

氏 名 (本籍) ^{たか}高 ^{さわ}澤 ^{なる}徳 ^{ひこ}彦

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 医 博 第 1 2 9 8 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 8 年 3 月 26 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

研 究 科 専 攻 東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科
(博 士 課 程) 内 科 学 系 専 攻

学 位 論 文 題 目 Expression of OX40 Ligand on Human
Activated T Cells and Its Involvement in Cell
Growth Signal Transduction as an Effector
Molecule.

(OX40 リガンドの活性化T細胞上での発現と細胞増殖シグナル伝達分子としての関与)

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 阿 部 圭 志 教 授 佐 々 木 毅

教 授 佐 竹 正 延

論文内容要旨

gp34 はヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-I) 感染 T 細胞上に特異的に発現している分子量 34kD の糖蛋白として同定され、当教室にて遺伝子が単離されていたが、最近活性化 T 細胞のマーカーであり、TNF 受容体スーパーファミリーの 1 つである OX40 のリガンドであることが明らかとなった。TNF 受容体スーパーファミリーには、TNF 受容体 I 型、II 型、Fas、CD40 など細胞増殖、分化、生存、死などに関わる重要な分子が含まれていることから、OX40 リガンド (gp34)/OX40 系の機能的役割が注目されている。本研究ではヒト末梢血細胞での OX40 リガンド/OX40 の発現とその機能について解析した。

まず、種々の刺激により活性化された時のヒト末梢血 T 細胞、B 細胞上の OX40 リガンドと OX40 の発現の変化を調べた。ヒト末梢血よりリンパ球を分離し、種々の刺激を加え、それぞれに対するモノクローナル抗体を用いて FACS にて解析した。無刺激の状態では、CD4 陽性 T 細胞上に OX40 のわずかな発現だけがみられた。PHA、抗 CD3 モノクローナル抗体、PMA とイオノマイシンによる刺激により、CD4 陽性、CD8 陽性 T 細胞上に 2 日後をピークとする OX40 の発現が誘導されたが、OX40 リガンドの発現はほとんどみられなかった。OX40 の発現は大部分の細胞に誘導され、CD4 陽性 T 細胞が CD8 陽性 T 細胞に比べてより高かった。一方、PWM 刺激により、B 細胞では OX40 の発現が誘導された。OX40 リガンドの発現はごくわずかにみとめられた。

次に、抗原刺激により活性化された T 細胞上に OX40 リガンドと OX40 の発現の誘導を FACS にて解析した。抗原としてヒト B 細胞を EB ウイルスでトランスフォームした細胞株を樹立し、これに放射線を照射し、同一人由来の末梢血リンパ球とともにインターロイキン 2 存在下に培養して、EB ウイルスに特異的な CD4 陽性及び CD8 陽性のキラー T 細胞クローンを得た。抗原刺激に伴い、OX40 の発現誘導の程度はクローンにより高低がみられたのに対し、OX40 リガンドの発現はすべてのクローンで比較的高く誘導され、そのピークは 2 日後であった。

次に、OX40 リガンド/OX40 の機能について解析した。COS-7 細胞に OX40 リガンド遺伝子、OX40 遺伝子をそれぞれ導入し、OX40 リガンド、OX40 を恒常的に発現する COS-OXL3、COS-OX9 細胞を樹立した。まず、抗原刺激した T 細胞クローンを、放射線照射した COS-OXL3 細胞とともに、72 時間培養し、 $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みを測定した。OX40 リガンドを発現している COS-OXL3 細胞と培養した T 細胞クローンでは、対照の COS-7 細胞に比べ、有意な $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みの増加が認められ、T 細胞クローンにおいても OX40 から細胞内に増殖シグナルが伝えられることが示された。この系において、COS-OXL3 細胞のかわりに COS-OX9 細

胞とともに培養したところ、 $[^3\text{H}]$ チミヂンの取り込みの増加が認められ、OX40 リガンドからも細胞内に増殖シグナルが伝えられることが示唆された。さらに、マウスの IL-2 依存性 T 細胞株である CTLL-2 細胞に OX40 リガンド遺伝子を導入した CTLL-OXL2 細胞を樹立し、放射線照射した COS-OX9 細胞とともに 30 時間培養すると、COS-7 細胞と培養したものに比べ、 $[^3\text{H}]$ チミヂンの取り込みの増加が認められた。

従来、OX40 リガンド/OX40 系の機能としては、B 細胞上の OX40 リガンドと T 細胞上の OX40 との結合を介して、T-B 細胞間相互作用に働くことが示されていた。本研究において、OX40 リガンドと OX40 の両者は、抗原刺激により T 細胞上に発現が誘導されることが明らかにされた。従って、OX40 リガンド/OX40 系が T-T 細胞間相互作用にも関わっていることが示唆された。さらに、従来 OX40 から細胞内シグナルが伝達されることが明らかにされていたが、本研究において、OX40 リガンドからも細胞内にシグナルが伝達されることが明らかとされた。OX40 リガンド/OX40 系が双方向性に、T 細胞クローンの拡大など抗原依存的な免疫応答の調節に重要な働きをしていることが考えられる。

審査結果の要旨

gp34 は活性化 T 細胞のマーカーであり、TNF 受容体スーパーファミリーの 1 つである OX40 のリガンドである。TNF 受容体スーパーファミリーには、TNF 受容体 I 型、II 型、Fas、CD40 など細胞増殖、分化、生存、死などに関わる重要な分子が含まれていることから、OX40 リガンド (gp34) /OX40 系の機能的役割が注目される。本研究はヒト末梢血細胞での OX40 リガンド/OX40 の発現とその機能について追求した。

種々の刺激により活性化された CD4 陽性、CD8 陽性 T 細胞及び B 細胞上に 2 日後をピークとする OX40 の発現が誘導されたが、OX40 リガンドの発現はほとんどみられなかった。この OX40 リガンド及び OX40 とともに抗原刺激により活性化された同一 T 細胞上での発現が誘導されること、EB ウイルスに特異的な CD4 陽性及び CD8 陽性のキラー T 細胞クローンを樹立することにより見出した。次に、OX40 リガンド/OX40 の機能について解析した。COS-7 細胞に OX40 リガンド遺伝子、OX40 遺伝子をそれぞれ導入し、OX40 リガンド、OX40 を恒常的に発現する COS-OXL3、COS-OX9 細胞を樹立した。これと抗原刺激した T 細胞クローンを用いて、T 細胞においては OX40 から細胞内に増殖シグナルが伝えられていることが示された。この系において、COS-OXL3 細胞の代わりに COS-OX9 細胞とともに培養したところ、 $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みの増加が認められ、OX40 リガンドからも細胞内に増殖シグナルが伝えられることが示唆された。さらに、マウスの IL-2 依存性 T 細胞株である CTLL-2 細胞に OX40 リガンド遺伝子を導入した CTLL-OXL2 細胞を樹立し、放射線照射した COS-OX9 細胞とともに 30 時間培養すると COS-7 細胞と培養したものに比べ、 $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みの増加が認められた。

従来、OX40 リガンド/OX40 系の機能については、B 細胞上の OX40 リガンドが T 細胞上の OX40 と結合することにより、T-B 細胞間相互作用に働くことが示されていた。本研究では、抗原刺激により T 細胞上に OX40 リガンドと OX40 の両者ともに発現が誘導されることを明らかとした。従って、OX40 リガンド/OX40 系が T-T 細胞間相互作用にも関わっていることが示唆される。さらに、OX40 リガンドから細胞内にシグナルが伝達されることを明らかとした。このことは、生理的に OX40 リガンド/OX 系が双方向性に、T 細胞クローンの拡大など抗原依存的な免疫応答の調節に重要な働きを行うことを示す初めての知見である。今後、自己免疫病等の発症における本所見の関与も注目される有意義な研究であり、十分学位論文に値するものである。