

2) 胸腺外分化 T 細胞の分化とサイトカイン

新潟大学医学部医動物学教室

宮路 智香子

Development of Extrathymic T cells and Cytokines

Chikako MIYAJI

*Department of immunology,
Niigata University School of Medicine*

Recent studies demonstrated that murine liver contained extrathymically differentiated T cells. These cells express intermediate (int) level of TCR (CD3) and IL-2R β chain. However, it has been unknown about the development of these int TCR cells without requirement of thymus. Here, we investigated how the int TCR cells were differentiated and proliferated. The int TCR cells but not the other peripheral T cells responded to exogenous IL-7 which supported TCR cell differentiation in thymus. Similar to the bone marrow (BM), the liver contained hematopoietic stem cells (c-kit⁺Lin⁻) which enabled to reconstitute T, B, macrophage and myeloid cells in irradiated SCID mice. *In vitro*, the hematopoietic stem cells in the liver did not differentiate into the int TCR cells either in the presence of fetal thymus or thymic stromal cells. However liver-derived stromal cells which could produce IL-7 and other cytokines, supported int TCR cell differentiation. On the other hand, those in BM did not develop the int TCR cells in any condition. Taken together, the int TCR cells in the liver are supposed to be developed in situ from the hematopoietic stem cells in the liver in association with some cytokines like IL-7.

Key words: extrathymic T cells, IL-7, hematopoietic stem cells, SCID mouse, liver primary cultured cells.

胸腺外分化 T 細胞, IL-7, 造血幹細胞, SCID マウス, 肝初代培養細胞

はじめに

一般に T 細胞は胸腺で分化, 増殖すると考えられている。しかし, 最近では一部の T 細胞が胸腺以外で分化する可能性を論じた報告が数多く見られる。肝類洞に

は胸腺由来の T 細胞の他に, CD3 の蛍光強度が中等度 (intermediate) で, 常時 IL-2R β 鎖を発現している独自の T 細胞, intermediate TCR (int TCR) 細胞が存在する¹⁾。これは胸腺を欠損したヌードマウスにも見られることなどから, 胸腺外分化 T 細胞の一つ

Reprint requests to: Chikako MIYAJI,
Department of Immunology, Niigata,
University School of Medicine,
1 Asahimachi-dori,
Niigata, City, 951-8510, JAPAN.

別刷請求先: 〒951-8510 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部医動物学教室 宮路智香子

表1 int TCR 細胞の各種サイトカインに対する反応性

Organ	Cells	³ H-T dR incorporation (cpm ± SD)			
		Medium	IL-1 (1000 U/ml)	IL-7 (100 U/ml)	IL-2 (100 U/ml)
Liver	int TCR cells	337 ± 108	1,446 ± 43	14,384 ± 1,484	128,325 ± 13,697
	High TCR cells	328 ± 49	1,275 ± 58	1,740 ± 190	5,600 ± 305
Spleen	High TCR cells	254 ± 47	569 ± 21	523 ± 57	1,691 ± 220
Thymus	int TCR cells	140 ± 10	308 ± 107	10,845 ± 397	5,538 ± 730
	High TCR cells	191 ± 18	205 ± 101	1,940 ± 274	820 ± 336

肝の int TCR 細胞は IL-7 及び IL-2 に対して有意に反応した。胸腺、脾、及び肝の胸腺由来とされる T 細胞 (High TCR 細胞) は IL-2 のみ反応した。

であると言われている。また、最近では、NK 細胞のマーカーである NK 1.1 を発現した T 細胞、すなわち NKT 細胞の存在が明らかとなり²⁾⁻⁴⁾、これも胸腺外分化する可能性が示唆されている。肝の int TCR 細胞にはこの NKT 細胞が含まれることがわかっている⁵⁾。本研究では肝の胸腺外分化 int TCR 細胞のサイトカイン、特に IL-2、IL-7 に対する反応性を解析した。さらに、この細胞群が成体肝に存在する独自の造血幹細胞から局所で分化する可能性についても報告する。

胸腺外分化 int TCR 細胞の IL-2、IL-7 に対する反応性

int TCR 細胞は、前述のように常時 IL-2 R β 鎖を発現している。これを介して働くサイトカインはいくつかあるが⁶⁾、中でも IL-7 は胸腺において T 細胞の分化、増殖に大きく関与している。そこで、肝リンパ球から sorting により int TCR 細胞を分離し、IL-2 あるいは IL-7 の存在下で培養し、その反応性について解析した (表 1)。肝の int TCR 細胞は IL-2、IL-7 のどちらに対しても有意に反応した。一方、胸腺や脾の T 細胞、および肝の胸腺由来とされる T 細胞 (High TCR 細胞) は IL-2 にのみ反応した。FACS 解析でも IL-7 に反応するのは肝の int TCR 細胞であった。また、IL-7 によるシグナルを伝達する IL-7 R α 鎖の発現も肝の int TCR 細胞に有意に高かった⁷⁾。

肝における造血幹細胞の存在

胸腺では胎仔肝からの造血幹細胞をうけ、胎生後期から T 細胞分化が始まり、出生直後にはすでに成体と変わらない細胞構成を示す。一方、肝での T 細胞の出現は他のリンパ組織と同様、生後 3 日目以降であることか

ら、肝の int TCR 細胞の独自性について疑問視する報告もみられる。しかし、肝での T 細胞出現の遅れは、造血幹細胞の供給組織が生後は骨髄に移行することの反映であるかもしれない。また、成体の肝自体に独自の造血幹細胞が存在し⁸⁾、T 細胞が分化する可能性も考えられる。そこで我々は後者の可能性について SCID マウスを用いて検討した。

SCID マウスでは RAG (recombination activation gene) の異常により T、B 細胞の分化に不可欠な遺伝子の再構成ができない。従って、胸腺では DN (CD4⁻CD8⁻) 細胞から DP (CD4⁺CD8⁺) 細胞を経て SP (CD4⁺あるいは CD8⁺) 細胞へという T 細胞の分化は DN 細胞の段階で停止している。また、骨髄や末梢組織に B 細胞は見られない。このマウスに放射線を照射して NK 細胞、myeloid 系細胞を除去した後、正常なマウスの骨髄より得た造血幹細胞 (c-kit⁺Lin⁻) を移入すると、移入細胞由来の T、B 細胞が再構築される。すなわち胸腺では DP および SP 細胞が、骨髄では B 細胞が出現する。さらには移入細胞由来のマクロファージや顆粒球も出現する。

同様の実験を成体肝より分離した細胞を用いて行った。肝に c-kit⁺Lin⁻細胞が存在するのを確認後、これを SCID を移入すると 1 週間後には胸腺の再構成がみられた。これは骨髄造血幹細胞を移入した場合よりも有意に早かった。4 週間後には他のリンパ組織に T、B 細胞、マクロファージ、顆粒球が出現すると共に、肝では NKT 細胞を含む int TCR 細胞が認められた。このことから、肝には骨髄と同様な多能性造血幹細胞だけでなく、より早く T 細胞に分化する前駆細胞が存在すること明らかとなった⁹⁾。

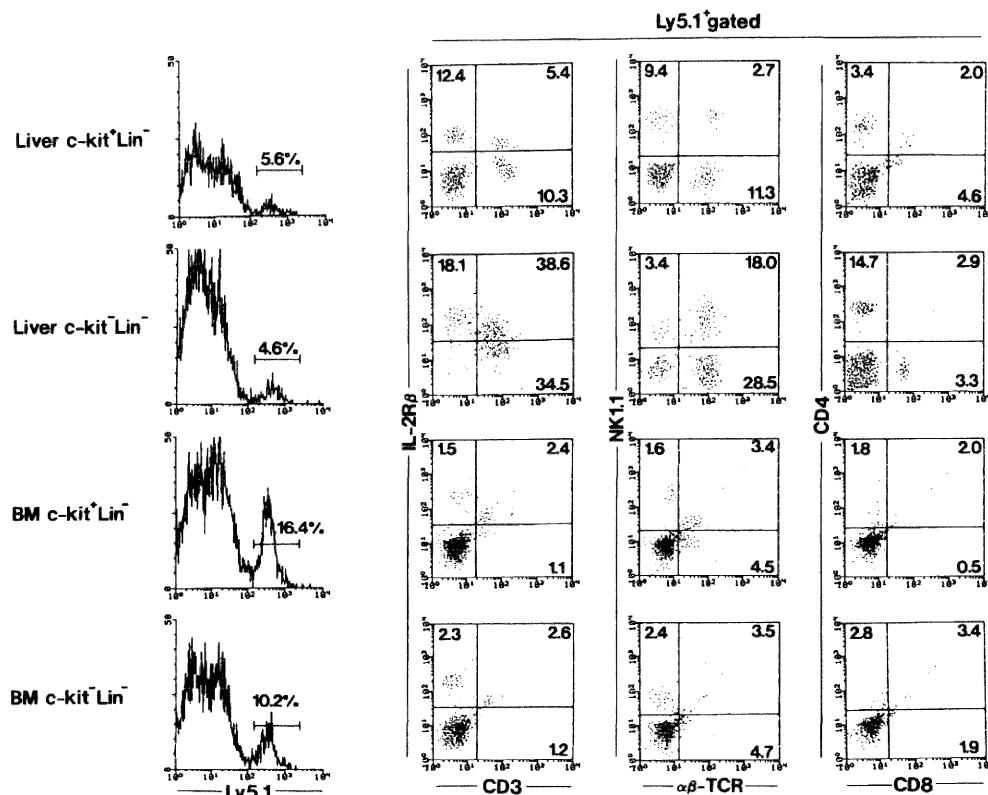


図1 肝及び骨髄の造血幹細胞と肝初代培養細胞との共培養

肝の造血幹細胞からは NKT 細胞を含む int TCR 細胞が認められた。しかし、骨髄を幹細胞とした場合、Myeloid 系細胞が主体であった。

胸腺外分化 T 細胞の起源と分化

SCID マウスを用いた実験から、肝の int TCR 細胞が肝の造血幹細胞由来である可能性が考えられる。しかし、その分化の場については特定できない。そこで *in vitro* の培養系を使つての解析を試みた。胎仔胸腺をデオキシグアノシンで処理すると、中にある T 細胞を除去することができる。これをそれぞれ骨髄、肝の造血幹細胞と共に高濃度酸素下 (70~80%) で器官培養を行ったところ、肝の造血幹細胞はより早く DP 細胞へと分化した。また胸腺由来のストローマ細胞 (Tst-4) とそれぞれの幹細胞との共培養を行うと、共に B および myeloid 系細胞への分化が認められた。これらの結果は前述の SCID マウスを用いた実験結果と同様であった。次に肝での細胞分化の可能性を検討するために、肝実質細胞を含む肝初代培養細胞をストローマ細胞として

幹細胞との共培養を行った (図 1)。肝初代培養細胞は、生後 2 週のマウス肝を Dispace で処理して得たもので、造血に必要な各種のサイトカイン (IL-3, 6, 7 および SCF, G-CSF, GM-CSF, M-CSF) を産生することを RT-PCR で確認している。これを用いて共培養を行うと、3 日後には細胞のコロニーが出現した。その細胞構成をみると、骨髄を幹細胞とした場合には myeloid 系細胞が主体なのに対し、肝の幹細胞からは NKT 細胞を含む int TCR 細胞が認められた。我々は、肝初代培養から肝ストローマ細胞株を樹立したが、これを用いても同様の結果であった。以上の結果から、肝の int TCR 細胞は肝の造血幹細胞と肝ストローマ細胞の組み合わせでのみ出現することが明らかとなった。

おわりに

ここでの実験結果から、肝は独自の造血幹細胞を有し、

そこから局所で int TCR 細胞を分化させようと考えられた。またこの課程には、胸腺内での分化と同様に IL-7 が大きく関与していることが示唆された。肝以外の胸腺外分化 T 細胞としては腸管上皮内リンパ球 (iIEL) があり、これらについて多くの解析がなされており、腸管上皮は IL-7 を産生し、更には成体の腸管内に T 細胞の前駆細胞が存在することも報告されている¹⁰⁾。我々の実験結果とこれらの知見を考えあわせると、T 細胞の分化経路として、局所に独自に存在する前駆細胞からそれぞれの器官内で分化する可能性が示唆され、従来のように胸腺のみが T 細胞の分化の場であるという考えは大きく変わりつつあるものと思われる。

参 考 文 献

- 1) Watanabe, H, Iiai, T, Kimura, M., Ohtsuka, K., Tanaka, T., Miyasaka, M., Tsuchida, M., Hanawa, H. and Abo, T.: Characterization of intermediate TCR cells in the liver of mice with respect to their unique IL-2R expression. *Cell. Immunol.*, **149**: 331~342, 1993.
- 2) Crispe, IN., Moore, MW., Husmann, LA., Smith, L, Bevan, MJ., and Shimonkevitz, RP.: Differentiation potential of subsets of CD4⁻CD8⁻ thymocytes. *Nature*, **329**: 336~339, 1987.
- 3) Papiernik, M. and Pontoux, C.: In vivo and in vitro repertoire of CD3⁺CD4⁻CD8⁻ thymocytes. *Int. Immunol.*, **2**: 407~412, 1990.
- 4) Arase, H., Arase, N., Ogasawara, K., Good, RA., and Onoe, K.: An NK1.1⁺CD4⁺8⁻ single-positive thymocyte subpopulation that expresses a highly skewed T-cell antigen receptor V β family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 6506~6510, 1992.
- 5) Watanabe, H., Miyaji, C., Kawachi, Y., Iiai, T., Ohtsuka, K., Iwanaga, T., Takahashi-Iwanaga, H., and Abo, T.: Relationships between intermediate TCR cells and NK1.1⁺T cells in various immune organs. NK1.1⁺T cells are present within a population of intermediate TCR cells. *J. Immunol.*, **155**: 2972~2983, 1995.
- 6) Giri, JG., Ahdieh, M., Eisenman, J., Shanebeck, K., Grabstein, K., Kumaki, S., Namen, A., Park, LS., Cosman, D., and Anderson, D.: Utilization of the β and γ chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO. J.*, **13**: 2822~2830, 1994.
- 7) Miyaji, C., Watanabe, H., Osman, Y., Kuwano, Y., and Abo, T.: A comparison of proliferative response to IL-7 and expression of IL-7 receptors in intermediate TCR cells in the liver, spleen, and thymus. *Cell. Immunol.*, **169**: 159~165, 1996.
- 8) Taniguchi, H., Toyoshima, T., Fukao, K., and Nakauchi, H.: Presence of hematopoietic stem cells in the adult liver. *Nature Medicine*, **2**: 198~203, 1996.
- 9) Watanabe, H., Miyaji, C., Seki, S., and Abo, T.: c-kit⁺ stem cells and thymocyte precursors in the liver of adult mice. *J. Exp. Med.*, **184**: 687~693, 1996.
- 10) Kanamori, Y., Ishimaru, K. Nanno, M., Maki, K., Ikuta, K., Nariuchi, H., and Ishikawa, H.: Identification of novel lymphoid tissues in murine intestinal mucosa where clusters of c-kit⁺IL-7R⁺Thy1⁺ lympho-hemopoietic progenitors develop. *J. Exp. Med.*, **184**: 1449~1459, 1996.

司会 それでは、ただいまの演題に、御質問はございませんか。どうぞ。

山本 渡部先生にお聞きすれば良かったのかもしれませんが、肝臓にある NKT と呼ばれる細胞群に 2 種類あるといわれたわけですが、両方の細胞をまとめて characterize されたということでしょうか。その二つの間にどういう差があると分かっているのでしょうか。さきほどの話で CD4 dominant 型と CD8 dominant 型というのがあることは分かったのですが、他にどんな所が分かっているのでしょうか。

渡部 肝臓の胸腺外分化 T 細胞には二つの細胞亜群があることが分かっております。現在主に注目されているのは CD4 陽性あるいは CD4, CD8 陰性の double negative の細胞です。一方、CD8 陽性細胞に関しては今のところ由来がまだはっきりしておりません。我々は肝の T 細胞分化を in vitro の系で試みたわけですが、この系を用いることでこの点に関して解明できるのではと思っています。ただ、今のところ、CD8 陽性細胞の出現は見られておりません。従って、肝臓の胸腺外分化 T 細胞は CD4 陽性及び double negative 細胞が優位であると考えています。

司会 他にございませんか。どうぞ。

内藤 肝臓から得た stroma cell の培養と言うこと

でお示いただきましたが、この stroma cell のサイトカインの発現などは、他の骨髄から得られた stroma cell, たとえば, ST 2 などとどのような違いがあるのでしょうか。

宮路 骨髄から得られた stroma cell については今の時点では調べておりません。肝から得られた stroma cell に関しましては、細胞表面マーカーは class I 抗体である M1/42 及び CD1d とも陽性です。それ以外の細胞表面マーカーや貪食能などは、今後調べていく予定です。

司会 どうぞ。

渡部 胸腺由来の stroma cell に関しましては、PCR 法によるサイトカインのメッセージは肝由来の細

胞とほぼ同じでした。骨髄由来の stroma cell については現在検討中です。サイトカインのメッセージの有無では特異性は明確とはならないかもしれません。肝由来の stroma cell は CD1 抗原を強く表出しています。CD1 抗原は NKT 細胞の ligand と言われています。これが肝 stroma cell で発現されていることは、肝臓で NKT 細胞が分化する可能性を示唆しているのではないかと考えております。

司会 サイトカインと接触して成熟しますから、表面抗原と関係があるわけですね。それではどうもありがとうございました。それでは、3 番目の内藤先生お願いします。

3) マクロファージコロニー刺激因子欠損マウス (*op*) の 加齢による骨髄造血の変化

新潟大学医学部第 2 病理 内藤 眞・高塚 尚和・江部 祐輔
伊藤 重雄・梅津 哉

Bone Marrow Hematopoiesis in Aged Osteopetrosis (*op*) Mutant Mice
Defective in the Production of Macrophage Colony-stimulating Factor

Makoto NAITO, Hisakazu TAKATSUKA, Yusuke EBE
Shigeo ITO and Hajime UMEZU

*Second Department of Pathology,
Niigata University School of Medicine,
Niigata, Japan*

Mice homozygous for the osteopetrosis (*op*) mutation are characterized by defective differentiation of osteoclasts, monocytes, and tissue macrophages due to a lack of functional macrophage colony-stimulating factor (M-CSF/CSF-1) activity. In young (4-6 week-old) *op/op* mice, the bone marrow cavities were filled with spongy bone. In aged (50-72-week-old) *op/op* mice, the bone marrow cavities were markedly reconstructed and marrow hematopoiesis was expanded. Numbers of osteoclasts and bone

Reprint requests to: Makoto NAITO,
Second Department of Pathology,
Niigata University School of Medicine,
Niigata, 951-8510 JAPAN

別刷請求先: 〒951-8510 新潟市旭町通 1 番町 757
新潟大学医学部第 2 病理 内藤 眞