

氏 名（本籍）	曾 我 浩 之
学位の種類	博 士（医 学）
学位記番号	医 第 3 2 5 5 号
学位授与年月日	平 成 13 年 9 月 12 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 6 年 3 月 31 日 名古屋大学大学院医学研究科 博士課程生理系専攻 (生理学第二) 退学
学位論文題目	マウス胸腺マクロファージ系細胞の多様性

(主 査)

論文審査委員	教授 伊 藤 恒 敏	教授 佐々木 毅
	教授 名 倉 宏	

# 論文内容要旨

## 【目 的】

マクロファージはマウス胸腺内に広く分布している。マクロファージは、組織の特異性や存在部位によって、多様な形態や機能を示すことが知られているが、胸腺での研究は少ない。そこで、本研究では胸腺マクロファージの多様性を、*in situ*で、フェノタイプ・形態・局在・機能の視点から検討した。

## 【方 法】

材料には6週齢雌性BALB/cマウス胸腺を用いた。グルココルチコイドを投与する実験ではhydrocortisone 250mg/kgを腹腔内投与後、経時的に胸腺を摘出した。標識デクストランを投与する実験ではFITC dextran 50mg/kgをマウス腹腔内に投与して12時間後に胸腺を摘出した。標本はPLP/PFA固定後、凍結切片を作製し、抗Mac-2, F4/80, CD32/16, 2F8等の抗体を用いた蛍光抗体法および蛍光ラベルTUNEL法による多重染色を行って共焦点レーザー顕微鏡ないしは蛍光顕微鏡で観察した。または、抗体染色後、DAB発色、Epon包埋を行って超薄切片を作製、透過電顕により観察した。

## 【結果及び考察】

各種マクロファージ・マーカーを用いた蛍光二重染色による免疫組織学的検索、およびマクロファージ・マーカーと樹状細胞(DC)マーカーの蛍光二重染色による検索の結果、マウス胸腺のマクロファージは大別して三種の亜群に分けられることがわかった。「Dendriticタイプ」亜群の細胞は大型で細胞突起に富み、Mac-2, F4/80, CD32/16, 2F8, I-Aといったマーカーを発現している。また、DCや指状嵌入細胞(IDC)で発現が報告されているCD11cを弱く発現していた。胸腺全域に分布するが特に皮質で密度が高い。「Roundタイプ」亜群の細胞は比較的小型で細胞突起に乏しく、Mac-2, I-Aを発現しているがF4/80, CD32/16, 2F8は発現していない。また、CD11c, Bリンパ球系のマーカーであるCD45R/B220, 顆粒球のマーカーであるGr-1, 単球系その他、顆粒球でも発現されているCD11b(Mac-1)の発現も見られなかった。この細胞は生理的な条件のもとでは髄質、特に血管の周囲に高頻度で観察され、皮質に存在することは希であった。「Flatタイプ」亜群の細胞は少数ながら表層の被膜直下にのみ見られ、被膜下に細胞突起を伸ばし、flatな外観を呈する。F4/80, CD32/16, 2F8を発現しているが、マウス胸腺ではこのタイプのマクロファージだけがMac-2を発現していなかった。また、髄質にはこれらの

亜群以外に、IDCに相当すると考えられる細胞が認められたが、DCの特徴を有する細胞は認められなかった。次に、これらの亜群間の機能における違いを明らかにする目的で、グルココルチコイド投与によってリンパ球の細胞死を誘導した条件下で、各亜群の細胞による貪食を免疫組織学的に解析した。三つの亜群のうちFlatタイプは数が少なく解析が困難のため、数的に大部分を占めるDendriticタイプとRoundタイプの間で貪食能を比較した。その結果、両タイプ共にグルココルチコイド投与後12時間経ってもフェノタイプには変化がなかったが、皮質のDendriticタイプ細胞による死滅した胸腺リンパ球の貪食は、グルココルチコイド投与後に著しく促進された。これに対し、Roundタイプの細胞による貪食は観察されなかった。Dendriticタイプの細胞ではグルココルチコイドを投与しない生理的条件においても、死滅したリンパ球の貪食が一定頻度で観察された。また、標識高分子量デクストランを腹腔内投与すると、12時間後には胸腺の実質に移行し、皮質のDendriticタイプ細胞による貪食が観察された。Roundタイプの細胞はデクストランに対しても貪食能を示さなかった。グルココルチコイド投与及び標識高分子量デクストランを用いる実験系は*in situ*でマクロファージの貪食を観察するための有効な方法であることがわかった。さらに、超微形態的特徴を観察した結果、Dendriticタイプはライソゾーム等が見られる典型的なマクロファージの特徴を有していた。これに対し、Roundタイプの細胞は小型の卵円形で、細胞に占める核の割合が大きく、Mac-2陽性の細胞質には数個のミトコンドリア及び小型の空胞が観察され、核には一定量のheterochromatinや若干のindentationが見られる等、既知の細胞種とは異なる特徴を示した。こうした結果から、マウス胸腺のマクロファージ亜群はフェノタイプ・形態・存在部位・機能の点で異なる集団であることがわかった。これら三種の亜群に、IDCに相当すると考えられる集団を合わせ、マウス胸腺のマクロファージ系細胞の多様性が明らかになった。

## 審査結果の要旨

胸腺の機能を理解するためには、胸腺微小環境を構成するストローマ細胞への理解が不可欠である。にもかかわらず、特にマウスでは、胸腺のストローマの一員であり、胸腺内に広く分布しているマクロファージに関する研究はこれまで少なかった。本研究は、胸腺マクロファージのフェノタイプ・形態・局在・機能の差を検討することで、マウス胸腺マクロファージ系細胞が数種の亜群から成る多様な系であることを明らかにした。

本研究では数種のマクロファージ・マーカーを用いて免疫組織学的に検索し、マウス胸腺のマクロファージが三種の亜群（Dendritic, Round, Flat）から成ることを示したが、マーカーの組み合わせを変えながら何度か二重染色を行うことで、細胞のフェノタイプを正確に解析しようと試みている。これまでの報告はほとんどが単染色によるもので、複数のマーカー間の関係が明らかでないという問題点があった。本研究が一貫して多重染色の方法を用いている点は評価される。

また本研究では、亜群間の貪食能の差を *in situ* で解析するため、ステロイド投与により胸腺リンパ球に細胞死を誘導した条件下のマクロファージを、TUNEL法（細胞核DNA断片化の指標）とマクロファージ・マーカー（Mac-2）との二重染色によって観察している。さらに、蛍光標識高分子量デクストランに対する貪食を二重染色によって観察する方法も試み、マクロファージ亜群が貪食能の点でもヘテロな集団であることを示した。

胸腺には他にマクロファージ系細胞として、樹状細胞DC及び指状嵌入細胞IDCの存在が報告されている。本研究では代表的なDCのマーカーであるCD11cとマクロファージ・マーカー（Mac-2）との二重染色による検索を行い、マクロファージ亜群とDC、IDCとの異同を検討している。本研究のマクロファージ亜群は、いずれも報告されているDC、IDCとは異なるフェノタイプを持つ別個の集団であることが示されたが、髄質にはこれらの亜群とは別にIDCに相当すると考えられる集団が認められた。

さらに本研究では、免疫電顕による観察を行い、マクロファージ亜群がいかなる細胞種から構成されるかを検討している。その結果、Dendriticタイプは典型的な組織マクロファージの特徴を有するのに対し、Roundタイプの細胞は既知の細胞種とは異なる特徴を有することを示した。しかしながら、Roundタイプはその由来や機能が明らかでないという問題点が残る、この点はさらに検討が必要である。本研究は、報告に乏しいマウス胸腺のマクロファージ系細胞の多様性を、一貫して *in situ* における解析によって示した点に価値があり、Roundタイプ等の新知見を得、学位論文に十分値するものと考えられる。