

氏名(本籍) 土 井 秀 之

学位の種類 医 学 博 士

学位記番号 医 第 2072 号

学位授与年月日 平 成 元 年 2 月 22 日

学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当

最終学歴 昭 和 56 年 3 月
東北大学医学部医学科卒業

学位論文題目 Murine thymic nurse clone supports the growth of fetal thymocytes in the presence of interleukin 2
(胸腺ナース細胞クローンによる胎仔胸腺リンパ球の増殖)

(主 査)
論文審査委員 教授 森 昌 造 教授 橘 武 彦
教授 菅 村 和 夫

論文内容要旨

【目 的】

胸腺において、胸腺支質細胞と胸腺細胞の細胞間相互作用はTリンパ球の分化・成熟に重要な役割を果たすと考えられている。胸腺支質細胞の中で胸腺ナース細胞は、多数の胸腺細胞を細胞質内に抱え込む特異な複合体を形成することから、Tリンパ球の分化・増殖に重要な役割を果たしていると考えられている。一方、胎生14～15日目の胎仔胸腺細胞はすべてLyt 2とL3T4抗原がともに陰性である未熟なリンパ球であり、また、分化・成熟の可能性を持つことから、Tcell precursorとして注目されている。この未熟な胎仔胸腺細胞は、IL-2-receptor抗体である7D4や3C7で約50%陽性細胞が認められるにもかかわらず、IL-2に反応しないことが報告されている。最近、未熟な胸腺細胞をPMAとCa ionophorで刺激すると、IL-2に反応し増殖することが報告された。この実験系に、樹立したTNCクローンをコントロールとして予備実験を行った結果、TNCがIL-2存在下に胎仔胸腺細胞の増殖を誘導することがわかった。今回、TNCクローンが、IL-2存在下で胎仔胸腺細胞の増殖・分化にどのような影響を与えるかを詳細に検討した。

【方法と結果】

TNCは、BALB/cマウスの胸腺腫瘍より樹立したTNC株のクローン(IT-79MTNC3)を用いた。胎仔胸腺細胞はBALB/cマウスの胎生14～15日目の胎仔胸腺を実体顕微鏡下に摘出し分離した。TNCクローン 2×10^6 個と分離した胎仔胸腺細胞 1×10^6 個との共存培養をIL-2(100U/ml)添加DME+10%FCSで行い、24時間毎に位相差顕微鏡下に観察した。培養開始後1日目では、胎仔胸腺細胞の約0.2%が、TNC下面への潜り込みを示すに過ぎないが、その後潜り込んだリンパ球の数が増加し、3日目から潜り込んだリンパ球が位相差顕微鏡下に容易に認められるようになった。さらに潜り込んだリンパ球は増加し、5日目よりTNC上面へのリンパ球の凝集も認められ、著明な増殖が観察された。7日目ではTNCのmonolayerが見えなくなるほどの細胞増殖が観察された。胎仔胸腺細胞の増殖のTime kineticusをみるために、胎仔胸腺細胞 1×10^5 個とTNC500個とをIL-2(100U/ml)存在下に共存培養し、24時間毎に $[^3\text{H}]$ thymidineの取り込みを測定した。その結果、実質的な増殖は培養開始後5日目から始まることがわかった。次に、胎仔胸腺細胞の増殖を誘導する刺激がどのようなものであるかを調べるために、6つの条件下で胸腺細胞の培養を行った。(1) Mediumのみ、(2) TNCのみとの共存培養、(3) IL-2(100U/ml)のみ添加、(4) TNCとIL-2(100U/ml)との共存培養、(5) TNCの

培養上清添加，(6) TNC培養上清とIL-2 (100U/ml) の添加，以上6つの条件下で共存培養を行った。その結果，IL-2，TNC単独では増殖を誘導できないが，IL-2とTNCがともに

存在するときのみ増殖が誘導された。これに対し，TNCの培養上清は，IL-2存在下でも胎仔胸腺細胞の増殖を誘導できなかった。TNCによる胎仔胸腺細胞の増殖誘導がIL-2存在下で行われるため，増殖がIL-2依存性であるかを調べた。その結果，IL-2濃度6U/mlから100U/mlまで [^3H] thymidine の取り込みが増加し，200U/mlから400U/mlでplateauに達した。また，IL-2 receptor抗体で，増殖はブロックされた。このように活性化された胎仔胸腺細胞はIL-2依存性増殖をしめた。この系において，TNCが増殖する胸腺細胞の分化にどのような影響を与えるかを調べるためにFlow cytometryでTリンパ球表面分化抗原を解析した。分離したばかりの胎生14～15日目の胸腺細胞はThy1を既に発現しているが，T細胞分化抗原であるLyt 2，L3T4は陰性であった。この細胞をTNCとIL-2で7～10日間培養し，表面抗原の発現を調べた。TNCとIL-2で活性化された胎仔胸腺細胞は，ほぼ100%Thy1陽性であるが，Lyt 2，L3T4及びT3の発現は認められなかった。また，これらの胸腺細胞は機能的にも未熟で，IL-2産生及び細胞障害活性も認められなかった。

【結 論】

樹立したTNCクローンが，IL-2存在下で胎生14～15日目の未熟な胎仔胸腺細胞のIL-2依存性増殖を，直接的な細胞間相互作用を介し誘導することが示された。これらの結果から，胸腺支質細胞であるTNCが胸腺内で未熟なリンパ球との細胞間相互作用を介して，Tリンパ球の分化増殖に重要な役割を果たしている可能性が強く示された。

審査結果の要旨

移植免疫など免疫応答の調節は、その中心的役割を果たすT細胞が抗原を認識し、活性化され、抗原特異的な反応を誘発する事に基づいている。T細胞は、骨髄細胞由来の幹細胞が胸腺内で分化し、種々の免疫担当細胞へ成熟し、末梢組織へと流出していくと考えられている。この胸腺内でのプロセスが免疫機能成立の最も基本的な命題（自己-非自己認識能、あるいは自己寛容性）と深く関係すると考えられている。

胸腺の機能を解明するため、その構成細胞のレベルで解明しようという研究が行われている。特に、胸腺構成細胞の中でThymic Nurse cell (TNC) は、多数の胸腺リンパ球を抱え込む特異な複合体を形成することから、直接的な細胞間相互作用を持つ細胞として注目されている。TNCの機能の研究の実験を組み立てるため、本研究においては、本学第三解剖学教室において樹立されたマウスのTNCクローン (IT-79MTNC3) 用い、T cell precursorである胎生14~15日目の胎仔胸腺リンパ球との共存培養を検討した。その結果、TNCがインターロイキン-2 (IL-2) 存在下で、未熟な胸腺リンパ球の増殖を直接的な細胞間相互作用を介して誘導することが判明した。文献的には、未熟な胎仔胸腺リンパ球は、phorbol myristateacetate (PMA) やCa ionophorなどのmitogen刺激が与えられた時のみ、IL-2やIL-4に反応することが報告されていたが、生体内で同様のシグナルを与えるものについての報告はない。未熟な胸腺リンパ球の増殖に必要なシグナルをTNCが提供する事実は、今後の胸腺内T細胞分化機構の解明に重要な意味をもつと考えられる。さらに、IL-2存在下でTNCとの共存培養で、IL-2単独に反応しない未熟な胸腺リンパ球がIL-2依存性に増殖を示すようになることから、TNCが機能的なIL-2レセプターの発現の機構に関与する可能性が示唆された。一方、増殖する胸腺リンパ球は、T細胞分化抗原 (CD4やCD8) の発現はなく、また、細胞障害活性やIL-2産生も認められず、表面抗原的にも機能的にも未熟なままであることがわかった。このような未熟な胸腺リンパ球のenrichment操作を容易にする実験系の確立は、今後のIL-2レセプターやT細胞抗原レセプターの発現の機構の解析とT細胞レパートリー形成の実験系を組み立てる上で、重要なステップであると考えられる。

免疫応答調節で中心的役割をつかさどるT細胞の増殖、分化の場である胸腺内で、その構成細胞であるTNCが未熟な胸腺リンパ球の増殖、分化に重要な役割を果たす可能性を提示した意味で充分子論文にふさわしい研究と考えられる。