

氏 名（本籍）	宮 下 真 理 子
学位の種類	博 士（医 学）
学位記番号	医 第 3 1 5 4 号
学位授与年月日	平 成 11 年 3 月 3 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 2 項該当
最 終 学 歴	平 成 3 年 3 月 25 日 北海道大学大学院水産学研究科 食品化学専攻修士課程修了
学位論文題目	マウス小腸上皮間 T 細胞の分化成熟と生理的機能 に関する研究

（主 査）

論文審査委員	教授 伊 藤 恒 敏	教授 名 倉 宏
	教授 菅 村 和 夫	

論文内容要旨

【目 的】

マウス小腸の上皮細胞間には多数のT細胞 (intraepithelial lymphocyte : IEL) が存在する。IELは腸管付属リンパ組織の一員として、腸管における最前線での免疫防御に重要な役割を果たすと考えられている。しかし、IELの分化成熟や生理的機能については未だ不明な点が多く残されている。そこで、本研究では、腸管腔内の抗原 (腸内細菌や食餌抗原) がマウス小腸 IEL の分化成熟に与える影響を明らかにするために無菌および無抗原マウス IEL を検索した、また、 $\alpha\beta$ -IEL と $\gamma\delta$ -IEL の相互作用を解明するために、TCR 遺伝子欠損マウスの小腸 IEL を解析した。

【方 法】

マウスは通常環境 (CV) または無菌 (GF) 環境で飼育し、無菌マウスは滅菌固形飼料または無抗原飼料 (できるだけ抗原物質を除いた合成飼料) で飼育した。無菌マウスの通常化は、通常マウスの糞便希釈液を投与して行った。IELは、振盪により小腸上皮間から剥落させた後 Percoll 密度勾配遠心法により調製した。IELの細胞表面抗原の発現は、各抗原に対する抗体で染色後フローサイトメーターで解析した。IELの細胞傷害活性は、IELを抗 TCR β または抗 TCR δ 抗体の存在下で ^{51}Cr で標識した P815 細胞とインキュベーションし、上清に遊離してきた放射活性から算出した。

【結果と考察】

1) マウス小腸 IEL の分化成熟におよぼす腸内細菌の影響：いずれの系統マウスでも無菌マウスの $\alpha\beta$ -IEL は通常マウスに比較して著しく減少し、 $\alpha\beta$ -IEL の細胞傷害活性は通常マウスでは系統によらず高いが無菌マウスでは消失または低下していた。一方、 $\gamma\delta$ -IEL は細胞数、サブセット構成、細胞傷害活性のいずれも通常マウスと無菌マウスで差がなかった。これらの結果は、 $\alpha\beta$ -IEL は腸内細菌の定着に伴って分化成熟するのに対し、 $\gamma\delta$ -IEL の分化成熟は腸内細菌の定着とは無関係に起こることを示している。

2) マウス小腸 IEL の分化成熟におよぼす腸管腔内抗原の影響：無抗原マウス (AgM-GF) の $\alpha\beta$ -IEL 数は固形飼料で飼育した無菌マウス (Nat-GF) に比べて減少していたが、 $\gamma\delta$ -IEL の数は Nat-GF と AgM-GF で差がなかった。また、AgM-GF マウスでは $\alpha\beta$ -IEL の細胞傷害活性はほとんど消失し、 $\gamma\delta$ -IEL の細胞傷害活性も著しく低下していた。以上の結果より、マ

ウス $\gamma\delta$ -IELの細胞傷害活性は食餌抗原の存在により誘導されると考えられた。

3) 腸内細菌の定着に伴う小腸IELの分化成熟におよぼすサイクロスポリンAの影響：無菌マウスの通常化の過程で免疫抑制剤サイクロスポリンA (CsA) を連日投与したところ、投与後2週間までは $\alpha\beta$ -IELの数の増加に影響を与えなかったが、投与後2~3週間に起こる $\alpha\beta$ -IELの数の増加が抑制された。さらに、通常化開始3週間後にIELを調製し、Percollによる密度勾配遠心分離法により高比重画分 (High-density fraction; HF) と低比重画分 (Low-density fraction; LF) の2つの画分に分離し検索したところ、CsAの投与はLFのIEL数に対するHFのIEL数の値 (HF/LF比) を低下させた。これらの結果は、腸内細菌の定着により誘導される $\alpha\beta$ -IELの分化成熟はCsA感受性の段階およびCsA抵抗性の段階を経て起こることを示唆している。

4) マウスの小腸IELの分化成熟における $\alpha\beta$ -IELと $\gamma\delta$ -IELの相互作用：TCR $\delta^{-/-}$ マウスでは $\alpha\beta$ -IELのみが存在し、TCR $\beta^{-/-}$ マウスでは $\gamma\delta$ -IELのみが存在する。またTCR $\alpha^{-/-}$ マウスでは $\gamma\delta$ -IEL以外に有意な数のTCR $\alpha^{-}\beta^{+}$ 細胞も存在していた。TCR $\delta^{-/-}$ マウスの $\alpha\beta$ -IELおよびTCR $\alpha^{-/-}$ マウスの $\gamma\delta$ -IELは強い細胞傷害活性を示すのに対し、TCR $\beta^{-/-}$ マウスの $\gamma\delta$ -IELは細胞傷害活性が著しく減弱していた。 $\gamma\delta$ -IELの細胞傷害活性誘導におけるTCR $\alpha^{-}\beta^{+}$ 細胞の役割を追求するためにTCR $\alpha^{-/-}$ マウスを無菌化してTCR $\alpha^{-}\beta^{+}$ 細胞を減少させたところ、 $\gamma\delta$ -IELの細胞傷害活性が著しく低下した。これらの結果は、 $\alpha\beta$ -IELの細胞傷害活性の発現には $\gamma\delta$ -IELは必要でないが、 $\gamma\delta$ -IELの細胞傷害活性の発現にはTCR β 鎖遺伝子発現が必要であることを示している。

本研究では、種々マウスの小腸IELを検索することにより小腸IELの分化成熟と細胞傷害活性の発現を制御する要因を明らかにすることを試みた。本研究で得られた結果は、腸管機能の恒常性維持における小腸IELの生理的機能を理解する上で重要な新知見であると考えられるとともに、腸管感染の治療法の開発、炎症性腸疾患の機構解明、あるいは食物アレルギーの予防などに有益な知見と考えられる。

審査結果の要旨

小腸の上皮間には多数の T 細胞 (intraepithelial lymphocyte : IEL) が存在する。IEL は腸管付属リンパ組織の一員として、腸管における免疫防御に重要な役割を果たすと考えられるが、IEL の分化成熟や生理的機能については未だ不明な点が多い。本研究では、腸管腔内の抗原 (腸内細菌や食餌抗原) がマウス小腸 IEL の分化成熟に与える影響を明らかにするために無菌および無抗原マウスの IEL を検索し、また $\alpha\beta$ -IEL と $\gamma\delta$ -IEL の相互作用を解明するために TCR 遺伝子欠損マウスの小腸 IEL を解析し、以下の知見を得た。

- (1) 無菌マウスでは通常マウスに比べて $\alpha\beta$ -IEL の細胞数が減少し細胞傷害活性が低下するが、 $\gamma\delta$ -IEL の細胞数や細胞傷害活性は通常マウスと差がなかった。これらの結果は、 $\alpha\beta$ -IEL は腸内細菌の定着に伴って分化成熟し、 $\gamma\delta$ -IEL は腸内細菌の定着とは無関係に分化成熟することを示している。
- (2) 無菌マウスをできるだけ抗原物質を除いた滅菌合成飼料 (無抗原飼料) で飼育すると、 $\alpha\beta$ -IEL の細胞傷害活性はほとんど消失し $\gamma\delta$ -IEL の細胞傷害活性は著しく低下した。この結果より、マウス $\gamma\delta$ -IEL の細胞傷害活性は食餌抗原の存在により誘導されると考えられた。
- (3) 無菌マウスに腸内細菌を定着させる過程 (通常化) で免疫抑制剤サイクロスポリン A (CsA) を連日投与したところ、通常化前期 (2 週間後まで) には影響はなかったが通常化後期 (2~3 週間後) では $\alpha\beta$ -IEL の増加が抑制された。これらの結果は、腸内細菌の定着により誘導される $\alpha\beta$ -IEL の分化成熟は CsA 感受性および CsA 抵抗性の段階を経て起こることを支持している。
- (4) TCR δ 欠損マウスでは $\alpha\beta$ -IEL のみが存在し、それらは強い細胞傷害活性を示す。一方、TCR α 欠損マウスと TCR β 欠損マウスではいずれも $\gamma\delta$ -IEL が最優勢に存在するが、TCR α マウスの $\gamma\delta$ -IEL は強い細胞傷害活性を示すのに対し、TCR β 欠損マウスの $\gamma\delta$ -IEL は細胞傷害活性が著しく減弱していた。ところが、TCR α 欠損マウスを無菌環境で飼育すると TCR $\alpha-\beta$ + 細胞が減少すると共に $\gamma\delta$ -IEL の細胞傷害活性が著しく低下した。これらの結果は、 $\alpha\beta$ -IEL の細胞傷害活性の発現には $\gamma\delta$ -IEL は必要ではないが、 $\gamma\delta$ -IEL の細胞傷害活性の発現には TCR β 鎖遺伝子発現が必要であることを示している。

本研究では、種々マウスの小腸 IEL を検索することにより小腸 IEL の分化成熟と細胞傷害活性の発現を制御する要因を明らかにした。本研究で得られた結果は、腸管機能の恒常性維持における小腸 IEL の生理的機能を理解する上で重要な新知見である。また、腸管感染の治療法の開発、炎症性腸疾患の機構解明、あるいは食物アレルギーの予防などにもつながる有益な知見と考えられる。