

学位論文題名

マウス胸腺・脾臓細胞における NK-T 細胞の  
補体感受性亢進とそのメカニズム

学位論文内容の要旨

はじめに

近年、新しいリンパ球亜群として NK-T 細胞が同定され、注目されている。NK-T 細胞は T 細胞受容体複合体 (TCR complex) と NK 細胞のマーカーである NKR-P1(NK1.1)を同時に発現しており、活性化/メモリー T 細胞の表現型と類似している。マウス NK-T 細胞は、メインストリームの T 細胞と比べて低レベルの TCR を発現し、また TCR レパートリーは限定されている。NK-T 細胞は、主に CD4<sup>+</sup>8<sup>-</sup> (CD4<sup>+</sup>) と CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> (DN) の 2 つのサブポピュレーションにわけられるが、最近 CD8<sup>+</sup>の NK-T 細胞の存在も明らかになった。

NK-T 細胞は、抗 CD3 抗体による刺激に対して、超急性に大量の IL-4 と IFN- $\gamma$  を産生し、これら IL-4 , IFN- $\gamma$  は、その後のヘルパー T 細胞の免疫応答の型を決定する。また NK-T 細胞は Fas-L を発現し、Fas 陽性の腫瘍細胞、DP 胸腺細胞を障害する。さらに種々の自己免疫疾患で NK-T 細胞の減少が報告されている。

著者の教室ではウサギ補体のみの処理によって、NK-T 細胞が減少することを発見した。本研究では、NK-T 細胞の補体感受性亢進について、正常、ループスモデル、TCR トランスジェニックマウスなどを用いて解析し、またループスモデルマウスにおける NK-T 細胞減少の有無について検討した。

方法

胸腺あるいは脾臓の単一浮遊細胞に 10%になるよう補体を加え、恒温槽にて 37℃, 30 分間 incubate した。メディウム群は RPMI メディウム (10%牛胎児血清添加)のみを加え、同様の操作を行った。一部の実験においては、正常マウス (B6, B10.D2) より別途採取した血清を非働化したものを加え、4℃, 30 分間 incubate, 洗浄してから、同様な補体処理を行った。

抗 Fc $\gamma$ レセプター抗体, 2.4G2, を培養前, 後の各細胞検体に加え, 抗体の非特異的結合をブロックした. 各抗体を加え 4°C で 20 分間反応させ, TCR $\alpha$  $\beta$  / NK1.1, CD4 / NK1.1, CD4 / CD8, 及び Thy1.2 / B220 の組み合わせで 2 重カラー染色を行った. 解析より死細胞を除くため, propidium iodide を加えた後, FACScan にてデータの取り込み, 及び解析を行った.

## 結果

正常 B6 (H-2<sup>b</sup>)マウスでは, 補体処理によって胸腺の NK-T, CD4<sup>+</sup>NK-T, CD4<sup>+</sup>NK-T, DN の各細胞分画の有意な減少が認められた. また, 脾臓においても, NK-T 細胞分画の有意な減少が観察された. ウサギ補体を非働化した場合には, これら細胞亜群の減少は認められなかった. しかし B 細胞, 抗体の存在しない DO11.10/RAG-1<sup>-/-</sup>/B10.D2 マウスにおいては, 補体処理による NK-T 細胞の減少は認められなかった.

B10.D2, DO11.10/B10.D2 マウスでも B6 マウス同様, 胸腺の NK-T 細胞分画の有意な減少が認められた. 従って, DO11.10/RAG-1<sup>-/-</sup>/B10.D2 マウスの NK-T 細胞が補体感受性を示さないのは, H-2 型の違いや, DO11.10 TCR 発現等に起因せず, 血清中抗体が欠損することによることが示唆された. しかし, DO11.10/RAG-1<sup>-/-</sup>/B10.D2 マウスの胸腺, 脾臓細胞を正常マウス由来の血清と incubate 後, 補体で処理したが, NK-T 細胞の減少は認められなかった.

次に, NK-T 細胞の減少が報告されている B6 *lpr* マウスの胸腺, 脾臓 NK-T 分画を調べたが, 正常 B6 とほぼ同等の割合で存在し, 加齢によっても有意な減少は認められなかった. また B6 *lpr* マウスでも補体処理によって, 胸腺, 脾臓の NK-T 各細胞分画で著明な補体感受性が認められた. NZB, NZW, BWF1 マウスにおける NK-T 細胞は, 正常 B6 と比べ, 加齢に伴う NK-T 細胞の減少傾向を示した. また BWF1, NZW マウスの胸腺 NK-T 細胞は, 補体処理により減少したが, NZB マウスでは減少傾向は認められなかった. 脾臓 NK-T 細胞においては, いずれの NZ 系マウスにおいても, NK-T 細胞の有意の減少は認められなかった.

## 考察

本研究においては, NK-T 細胞ポピュレーションが特異的に補体感受性亢進を示す現象のメカニズムについて, 正常マウス, ループモデルマウス, TCR トランスジェニックマウスなどを用いて解析した. その結果, 再現性をもって

NK-T 細胞が補体単独処理で減少し、その原因としてあらかじめ NK-T 細胞上に自己抗体が結合していることを示唆する結果が得られた。すなわち、B 細胞や抗体が存在するマウス系では、補体処理によって NK-T 細胞の減少は認められるが、B 細胞や抗体の存在しない RAG-1<sup>-/-</sup>の TCR Tg マウスでは、同様の処理によっても NK-T 細胞の減少は認められなかった。また、これらの結果は、ウサギ補体中に抗マウス NK-T 抗体が存在する可能性も否定するものと考えられた。

以上の結果から、著者は生体内で NK-T 細胞に特異的な抗体が結合し、そのため NK-T 細胞が選択的に補体感受性亢進を示すと考えている。すなわち NK-T 細胞は CD1 拘束性に glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカー蛋白を認識し、B 細胞をヘルプし、抗 GPI アンカー蛋白抗体を産生させる。分泌された抗 GPI アンカー蛋白抗体が近傍の NK-T 細胞の表面 GPI アンカー蛋白に結合し、その結果 *in vitro* の補体処理により NK-T 細胞が選択的に障害されると考えている。しかし本研究では正常マウス血清中に NK-T 特異抗体を検出することはできなかった。これは、抗体と NK-T 細胞の作用が *in vivo* において比較的緩徐に、もしくは他の因子と相まって進行していくような性質のものであるため、今回の *in vitro* の系では再現できなかったと考えられる。胸腺と比べ脾臓 NK-T 細胞の補体感受性は一般的に高くなかった。恐らく、血清中補体と接触する機会の多い脾臓においては、抗体の結合した NK-T 細胞が *in vivo* で除去されるために、このような現象が見られたと考えている。

また、他のメカニズムとして補体制御因子の関与も考えられるが、調べた範囲では正常レベルの補体制御因子の発現が NK-T 細胞上に認められた。

血清中の抗体が結合する他のメカニズムとして、Fc $\gamma$ レセプターの関与が考えられる。しかし、Fc $\gamma$ レセプターは補体感受性を示さない他の細胞にも発現しており、また、Fc $\gamma$ レセプターを介する抗体の結合が、補体カスケードを活性化することは、分子構造的に考え難いと結論した。

これまで、自己免疫疾患患者の NK-T 細胞減少と、多くのループスモデルマウスにおける NK-T 細胞の減少が報告されている。しかし、著者が検索した範囲では、必ずしも全てのループスモデルで有意な NK-T 細胞減少は認められなかった。これらの違いは恐らく、ループス発症のメカニズムの違いによると考えられた。したがって、NK-T 細胞の補体感受性亢進が、ループスモデル全般での NK-T 細胞減少、機能異常とどのように関係するかは今後の問題と思われる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 西 村 正 治

副 査 教 授 小 野 江 和 則

学 位 論 文 題 名

## マウス胸腺・脾臓細胞における NK-T 細胞の 補体感受性亢進とそのメカニズム

近年、新しいリンパ球亜群として NK-T 細胞が同定され、注目されている。著者の教室ではウサギ補体のみの処理によって、NK-T 細胞が減少することを発見した。本研究では、NK-T 細胞の補体感受性亢進について解析し、またループスマウスにおける NK-T 細胞減少の有無について検討した。

胸腺あるいは脾臓の単一浮遊細胞に補体を加え、恒温槽にて incubate した。メディウム群は RPMI メディウムのみを加え、同様の操作を行った。一部の実験においては、正常マウス (B6, B10.D2) より別途採取した血清を非働化したものを加え incubate, 洗浄してから、同様な補体処理を行った。その後、各種 FACS 解析を行った。

正常 B6 (H-2<sup>b</sup>)マウスでは、補体処理によって胸腺の NK-T, CD4<sup>+</sup>NK-T, CD4<sup>-</sup>NK-T, DN の各細胞分画の有意な減少が認められた。また、脾臓においても、NK-T 細胞分画の有意な減少が観察された。しかし DO11.10/RAG-1<sup>-/-</sup>/B10.D2 マウスにおいては、補体処理による NK-T 細胞の減少は認められなかった。B10.D2, DO11.10/B10.D2 マウスでも B6 マウス同様、胸腺の NK-T 細胞分画の有意な減少が認められた。よって、DO11.10/RAG-1<sup>-/-</sup>/B10.D2 マウスの NK-T 細胞が補体感受性を示さないのは、血清中抗体が欠損することによることが示唆された。しかし、DO11.10/RAG-1<sup>-/-</sup>/B10.D2 マウスの胸腺、脾臓細胞を正常マウス由来の血清と incubate 後、補体で処理したが、NK-T 細胞の減少は認められなかった。

次に、NK-T 細胞の減少が報告されている B6 *lpr* マウスの胸腺、脾臓 NK-T 分画を調べたが、正常 B6 とほぼ同等の割合で存在し、加齢によっても有意な減少は認められず、正常な B6 と同レベルの補体感受性が認められた。NZB, NZW, BWF1 マウスにおける NK-T 細胞は、正常 B6 と比べ、加齢に伴う NK-T 細胞の減少傾向を示した。また BWF1, NZW マウスの胸腺 NK-T 細胞は補体感受性を、NZB マウスでは抵抗性を示した。脾臓 NK-T 細胞においては、いずれの NZ 系マウスにおいても、補体感受性は認められなかった。これらの違いは恐らく、ループス発症のメカニズムの違いによると考えられた。

本研究においては、補体感受性の原因としてあらかじめ NK-T 細胞上に自己抗体が結合していることを示唆する結果が得られた。すなわち NK-T 細胞は CD1 拘束性に glycosylphosphatidylinositol (GPI)アンカー蛋白を認識し、B 細胞をヘルプし、抗 GPI アンカー蛋白抗体を産生させる。分泌された抗 GPI アンカー蛋白抗体が近傍の NK-T 細胞の表面 GPI アンカー蛋白に結合し、その結果 *in vitro* の補体処理により NK-T 細胞が選択的に障害され

ると考えられた。

胸腺と比べ脾臓 NK-T 細胞の補体感受性は一般的に高くなかった。恐らく、血清中補体と接触する機会の多い脾臓においては、抗体の結合した NK-T 細胞が *in vivo* で除去されるために、このような現象が見られたと考えている。

公開発表に際しては、副査の西村（正治）教授から、血清との培養によっても補体感受性が回復しないこと、自己抗体付着以外の補体感受性亢進の可能性、*in vivo* での NK-T 細胞と自己免疫疾患の発症、病態との関連、正常マウスの補体感受性について、新生児期ではどうか、についての質問があった。

次いで主査の上出教授（遺制研・分子免疫）から、補体感受性と NK-T 細胞の heterogeneity, 結合している抗体染色、検討した補体制御因子、PI-PLC 処理した細胞について、副査の小野江教授（遺制研・免疫応答）から、lupus モデル血清使用についての質問があった。

次いでフロアの西村（孝司）教授（遺制研・免疫制御）から、補体中の抗体、ロット差、細川教授（遺制研・癌病態）から、マウス血清中の補体活性、*in vivo* での補体の NK-T 細胞に対する影響について、質問があった。

いずれの質問に対しても、申請者は自分の研究の経験、本文中の記載などを引用し、ほぼ妥当かつ適切に解答した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。