

論文内容要旨

生体防御機構の中で重要な位置をしめる免疫応答を司るリンパ球には、その表面マーカーと機能から2種類のリンパ球が存在する。一つは抗体産生細胞の前駆細胞であるBリンパ球で、もう一つは胸腺由来のTリンパ球である。Tリンパ球は、細胞内寄生性細菌、ウイルスの排除、移植片の拒絶、癌細胞に対する免疫応答といった細胞性免疫において特に重要な機能を発揮する。もちろん、体液性免疫においてもBリンパ球を抗体産生細胞へと分化させるのにTリンパ球は欠かせない。Tリンパ球は骨髓由来の幹細胞が胸腺内で複雑かつ巧妙な機構で分化、自己寛容と自己主要組織適合抗原(MHC)拘束性を身に付けたクローンのみが末梢へと流出してくる。末梢リンパ組織に定着したリンパ球は、そこで外来抗原と出会い複雑な免疫応答を制御したリンパ球自身が機能したりするわけである。本論文では、特に次の二点に注目して研究を行った。一つはT細胞活性化又は癌細胞破壊における細胞表面上の補助分子の役割についてであり、もう一つは、T細胞不全の新しい動物モデルを用いたT細胞の特性の解析である。

抗腫瘍免疫におけるT細胞の重要性はBurnetの免疫学的監視の概念より明らかである。癌の免疫療法を考えると、癌特異的キラー細胞の養子免疫療法は一つの魅力的な療法である。近年の分子生物学の急速な進歩により、純化されたサイトカインの大量供給が可能となり、この療法の実現の可能性を大きくした。インターロイキン2(IL-2)は、当初T細胞増殖因子として発見されたが、その後、その機能が多岐にわたることが判明してきた。その機能の中でも、種々の癌細胞に対して細胞障害活性を示すlymphokine-activated killer(LAK)細胞を誘導し得る点が注目された。LAK細胞は誘導が簡単で、正常細胞には何等障害を与えず、癌細胞のみを障害することから、養子免疫療法に好適なキラー細胞であると言える。LAK細胞を臨床応用する前に、LAK細胞の特性の詳細な解析が必要になろう。

筆者らはすでに、正常マウス脾細胞、ヌードマウス脾細胞、腫瘍内浸潤リンパ球等からLAK細胞が誘導されることや、これらのLAK細胞やその前駆細胞の性状について明らかにしてきた。本論文ではまず胸腺細胞から誘導されるLAK細胞及びその前駆細胞の性状について検討した。

通常、胸腺細胞は大部分が免疫不適格細胞であるため、IL-2等にはほとんど反応しないが、hydrocortisone(HC)を投与すると比較的選択的に免疫不適格な細胞を消去するので、IL-2に対する反応性を獲得する。そこで、HC抵抗性胸腺細胞を用いてLAK細胞の誘導を試みたところ、recombinant IL-2との培養によって種々の癌細胞に対して細胞障害活性を示すLAK細胞が誘導された。この細胞障害活性を有する細胞のphenotypeを抗体と補体の処理にて検討したところ、Thy1⁺ Ly-2⁺ asialo GM1⁻の細胞であった。IL-2にて刺激したHC抵抗性胸腺細胞をPercoll不連続密度勾配遠心法にて比重により分画したところ、標的癌細胞に対する結合能と細

胞障害活性は低比重で大きい細胞群のほうに濃縮されていた。LAK 前駆細胞の頻度について限界希釈法にて検討したところ、未処理胸腺細胞に比べて HC 抵抗性胸腺細胞の方が 7.5 倍に濃縮されていた。胸腺内の LAK 前駆細胞の phenotype を探るために HC 抵抗性胸腺細胞を各種抗体と補体で処理した後、IL-2 で活性化し、その細胞障害活性を調べたところ、bright Ly-1⁺, Ly-2⁺ 又は L3T4⁺ 細胞を除去しても、その細胞障害活性が対照群と比べ低下しないことより、LAK 前駆細胞は Ly-1⁻ もしくは dull Ly-1⁺ で L3T4⁻ Ly-2⁻ のいわゆるダブルネガティブ細胞であることが判明した。LAK 細胞とその前駆細胞の phenotype の分析結果は、IL-2 の刺激により Ly-2⁻ の HC 抵抗性胸腺細胞から Ly-2⁺ の T 細胞へと分化が起きていることを示している。

次なる興味は LAK 細胞を含む MHC 拘束性を持たないキラー細胞の細胞障害メカニズムである。最近、筆者は LAK 細胞に強く反応し、かつ、LAK 活性を阻害し得るモノクローナル抗体 (KBA) を産生するハイブリドーマの樹立に成功した。この抗体により認識される抗原、lymphokine-activated cell-associated antigen (LAA) は 180K と 95K の 2 つのサブユニットから成るタンパクであった。本論文では、更に詳細な LAA の性状とリンパ球の活性化における役割について述べる。LAA は全てのリンパ系の細胞に低い発現量ながら発現されているが、*in vitro* において Con A, LPS, allo 抗原又は IL-2 等により活性化されたリンパ球ではその発現量は増大した。*in vivo* においても活性化されたリンパ球、例えば、OK-432 活性化リンパ球や腫瘍内浸潤リンパ球においても未刺激リンパ球に比べて高密度の発現が認められた。LAA は一種の活性化抗原と考えられたので、次に LAA と細胞周期との関係についてフローサイトメトリーを用いて検討した。その結果、G_{1a}→G_{1b} に移行するのに相関して LAA の発現増強が認められた。

T 細胞の活性化において LAA の発現増強が認められることより、この LAA 分子自身が T 細胞活性化にどのような役割を果たしているかについてさらに検討を加えた。すなわち、*in vitro* 各種免疫応答に KBA 抗体を添加、その影響について検討した。その結果、KBA 抗体の添加により allo-MLR, auto-MLR, Con A response は阻害されたが、PHA response はまったく阻害されなかった。次に MLR や Con A response の KBA 抗体による阻害が、これら免疫応答のどの段階を阻害することによりおこるのかについて、Con A response を例にとり精査した。すなわち、KBA 抗体が Con A response における、① Con A の刺激による T 細胞上の IL-2 レセプターの発現、② ヘルパー T 細胞からの IL-2 の産生、③ 産生された IL-2 の直接作用のいずれの段階を阻害しているか検討した。①の IL-2 レセプターの発現と②の IL-2 の産生は KBA 抗体の添加により著しい阻害を受けた。③の IL-2 の直接作用は KBA 抗体の添加により何等影響を受けなかった。以上の結果より KBA 抗体は早い時期の反応①および②のみを抑制し、後期の反応③には影響を与えないことが判明した。この事は、KBA 抗体の添加時期を変える実験の結果からも支持された。LAA 分子が T 細胞活性化の早期に重要であることは、T 細胞が抗原提示細胞と接

着する際に重要な分子であることを裏付けた。

Cataract Shionogi (CTS) マウスは、小眼を伴う白内障マウスとしてシオノギ油日ラボにて近交系化されたマウスで、自己免疫性糖尿病をおこすマウスとして既に有名となった NOD マウスの sister strain でもある。筆者はこの CTS マウスの免疫学的特徴について研究を行った。まず、*in vitro* での脾細胞の免疫応答について検討したところ、B 細胞マイトージェンである LPS に対する応答性は対照群に比べて低くはないが、T 細胞マイトージェンである Con A, PHA に対する応答性は対照群に比べて著しく低いことが判明した。リンパ球混合試験においても CTS マウスの脾細胞は allo 抗原の刺激による増殖もキラー T 細胞の生成も行われなかった。次に、T 細胞免疫応答のどの段階が低下しているかについて、Con A を例にとり検討した。CTS マウスの脾細胞は Con A の刺激による IL-2 レセプターの発現も IL-2 の産生も対照マウスに比べ著しく低下していた。この様な T 細胞応答性の低下が T 細胞の数的低下によるものか、質的低下によるものかについて検討した。CTS マウスの脾リンパ球サブセットをフローサイトメトリーにて解析したところ、対照マウスに比して T 細胞の数が有意に低下していた。その中でも $Ly-2^+$ T 細胞の減少が著明であった。一方、CTS マウスの脾細胞をナイロンウールカラムを通過させたり、セルソーターにて T 細胞を濃縮すると、PHA に対する応答性が対照マウスと同程度までに上昇した。以上のことから、CTS マウスの T 細胞応答の低下は T 細胞それ自身の質的な低下というよりも T 細胞の数的低下によるものと考えられる。なお、CTS マウスの NK 活性は高応答性の C3H/He マウスよりは低いものの、NOD マウスのようにまったく検出できないこともなく、中程度の活性であった。

In vitro での結果をふまえ、特に T 細胞依存性、非依存性抗原に対する *in vivo* での CTS マウスの免疫能について検討した。すなわち、T 細胞依存性抗原として、ヒツジ赤血球 (SRBC) とウシ血清アルブミン (BSA) を用い、T 細胞非依存性抗原としては LPS を用いて *in vivo* における抗体産生、遅延型過敏反応を対照マウスと比較した。SRBC に対する抗体産生は SRBC 10^8 コという高用量 1 回免疫又は SRBC 10^5 コという低用量の 1 回ないし 2 回免疫のいずれにおいても対照マウスに比べ CTS マウスでは著しく低かった。特に、高用量、低用量 SRBC の 1 次応答における IgM 抗体の産生と低用量 SRBC の 2 次応答における IgG 抗体の産生が低かった。CTS マウスではもう一つの T 細胞依存性抗原である BSA に対する抗体産生も SRBC 同様、対照マウスに比べ、低くなっていた。BSA と百日咳菌体 (死菌) の免疫による CTS マウスでの IgE 抗体の産生は、種々の対照マウスのほとんど全ての個体が産生している 2 週目においてもほとんど認められなかった。IgG₁ 抗体の産生は CTS マウスでも高率に認められたが、産生された抗体の力価は他の対照マウスに比べ著しく低かった。この様に CTS マウスにおいてはアナフィラキシーの成因となる IgE 抗体と IgG₁ 抗体が血清中に検出されないにも拘らず、能動アナフィラキ

シーショックは他の系統のマウスと同等であるか、むしろ強い傾向が認められた。この事は、CTS マウスが能動アナフィラキシーショックのエフェクター相に対して高い感受性を持つことを示唆している。細胞性免疫もまた低下している。SRBC に対する遅延型過敏反応は、高応答性の BDF₁ や中程度の応答性を示す NOD や NON マウスに比べて弱かった。皮膚移植拒絶反応では、同じ MHC class II 抗原を持つ NOD マウスと CTS マウスの間で、NOD マウスは CTS マウスの皮膚を拒絶するが、CTS マウスは NOD マウスの皮膚を拒絶できなかった。以上、T 細胞の関与する応答は全て低下していたが、T 細胞非依存性抗原 LPS に対する抗体産生は対照マウスとの間に差異は認められなかった。

この新しい近交系 CTS マウスは末梢 T 細胞数の低下に起因する免疫不全であるので、末梢 T 細胞数を増やす biological response modifiers (BRM) 等のスクリーニングに有用と思われる。またもう一つの特徴として、新たに CTS マウスはアナフィラキシーショックを起こし易いということが判明したが、血清中にアナフィラキシー性抗体が検出されなくてもショック死を起こすという極めてまれなマウスであり、今後 CTS マウスはアナフィラキシーショックの好適な研究材料ともなろう。

審査結果の要旨

T細胞は免疫における中枢的な機能を担うリンパ球であり、それぞれ性質および機能の異なる種々の亜群が存在する。本研究ではT細胞の母体である胸腺細胞について、胸腺細胞がキラー細胞に変換する過程並びに誘導されたキラー細胞の性質を解明すると共に、T細胞欠損マウスにおいて、T細胞欠損がそのマウスの示す病態とどのように関わっているかについて明らかにしている。

リンフォカイン活性化キラー（LAK）は脾臓細胞、血液リンパ球などの末梢リンパ球をインターロイキン2（IL-2）の存在下で培養することにより誘導されるキラー細胞であるが、一般には胸腺細胞からは誘導することが困難である。著者はマウスをヒドロコチゾン（HC）で処理した後に胸腺細胞を採取し、その細胞をIL-2存在下培養することにより、効率よくLAK細胞を誘導しうることを発見した。さらにこのLAK細胞の母細胞のフェノタイプを検索し、胸腺細胞なかでLAK細胞へと分化する細胞は、HC抵抗性のThy1⁺, Lyt1⁻, Lyt2⁻のT細胞であること、および胸腺細胞から誘導されたLAK細胞は大型の比較的低い比重の細胞であることを確認した（第2章）。

次に、LAK細胞の標的細胞への結合を支配する細胞表面抗原を検索するためにLAK細胞を抗原としてモノクローナル抗体を作成した。その一つでKBAと命名した抗体は、LAK細胞の標的細胞への結合および標的細胞破壊を強く抑制することから、この抗体に対応する抗原が目的の抗原であると考え、本抗原（LAAと命名）の各種細胞における分布とその性状について検討した。LAAは休止期のリンパ球には殆ど表現されていないが活性化したリンパ球では強く表現される。細胞回転の分析の結果、リンパ球におけるLAAの発現はG_{1a}-G_{1b}の時期にみられることも確認した（第3章）。

KBA抗体は刺激されたリンパ球の幼若化、分裂を阻止することがin vitroにおいてみいだされた。この結果からLAAはLAK細胞の接着分子として機能するほかに、リンパ球そのものの活性化にも関与する機能分子であることが判明した（第4章）。

最後に病態マウスモデルについてそのT細胞機能について解析した。白内障マウス（CTS）がどのような免疫変調を示すかについて検討した結果、本マウスのT細胞細胞は個々には正常に近い機能を有するものの、生体内での数が正常マウスと比べて著しく低いことが明らかにされた（第5章）。この結果がCTSマウスの免疫応答そのものとのような関わりを持つかについて種々の抗原に対するCTSマウスの抗体産生について調べたところ、明らかにT細胞細胞関与の各種の抗体産生能が低下していることが認められた（第6章）。

以上の研究成果はT細胞についての新しい知見を提供するものとして注目され、博士号に値するものと評価される。