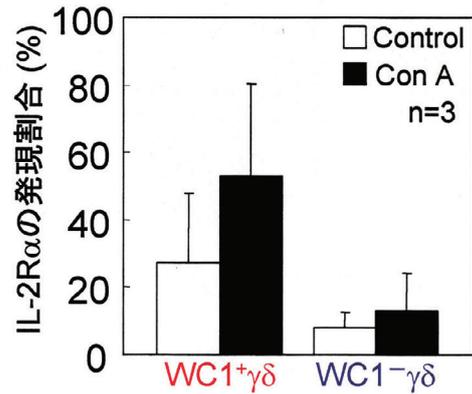
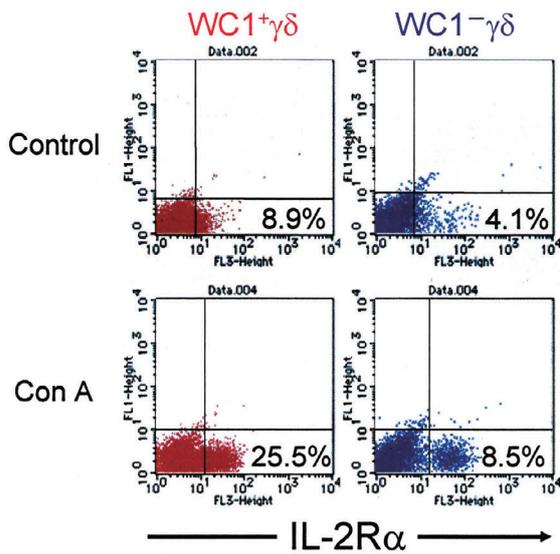


図4. $\gamma\delta$ T細胞サブセットにおける活性化マーカー(IL-2R α)の発現

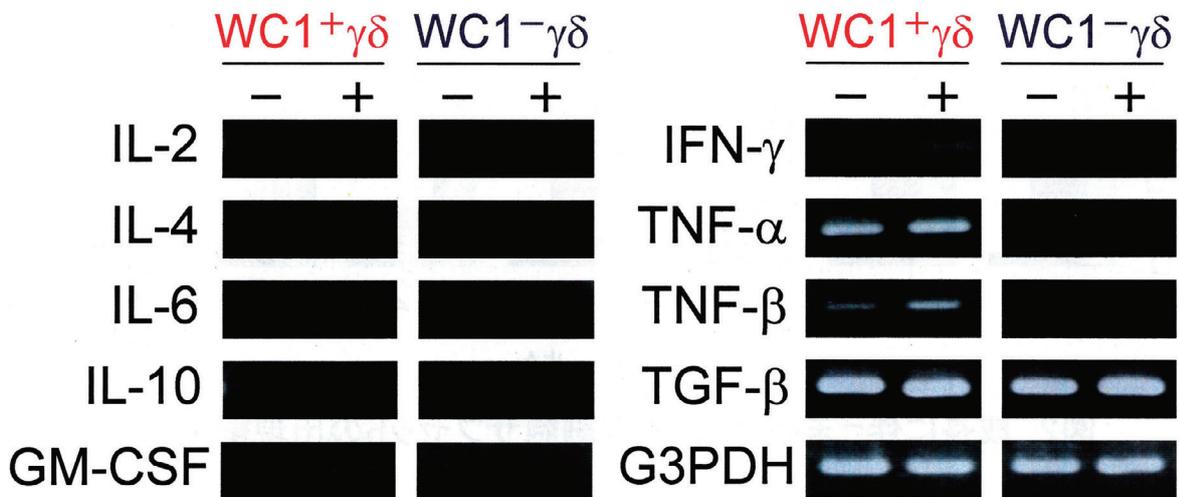


図5. $\gamma\delta$ T細胞サブセットにおけるサイトカインmRNAの発現

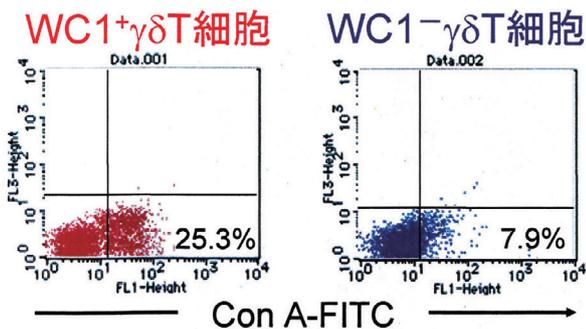


図6. $\gamma\delta$ T細胞サブセットのConAの結合能

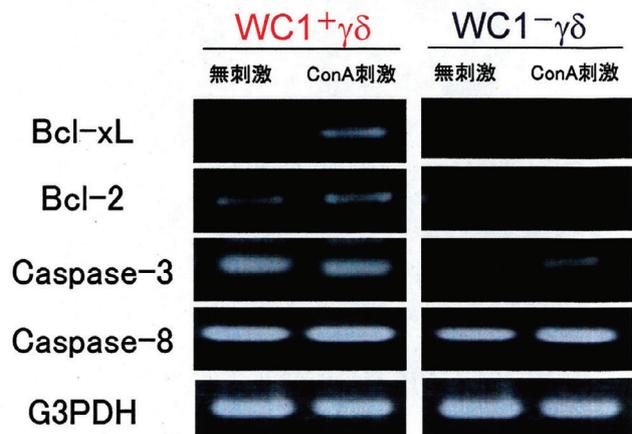


図7. $\gamma\delta$ T細胞サブセットにおけるアポトーシス関連遺伝子の発現

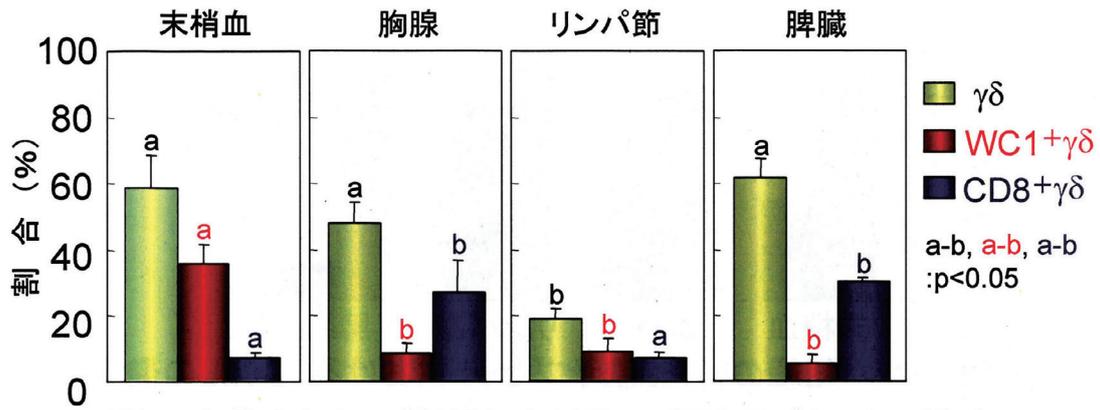


図8. 末梢血とリンパ組織における $\gamma\delta$ T細胞サブセットの構成

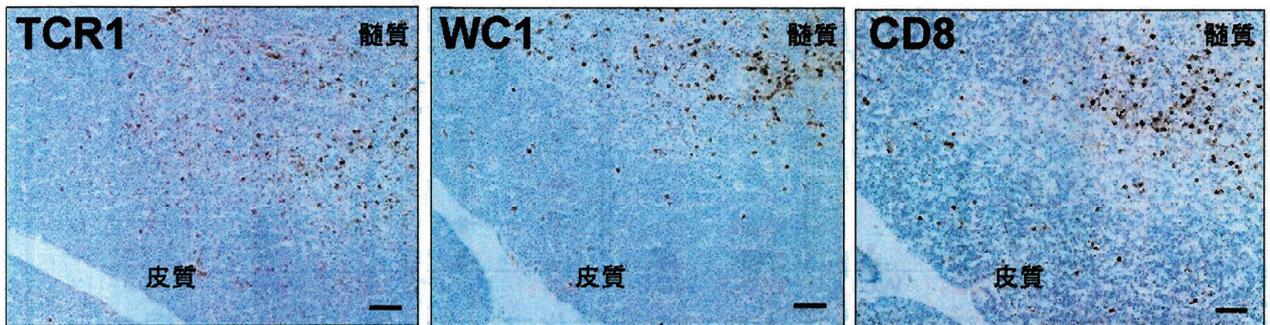


図9. 胸腺における $\gamma\delta$ T細胞サブセットの局在

bar=100 μ m

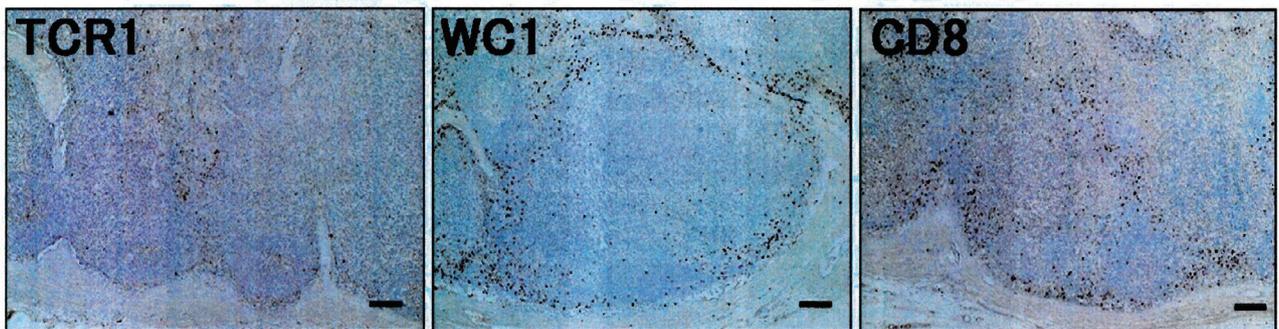


図10. リンパ節における $\gamma\delta$ T細胞サブセットの局在

bar=200 μ m

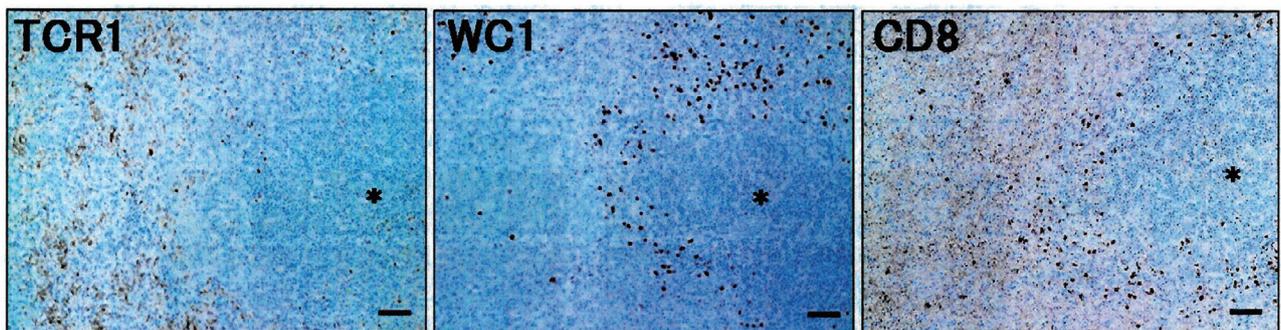


図11. 脾臓における $\gamma\delta$ T細胞サブセットの局在

* 白脾髄 bar=100 μ m

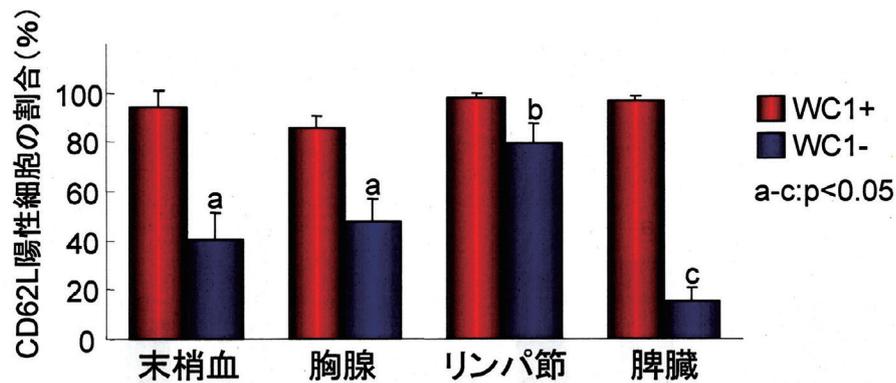


図12. リンパ組織の $\gamma\delta$ T細胞サブセットにおけるCD62Lの発現

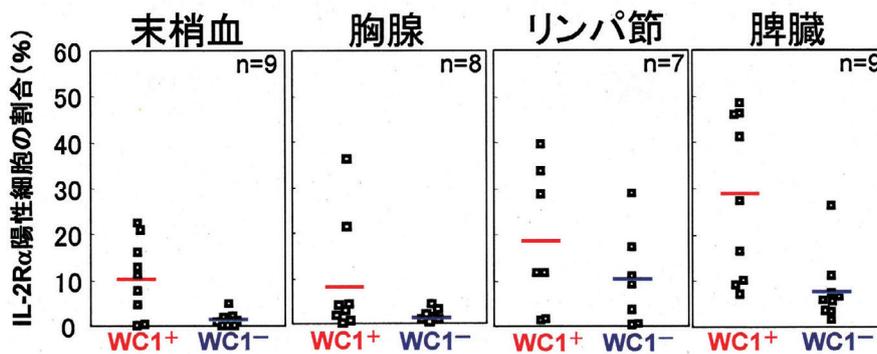


図13. 組織の $\gamma\delta$ T細胞サブセットでの活性化マーカー(IL-2R α)の発現

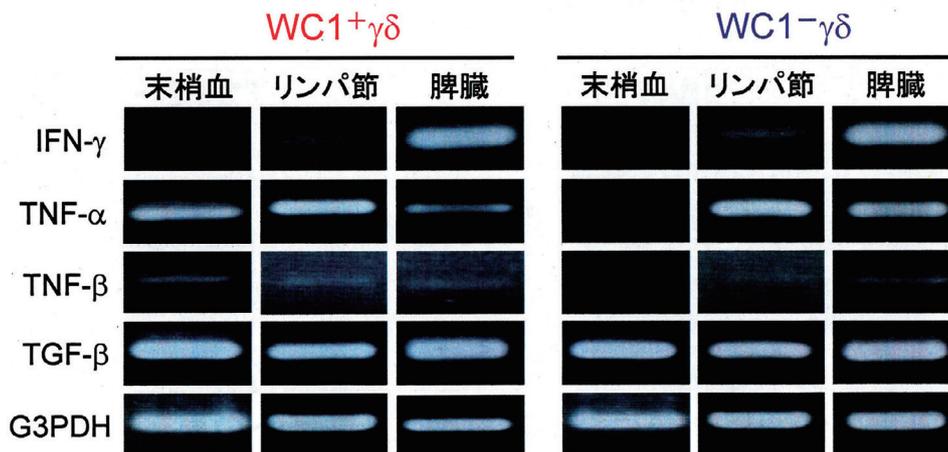


図14. リンパ節、脾臓の $\gamma\delta$ T細胞サブセットにおけるサイトカインmRNAの発現

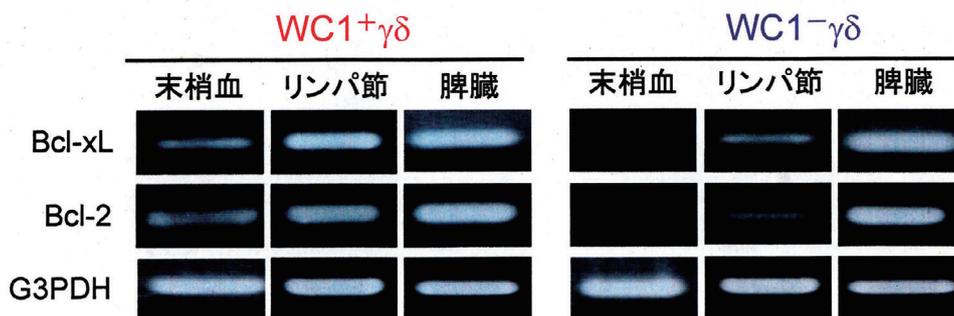


図15. リンパ節、脾臓の $\gamma\delta$ T細胞サブセットにおけるアポトーシス抑制遺伝子の発現

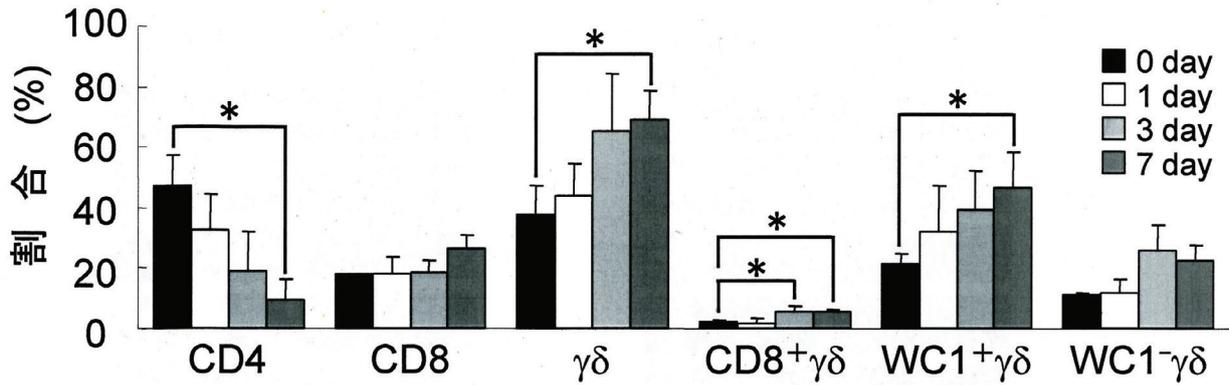


図16. IL-2刺激による $\gamma\delta$ T細胞サブセットの誘導

n=3 * : p<0.05

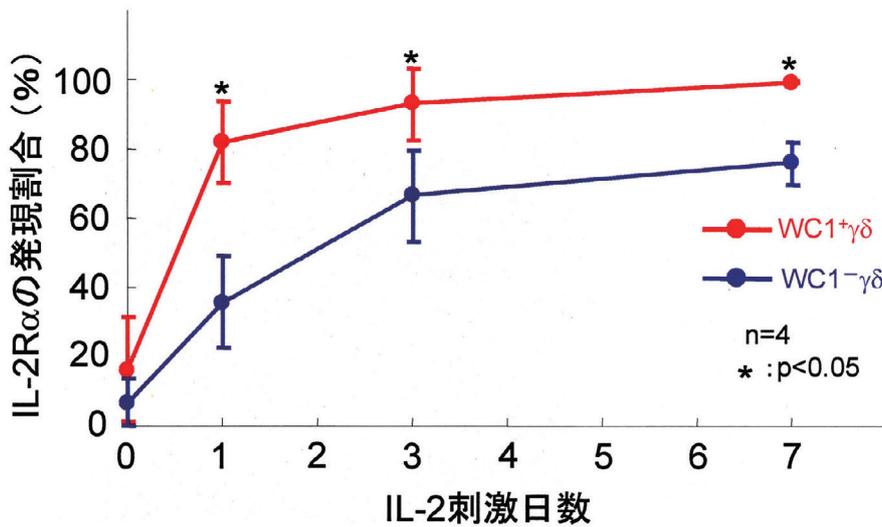


図17. IL-2刺激した $\gamma\delta$ T細胞サブセットにおける活性化マーカーの発現

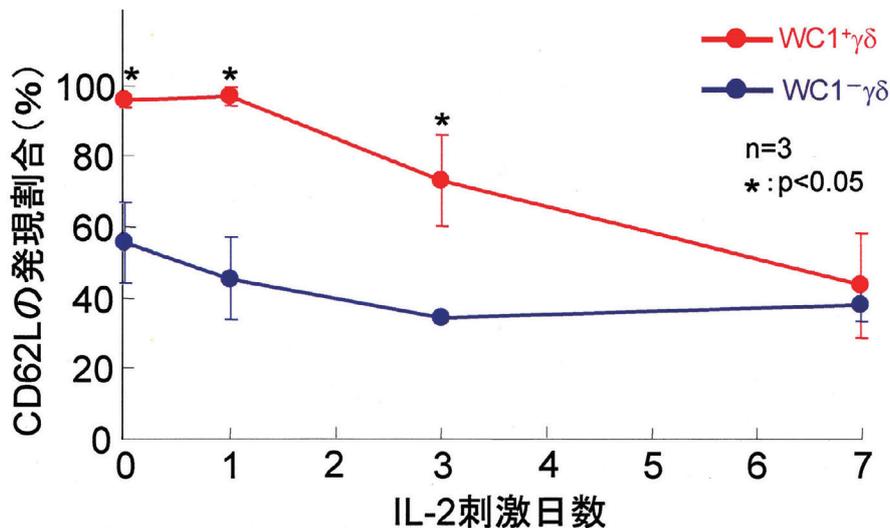


図18. IL-2刺激した $\gamma\delta$ T細胞サブセットにおけるCD62Lの発現

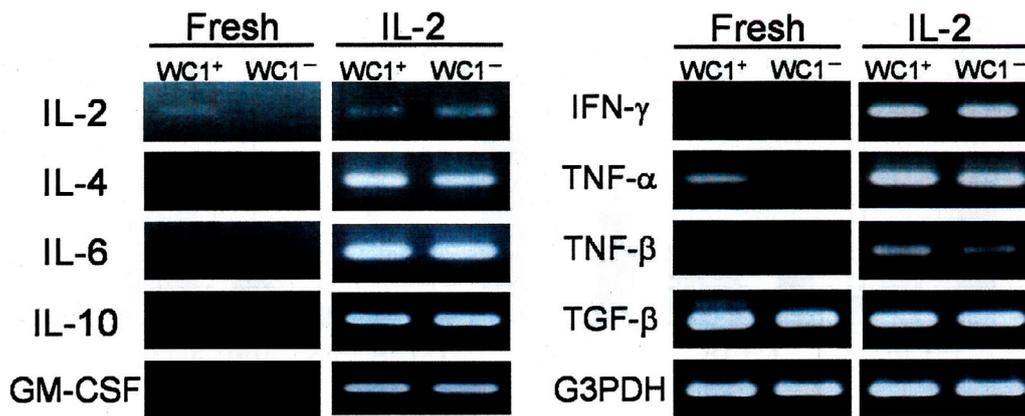


図19. IL-2刺激した $\gamma\delta$ T細胞サブセットにおけるサイトカインmRNA発現

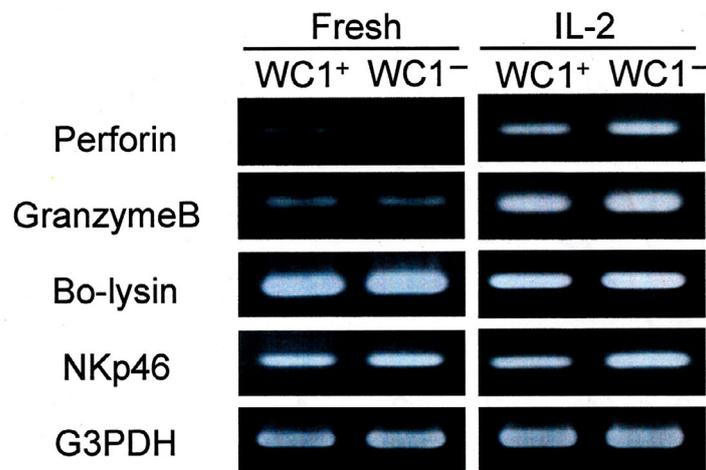


図20. IL-2刺激した $\gamma\delta$ T細胞サブセットにおける細胞傷害活性関連の遺伝子発現

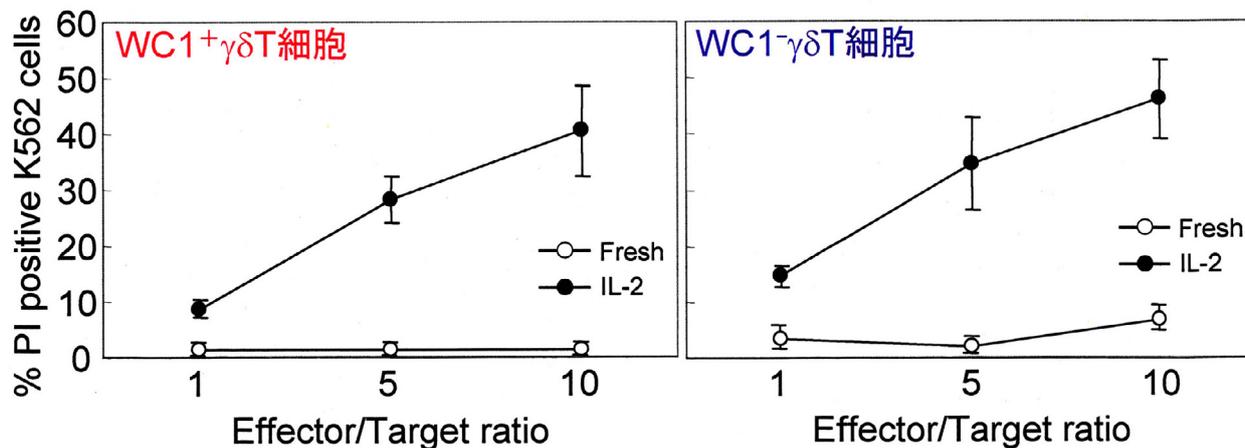


図21. IL-2刺激した $\gamma\delta$ T細胞サブセットにおける細胞傷害活性

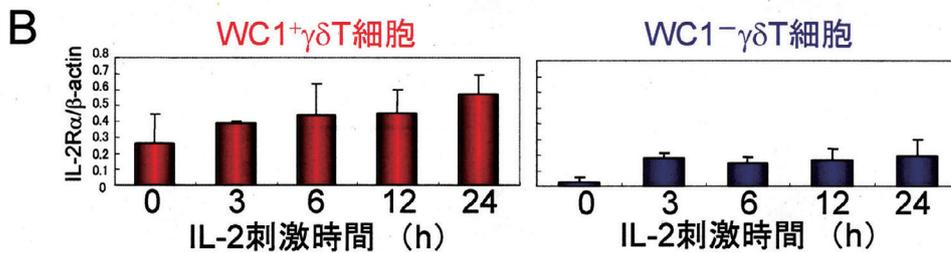
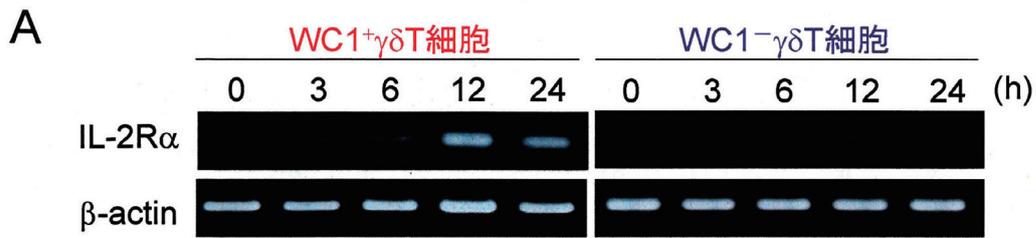


図22. IL-2刺激したγδT細胞サブセットにおけるIL-2RαのmRNA発現

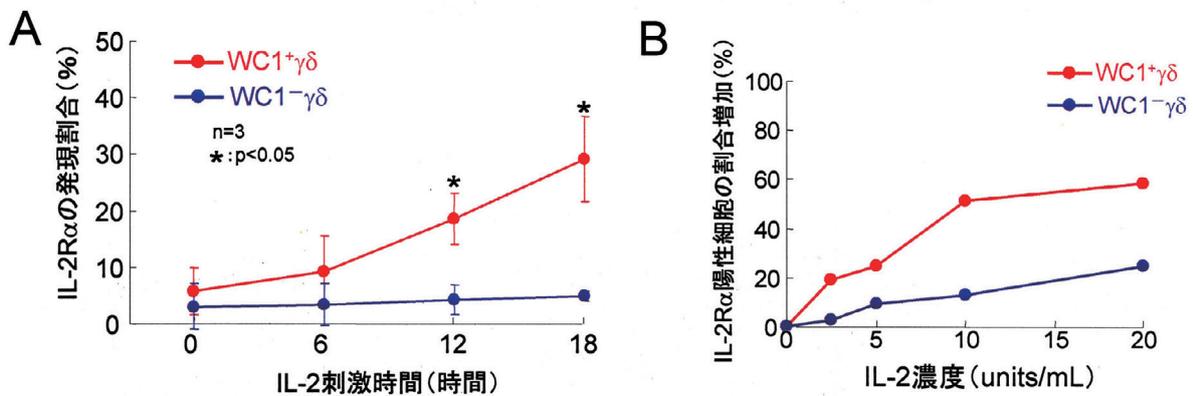


図23. IL-2刺激したγδT細胞サブセットでのIL-2Rαの発現

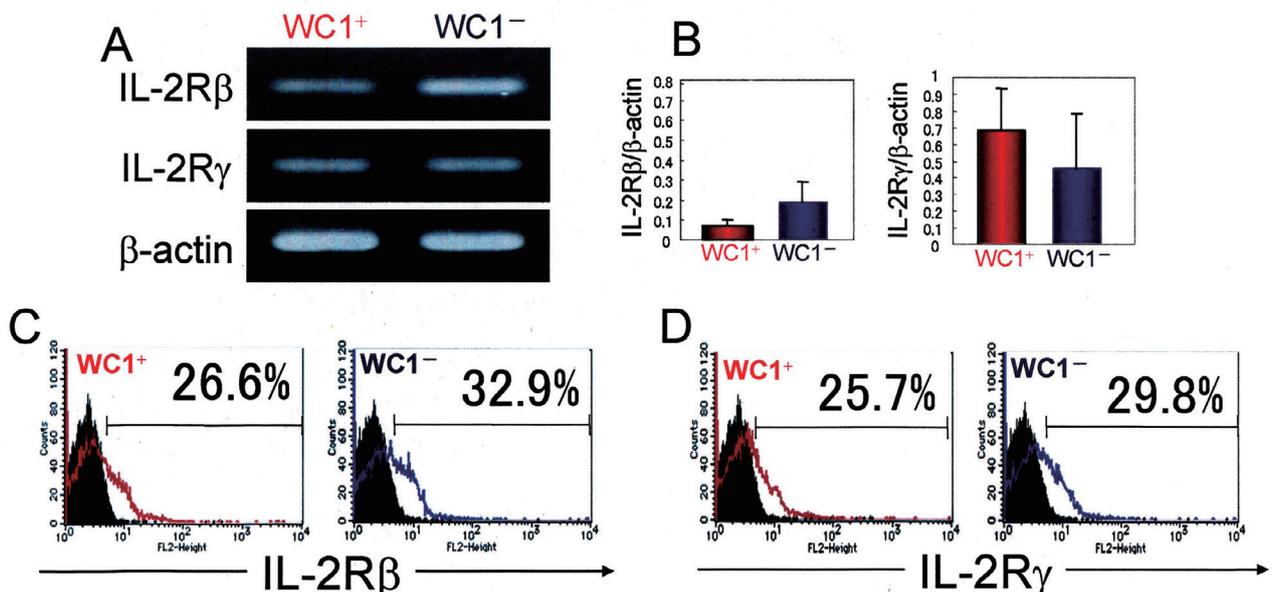


図24. γδT細胞サブセットにおけるIL-2RβとIL-2Rγの発現

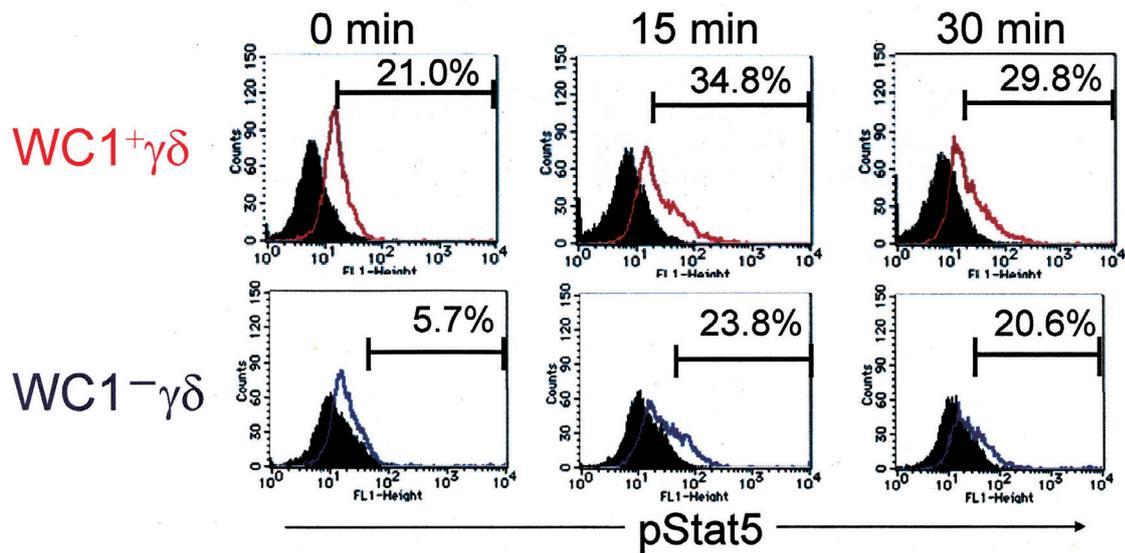


図25. $\gamma\delta$ T細胞サブセットにおけるリン酸化Stat5の発現

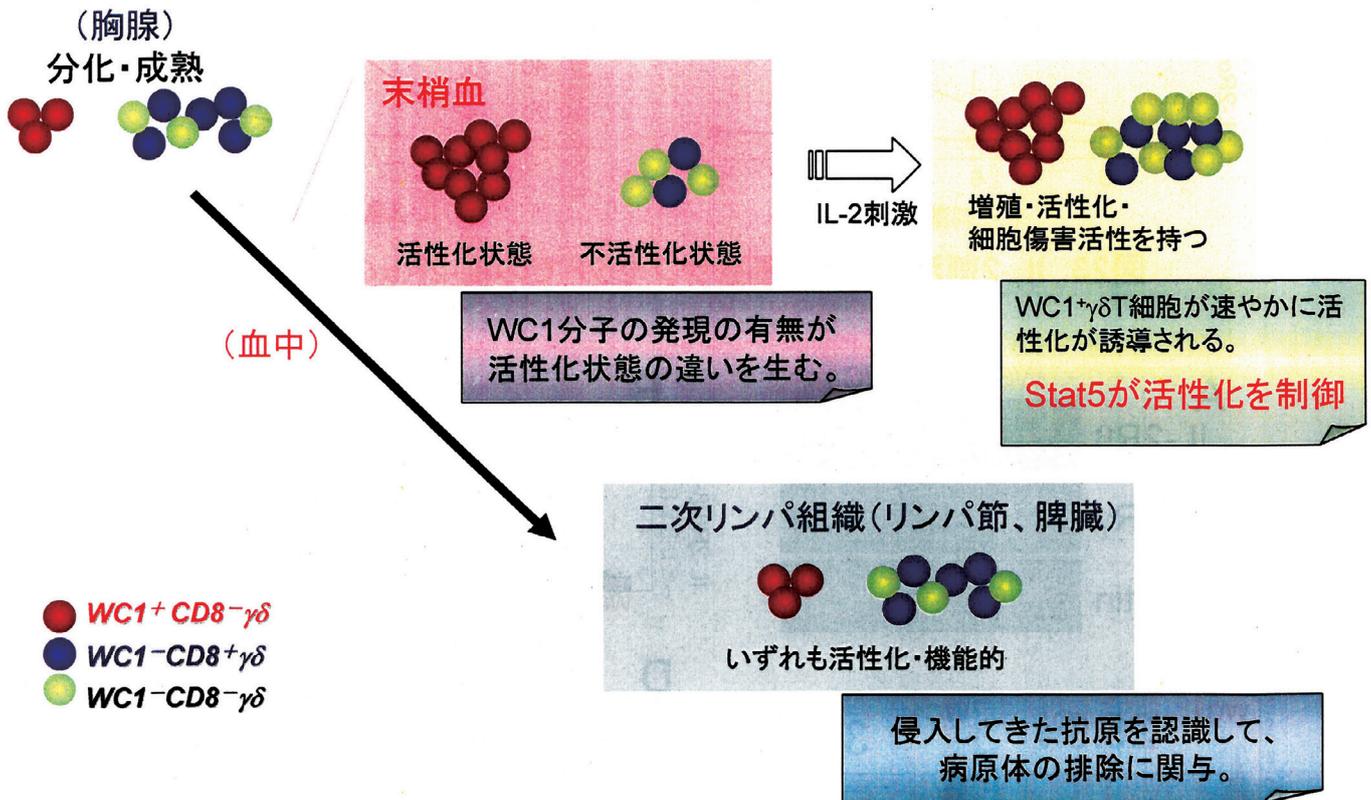


図26. ウシ $\gamma\delta$ T細胞サブセットの活性化メカニズム

論文審査結果要旨

ウシ $\gamma\delta$ T細胞は、Workshop Cluster 1 (WC1) と CD8 の発現パターンによって、WC1⁺CD8⁻ $\gamma\delta$ T細胞、WC1⁻CD8⁺ $\gamma\delta$ T細胞と WC1⁻CD8⁻ $\gamma\delta$ T細胞のサブセットに分類される。WC1分子は、215kDaの膜糖タンパク質であり、ウシの $\gamma\delta$ T細胞でのみ発現する。ウシ $\gamma\delta$ T細胞サブセットの機能に WC1分子の発現が深く関与すると想定されるが、その分化や存在様式ならびに活性化に伴う機能は理解されていない。本研究では、ウシの 1) 末梢血 $\gamma\delta$ T細胞サブセットの出現割合、形態ならびに機能特性、2) リンパ組織での $\gamma\delta$ T細胞サブセットの局在と機能特性、3) $\gamma\delta$ T細胞サブセットの活性化に伴う機能的特徴、4) 活性化 $\gamma\delta$ T細胞サブセットの IL-2 シグナル伝達機構の解明を目的とした。

初めに、末梢血中の $\gamma\delta$ T細胞サブセットの存在割合、形態ならびに機能特性を解析したところ、WC1⁺ $\gamma\delta$ T細胞の割合は、成長に伴い有意に低下した。透過電子顕微鏡の観察により、WC1⁺ $\gamma\delta$ T細胞は比較的大型で核が多形で細胞小器官が発達し、WC1⁻ $\gamma\delta$ T細胞は比較的小型で核が円形で細胞質の発達が乏しいことが半明した。T細胞を活性化する Concanavalin A (ConA) の結合能は、WC1⁺ $\gamma\delta$ T細胞の方が WC1⁻ $\gamma\delta$ T細胞より有意に高く、WC1⁺ $\gamma\delta$ T細胞は ConA の刺激によって活性化マーカー (IL-2R α) とサイトカイン mRNA の発現が増加したが、WC1⁻ $\gamma\delta$ T細胞ではこれらの発現増加は認められなかった。さらに、アポトーシスの抑制遺伝子である Bcl-xL と Bcl-2 の発現は、WC1⁺ $\gamma\delta$ T細胞でのみ発現した。以上から、ウシ末梢血の WC1⁺ $\gamma\delta$ T細胞は活性化状態で、アポトーシスの抑制が機能していること、WC1⁻ $\gamma\delta$ T細胞は不活性化状態であることが明らかになった。

次に、リンパ組織でのウシ $\gamma\delta$ T細胞サブセットの挙動と特性を解析したところ、胸腺と脾臓では、CD8⁺ $\gamma\delta$ T細胞が WC1⁺ $\gamma\delta$ T細胞より高い割合であったが、リンパ節では、WC1⁺と CD8⁺ $\gamma\delta$ T細胞はほぼ同じ割合で存在した。また、リンパ節と脾臓では、CD8⁺ $\gamma\delta$ T細胞が WC1⁺ $\gamma\delta$ T細胞より広範囲に分布し、胸腺では、 $\gamma\delta$ T細胞サブセットは共に髄質に局在した。リンパ節へのホーミングレセプターである接着分子 (CD62L) の発現を解析したところ、リンパ組織に存在するほとんど全ての WC1⁺ $\gamma\delta$ T細胞が CD62L を発現したが、WC1⁻ $\gamma\delta$ T細胞はリンパ節でのみ高い割合で発現した。リンパ節と脾臓の WC1⁺ $\gamma\delta$ T細胞と WC1⁻ $\gamma\delta$ T細胞は、IL-2R α とサイトカイン mRNA、アポトーシス抑制遺伝子を発現した。以上から、ウシ $\gamma\delta$ T細胞サブセットは胸腺で分化し、リンパ節と脾臓で主に T細胞領域に局在して、免疫反応に関与することが示された。

$\gamma\delta$ T細胞サブセットの活性化に伴う機能的特徴を解析したところ、WC1⁺ $\gamma\delta$ T細胞は IL-2 の刺激によって WC1⁻ $\gamma\delta$ T細胞より速やかに IL-2R α の発現を増加させ、CD62L の発現は、WC1⁺と WC1⁻ $\gamma\delta$ T細胞で共に有意に減少した。また、IL-2 刺激した WC1⁺ $\gamma\delta$ T細胞と WC1⁻ $\gamma\delta$ T細胞は、共に調べた全てのサイトカインを発現し、同程度の細胞傷害活性を示した。以上から、IL-2 刺激により WC1⁺ $\gamma\delta$ T細胞が速やかに活性化されること、7日間の刺激において、 $\gamma\delta$ T細胞サブセットは共に組織型のエフェクタータイプに分化することが半明した。

活性化 $\gamma\delta$ T細胞サブセットの IL-2 シグナル伝達機構に関して、IL-2 刺激下での IL-2R α の mRNA と細胞表面の IL-2R α 発現は、WC1⁺ $\gamma\delta$ T細胞では有意に増加したが、WC1⁻ $\gamma\delta$ T細胞では増加しなかった。また、WC1⁺ $\gamma\delta$ T細胞は低濃度の IL-2 で有意に IL-2R α 発現を誘導した。一方、 $\gamma\delta$ T細胞サブセットにおける IL-2R β 、IL-2R γ の発現に違いは認められなかった。IL-2R α の転写因子である Stat5 の発現を解析したところ、WC1⁺ $\gamma\delta$ T細胞は WC1⁻ $\gamma\delta$ T細胞より常に高い割合でリン酸化 Stat5 を発現した。以上から、IL-2 刺激の $\gamma\delta$ T細胞サブセットの活性化の制御に、Stat5 は重要なファクターとして関与し、 $\gamma\delta$ T細胞サブセットの活性化はその発現に依存することが半明した。

以上、本論文は、ウシ $\gamma\delta$ T細胞サブセットの性状と活性化機構に関して、多くの新見を得た。こ

のことは、ウシの免疫学の研究展開に大きく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）の学位を授与するに値するものと判定した。