

原

著

## 胸腺外分化T細胞の性差とアンドロゲンによる制御

新潟大学医学部泌尿器科学教室（主任：佐藤昭太郎教授）

木村元彦

Sex Difference of Extrathymic T-Cells  
and Its Regulation by Androgen

Motohiko KIMURA

*Department of Urology*  
*Niigata University School of Medicine*  
(Director: Prof. Shotaro SATO)

Male predominance of malignant disease and female predominance of autoimmune disease are widely known in humans. To elucidate one of the underlying mechanisms, we examined whether sex differences exist at the level of extrathymic T cells in various organs of mice under physiological conditions. Effects of orchiectomy or testosterone administration were also examined. Extrathymic T cells expressing CD3 of intermediate intensity (*i.e.*, intermediate TCR cells) and a high level of IL-2 receptor  $\beta$ -chain (IL-2R $\beta$ ), and thymus-derived T cells expressing of TCR of bright intensity (*i.e.*, bright TCR cells) and lacking IL-2R $\beta$ , were identified by immunofluorescent tests. Of each three strain tested, it was demonstrated that intermediate TCR cells were much more predominant in the liver and some other organs in female mice than in male mice. In the liver of orchiectomized mice, the number of mononuclear cells increased and intermediate TCR cells became predominant as if the mice were female. Testosterone replacement canceled the immunological effect of orchiectomy. Considering the fact that extrathymic T cells comprise a considerable proportion of self-reactive forbidden clones and possess cytotoxic activity against syngenic tumor cells, the present results might suggest a possible relationship between physiologically low levels of extrathymic T cells and the male predominance of malignancy.

Key words: extrathymic T cell differentiation, intermediate TCR cells, androgen, sex difference, flow cytometry

胸腺外分化T細胞, intermediate TCR 細胞, アンドロゲン, 性差, フローサイト  
メトリー

Reprint requests to: Motohiko KIMURA,  
Department of Urology, Niigata  
University School of Medicine,  
Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町  
新潟大学医学部泌尿器科学教室

木村元彦

## 緒 言

T細胞はこれまで主に胸腺内 (intrathymic) で分化成熟するとされてきた。しかし先天的に胸腺を欠くヌードマウスや、加齢に伴って胸腺の萎縮したヒトや動物でも末梢には通常のT細胞とは異なる性状を持つT細胞が存在することから、胸腺以外でのT細胞の分化経路もあることが示唆されていた<sup>1)</sup>。1990年頃から、胸腺で分化する通常のT細胞 (regular T cells) の他に、胸腺外 (extrathymic)、特に肝臓、腸管上皮でもT細胞は分化成熟していることが明らかとなってきた<sup>2)3)</sup>。これはマウスの肝臓においては、細胞上の T cell receptor (TCR) の数が通常のT細胞 (bright TCR cells) より少なく、胸腺の未熟T細胞 (dull TCR cells) より多いため、'intermediate TCR 細胞' と呼ばれている<sup>4)</sup>。胸腺内分化T細胞は、CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> の double positive ステージから CD4<sup>+</sup> または CD8<sup>+</sup> になる際に自己応答性クローンが除去される negative selection を受ける。しかし肝臓における胸腺外分化では、CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> (double positive) のステージがなく、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>8<sup>-</sup> の細胞から構成されることより、negative selection を受けにくいと考えられる<sup>5)</sup>。その機能については、加齢<sup>6)7)</sup>、妊娠 (M. Kimura, et al., 投稿準備中)、細菌感染<sup>8)9)</sup>、自己免疫疾患<sup>2)10)</sup>、担癌時<sup>11)12)</sup> に活性化されることが明らかとなってきた。これらのことから、主に胸腺内分化T細胞は外来抗原の排除、胸腺外分化T細胞は禁止クローンを含むことから異常自己の監視がそれぞれの役割と考えられている<sup>5)13)</sup>。

ところで、我々が日常診療で経験する疾患には、性差が免疫系においては病勢に大きく影響していると想像されるものも多い。一般に悪性腫瘍は男性で発生頻度が高いものが多く、反対に SLE を代表とする自己免疫疾患は女性で発生頻度が高いものが多い。性差や性ホルモンが、胸腺に及ぼす影響はかなり検討されている<sup>14)</sup> が、胸腺外分化T細胞に対する影響はほとんど解明されていない。このため、ホルモン刺激つまり去勢やアンドロゲン投与が、免疫系とくに胸腺外分化T細胞に及ぼす影響を、マウスを用いて単核球数の変化と表面マーカーを指標にして解析した。

## 材料及び方法

### 1. マウス

C3H/HeN (C3H)、BALB/c (BALB)、及び C57BL/6 (B6) の雄及び雌マウスを日本チャールズリバー(株) (厚

木、神奈川) より購入し、新潟大学附属動物実験施設において SPF (specific pathogen-free) にて維持されている各週齢のマウスを用いた。26週齢の BALB/c-nu/nu マウス (雌) も、表面マーカー検索のコントロールとして用いた。

### 2. 精巣摘除術

5～8週齢の C3H 雄マウスに対して、Tribromoethanol 麻酔下にて、経腹的に両側の精索を結紮切断し、精巣を摘除した。それぞれ同週齢のマウスに開腹術 (sham operation) を行いコントロールとし、術後13, 19, 28, 30日後に屠殺した。

### 3. 性ホルモン

テストステロン (エンアルモンデポー; 帝国臓器製薬(株)、東京) は5～8週齢の C3H マウス (雄) の背部皮下に注射し、7, 14, 26日と経時的に屠殺し解析に供した。予備実験としてホルモン投与量を数段階に分けて免疫臓器に及ぶ影響をあらかじめ調べ、本実験の投与量 (10 mg) を決定した。あらかじめ精巣摘除術を行ったものに対しては術後12日目にテストステロン (20 mg) を皮下投与し、術後19日目に屠殺し解析した。

### 4. 細胞調整

マウスは、エーテル麻酔下に腋動静脈より脱血し、屠殺ののち肝臓、脾臓、胸腺などを摘出した。各臓器の湿重量を計測したのち、以前に報告した方法<sup>15)</sup> で単核球 (mononuclear cells, MNCs) を分離した。すなわち、肝臓はハサミで細切のち #200 のステンレススチールメッシュ上で圧平し、5 mM HEPES (Sigma chemical Co., St. Louis, MO) を含む非動化済み 2 % 新生仔ウシ血清 (NCS) 加 Eagle's MEM 培地 (日本製薬(株)、東京) に浮遊させた。2,000 rpm. 10分間遠心し沈渣 (cell pellet) をこの培地に再浮遊させ、Ficoll-Isopaque (比重 1.090) に重層し 2,500 rpm., 30分間の比重遠心を行った。培養液と Ficoll-Isopaque 液の interface を回収して、遠心、洗浄の後、肝の単核球として使用した。この方法で単核球を、肝実質細胞やその核、Kupffer cells から分離でき、これらの混入は 4 % 以下に抑えられるとされる<sup>15)</sup>。脾、胸腺、リンパ節、骨髄は同様に細切圧平したのち、遠心、再浮遊させて調整した。脾細胞は細胞数を計測後、0.83 % NH<sub>4</sub>Cl-0.17M Tris buffer で溶血させて使用した。末梢血は Ficoll-Paque 液 (Pharmacia Inc., Piscataway, NJ) を使用して分離した。

### 6. フローサイトメトリー解析

分離した単核球の表面マーカーは、モノクローナル抗体で 2 重免疫蛍光染色を行って調べた。用いた抗体は FITC-

conjugated anti CD3 (145-2C11; PharMingen, San Diego, CA), anti-CD8 (Lyt-2; PharMingen) と, biotin-conjugated anti-IL-2 receptor  $\beta$  chain<sup>16)</sup> (IL-2R $\beta$ ) (TM- $\beta$ 1; 東京都臨床医学総合研, 田中稔之

博士より供与), anti-CD4 (L3T4; PharMingen), anti-CD8 (Lyt-2; PharMingen) であった.  $10^6$ 個の MNC をエッペンドルフチューブに入れ, 2% NCS 加 PBS で遠心洗浄し, 各抗体を CD3/IL-2R $\beta$ , CD8/CD4, CD3/CD4+CD8 の組合せで加えた. 4℃で30分 incubation の後 PBS で洗浄, ビオチン化抗体に対しては PE-conjugated streptavidin (Becton-Dickinson, Mountain View, CA) を加えさらに30分 incubation し, 洗浄の後, FACSscan (Becton-Dickinson, 以下 FACS) にて解析した.

### 7. 有意差検定

性差の解析では3系統, 雌雄各9匹ずつ, その他の実験には3匹ずつを, コントロール群, 実験群として同時に解析し, Student's *t* test を用いて検定した. 2群間が等分散でない場合は Welch 法を用いた.

## 結 果

### 1. 各免疫臓器における intermediate TCR 細胞と bright TCR の表面マーカーによる同定

正常 BALB/c 雌マウス (26週齢) の肝, 脾, 胸腺などより分離した単核球を CD3 と IL-2R $\beta$  の2重染色

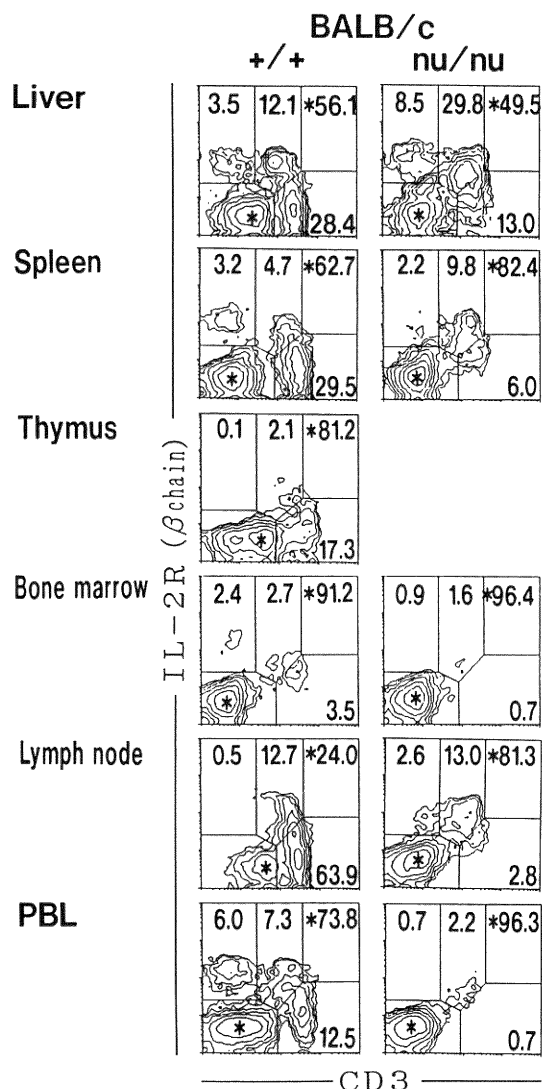


Fig. 1 BALB/c 正常マウス (+/+) とヌードマウス (nu/nu) (いずれも雌) の各臓器単核球の CD3 と IL-2R $\beta$  による2重染色のパターン

図中の数字は対応する分画の細胞の比率 (%) を示す (以下の Fig. でも同じ). 胸腺のないヌードマウスではT細胞の全てが intermediate TCR 細胞である.

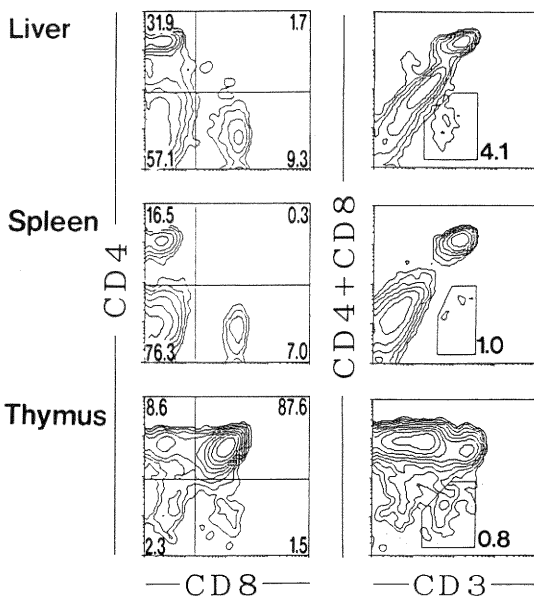


Fig. 2 正常マウス (C3H/HeN, 雌) の肝, 脾, 胸腺の CD8 と CD4, および CD3 と CD4+CD8 の2重染色パターン.

で解析すると、**Fig. 1** の左のカラム (+/+) に示すようになる。肝の単核球は、4 分画、すなわち  $CD3^{-}IL-2R\beta^{-}$  (おもに B cells),  $CD3^{-}IL-2R\beta^{+}$  (NK cells),  $CD3^{-}intermediate^{+}IL-2R\beta^{+}$  (intermediate TCR cells), そして  $CD3^{-}bright^{+}IL-2R\beta^{-}$  (胸腺由来の bright TCR cells) に分けられる。intermediate TCR 細胞は  $CD3$  の intensity が、bright TCR 細胞に比べて低く (約 1/5)、胸腺の未熟な dull TCR 細胞よりも高いため、この様に名付けられている<sup>4)</sup>。TCR- $\alpha\beta$  の発現は  $CD3$  と同様で、 $CD3$  と TCR- $\alpha\beta$  の 2 重染色で同一の分画であることが確かめられている<sup>17)</sup>。脾と末梢血 (PBL) の単核球は肝臓に近いパターンであったが intermediate TCR 細胞の割合は少なかった。胸腺はほとんどが  $IL-2R\beta^{-}$  であり、null cells, dull cells (=immature T cells), および bright TCR cells からなり、intermediate TCR 細胞はわずかながら認められる。リンパ節は、区分では intermediate TCR 細胞は 12% となっているが明らかなピークをつくっておらず bright TCR からの漏れ込みと考えられる。これまでの実験から、通常のマウスでは BALB, C3H, B6, A 系など系統を問わず、同様の細胞分画が同定された。週齢などで多少の変動があるものの、intermediate TCR 細胞の比率は肝臓で 10~20

%, 脾臓で約 5%, 胸腺は 1% 程度であり、bright TCR 細胞の比率は同じく肝で 20~30%, 脾では 20% 程度であった。

次に、先天的に胸腺を欠くヌードマウス (26 週齢, 雌) について、同様に  $CD3$  と  $IL-2R\beta$  の 2 重染色にて解析すると、**Fig. 1**, 右カラム (nu/nu) で示すように  $CD3^{+}$  の T 細胞は、肝, 脾, 骨髄, リンパ節, 末梢血のすべてにおいて intermediate TCR 細胞のみからなり、この細胞群は胸腺外由来であることが裏付けられた。一方、このマウスで欠如する bright TCR 細胞は胸腺由来であることが明らかにされた。

$CD4$  と  $CD8$  の発現を C3H マウス (8 週齢, 雌) で同様に解析すると (**Fig. 2**),  $CD4^{+}8^{-}$  の分画は  $CD4^{+}8^{+}$  に比して全臓器で優勢であり、胸腺では  $CD4^{+}8^{+}$  がほとんどを占めていた。また  $CD3$  と  $CD4+CD8$  の 2 重染色では、 $CD3^{-}intermediate^{+}$  で  $CD4^{+}8^{-}$  の細胞が肝で 4.1%, 脾で 1.0%, 胸腺で 0.8% と各臓器で認められ、intermediate TCR 細胞の約 3 割を占めることが確認された。

## 2. 性による T リンパ球の差異

3 系統の雌雄マウス (24~26 週齢の B6 マウス, 11~13 週齢の BALB マウス, 8~9 週齢の C3H マウス) に

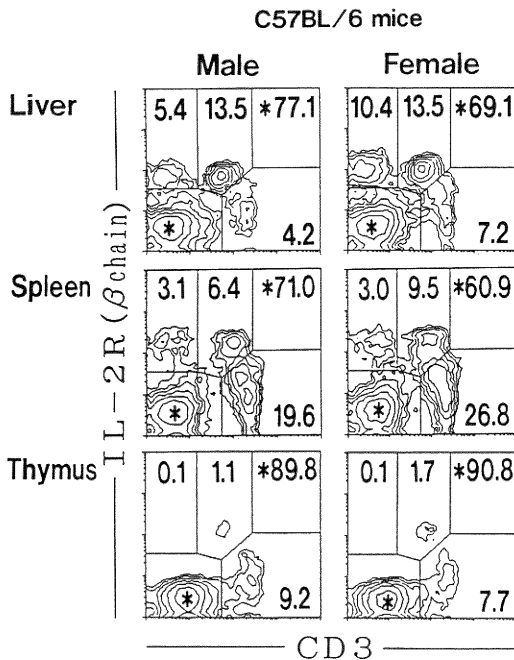


Fig. 3-A

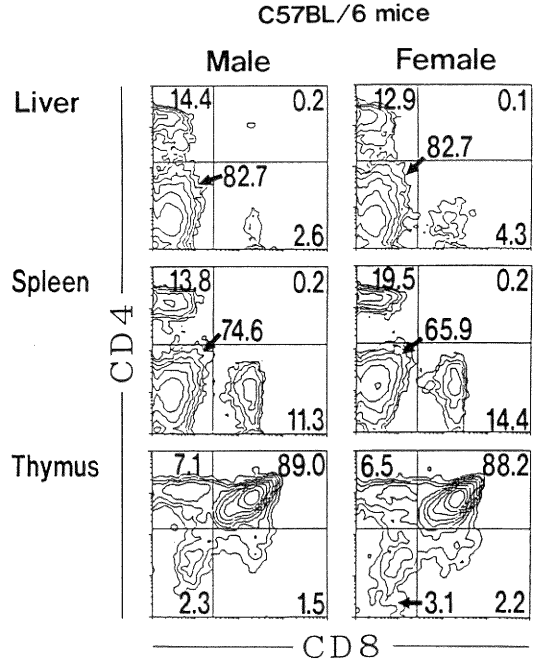


Fig. 3-B

Fig. 3 雌, 雄マウスの肝, 脾, 胸腺の  $CD3$  と  $IL-2R\beta$  (A.),  $CD8$  と  $CD4$  (B.) の 2 重染色。

ついて肝, 脾, 胸腺を摘出し単核球を分離してその数, 表面マーカーについて雌雄の差異を比較した. B6 マウスの FACS 解析の代表的なパターンを Fig. 3 で示し, 3 系統それぞれについて各パラメータの雌・雄の平均 (Av.) と検定結果を Table 1 および Fig. 4 にまとめた. B6 マウスでは, 体重, 肝重量で雄は雌を上回ったが, 脾重量は差がなく, 雌の胸腺重量は雄より多かった. しかし, 分離された単核球数では肝, 胸腺において, 雌が上回った ( $p < 0.01$ , Fig. 4-A). 表面マーカーによる検討では, bright TCR 細胞の比率では全臓器で差が認められなかったのと対照的に, intermediate TCR 細胞は脾と胸腺において雄よりも雌に低かった ( $p < 0.01$ , Table 1).  $CD4^+8^-$ ,  $CD4^+8^+$ ,  $CD4^-8^-$ ,  $CD4^-8^+$  の割合を見ると, 胸腺で  $CD4^-8^-$  (double negative) 細胞が増加していたが, これは intermediate TCR 細胞の増加によると思われた.

BALB/c, C3H/HeN マウスでも 9 匹ずつ検討した (Table 1, Fig. 4-A) が, 大部分のパラメーターで B6 マウスとはほぼ同様の雌雄の有意差あるいは傾向を示していた. BALB マウス (11~13週) では肝臓の intermediate TCR 細胞の割合も雌で優位 (雄 13.8%, 雌 22.6%) であった. C3H マウス (8~9週) の脾では, 雄で bright TCR 細胞が雌よりも多い割合であった.  $CD4$ ,  $CD8$  の割合では BALB マウスで肝の  $CD4^-8^-$  細胞が雄で多く,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  細胞が雌で多かった. このことは, 雄の intermediate TCR 細胞は  $CD4^-8^-$  の細胞の比率が高く, 雌のそれには  $CD4^+$  や  $CD8^+$  が高かったためと考えられる.

Table 1 で示したデータからより詳細かつ妥当性のある解析をするために, ある単核球分画の絶対数を求め, また肝臓の重量は雄で多いことから, この絶対数を臓器の重量で除した "index" を用いて比較した. すなわち

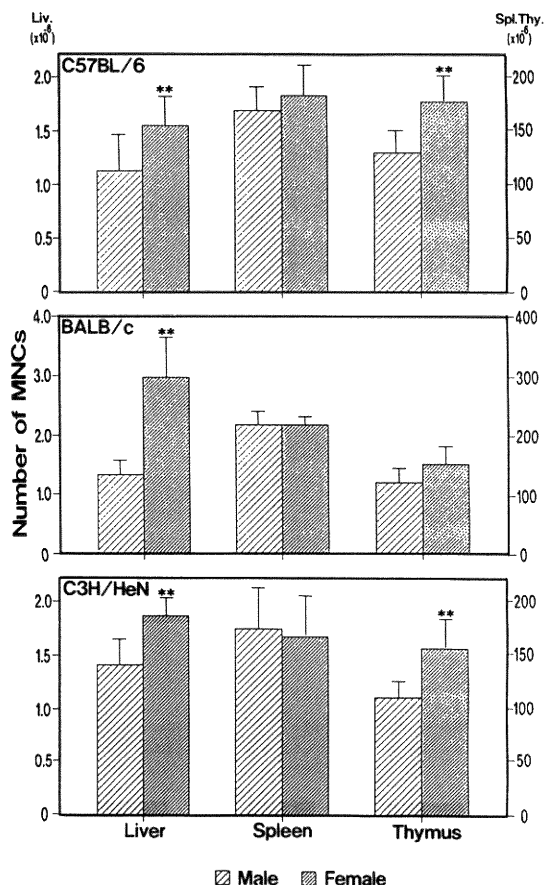


Fig. 4-A

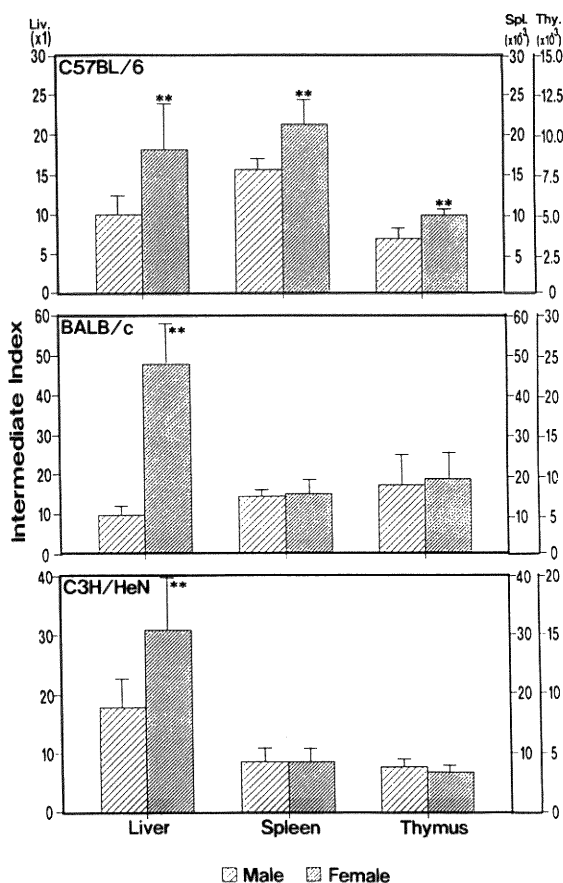


Fig. 4-B

intermediate index =

$$\frac{\text{intermediate TCR cells の比率 (\%)} \times \text{単核球数 (10}^{-6}\text{)}}{\text{臓器重量 (gr.)}}$$

及び bright index (bright TCR cells の比率から同様に計算) を計算した。これをもって雌雄を比べると (Fig. 4-B, C), B6 マウスでは intermediate TCR 細胞は肝, 脾, 胸腺のすべてにおいて, 雄よりも雌で多い ( $p < 0.01$ ) ことがわかった。これに対して, bright TCR 細胞は肝でのみ雌優位であった。

BALB/c マウス, C3H/HeN マウスにおいては intermediate index は肝臓で雌で大きく, 脾, 胸腺で

は有意差を認めなかった (Fig. 4-B). これに対し bright index は脾, 胸腺で常に雄が雌を上回った (Fig. 4-C). つまり, intermediate TCR 細胞はおおむね雌で優位, 肝以外の bright TCR 細胞は雄で優位となっていることが判明した。

以上の結果より, 全身の免疫系, とりわけ胸腺外分化 T 細胞 (intermediate TCR 細胞) には著明な性差が存在することが明らかとなったため, 泌尿器内分泌学的にも興味のあるアンドロゲンの増減による免疫系の変化を解析した。

### 3. 精巣摘除による変化

マウスに両側精巣摘除術を行い13, 19, 28, 30日後の変化を検討した (Table 2, Fig. 5). 単なる手術侵襲のみでも胸腺内分化が抑制され胸腺が萎縮することが知られており, また実験中のマウスの加齢による変化を除くため, 常に sham operation をしたものを正常コントロールとしてその比で比較した。このため Fig. 5 (Fig. 6 も) で示す経時変化を表した折れ線グラフの y 軸は,  $\text{exp./cont. ratio} =$

$$\frac{\text{実験群の平均値}}{(\text{同時に実験した}) \text{ control 群の平均値}} \times 100$$

をもって表現した。

精巣摘除により, 脾と胸腺の重量は明らかに増加し (Table 2), 重量を反映して単核球数も増加した (Fig. 5-A). これに対して, 肝重量は変化しないにもかかわらず肝単核球数は増加し, day 19 以外は有意差を認めた。

FACS で解析した intermediate TCR 細胞の比率 (% intermediate cell, Table 2) では, 肝では変化なく, 脾, 胸腺ではどの時期でも減少傾向にあり, day 13 においては有意に減少していた。全経過で intermediate index (Fig. 5-B) は肝で増加, 脾, 胸腺では減少傾向であった。

bright TCR 細胞の比率 (Table 2) は, 肝, 脾ではやや減少傾向, 胸腺では不変であった。bright index (Fig. 5-C) は肝で増加している反面, 脾臓では低下, 胸腺では不変あるいはやや増加した。

CD4, CD8 による 4 分画の比較 (Table 2) では, 脾や day 30 の肝で  $\text{CD4}^+\text{8}^-$  が増加したが, 同時に脾で CD3 と  $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$  の 2 重染色をすると,  $\text{CD3}^+\text{intermediate}^+\text{CD4}^+\text{8}^-$  の分画の割合に変化がないことから,  $\text{CD4}^+\text{8}^-$  の増加は B cell の増加を反映したものと考えられた。実際このとき CD3 と  $\text{IL-2R}\beta$  の 2 重染色で B cell の比率の増加が認められていた。また胸腺の  $\text{CD4}^+\text{8}^-$  細

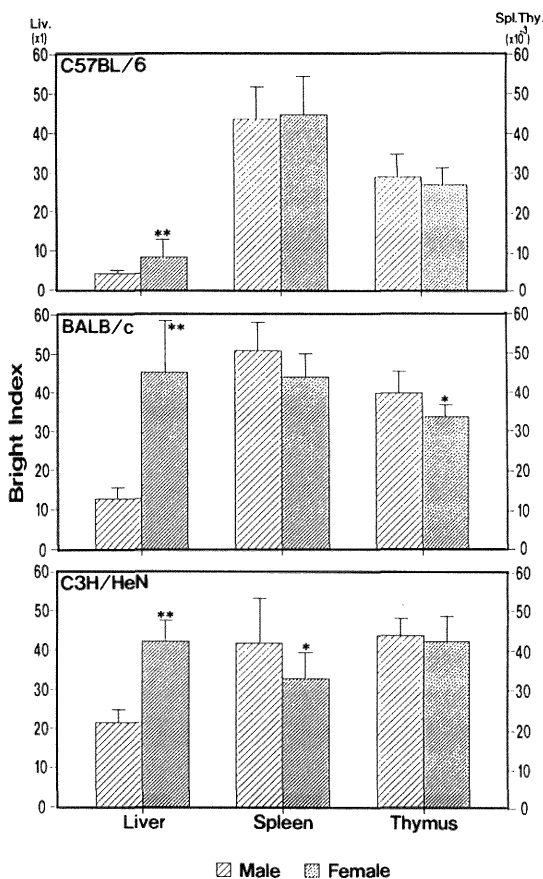


Fig. 4-C

Fig. 4 肝, 脾, 胸腺の単核球数 (A.), intermediate index (B.), bright index (C.) の各系統の雌, 雄の比較.

\*\* :  $p < 0.01$ , \* :  $p < 0.05$

**Table 1** 雄・雌による体重, 各臓器の重量, 各分画の単核球の比率(%)の比較, おおの9匹の平均を示す.

strain	sex	body weight (g)	organ weight (g)			%intermediate TCR cells			%bright TCR cells			%CD4+CD8-cells			%4+8+ cells	%CD4-CD8-cells			%CD4-CD8+ cells		
			liver	spleen	thymus	liver	spleen	thymus	liver	spleen	thymus	liver	spleen	thymus	thymus	liver	spleen	thymus	liver	spleen	thymus
C57BL/6 24-28 wks	male	28.3	1.48	0.082	0.041	14.0	7.6	1.07	5.7	20.8	9.0	13.4	16.3	7.6	86.2	82.2	72.2	3.1	3.1	11.4	3.1
	female	23.6	1.07	0.084	0.058	12.4	9.9	1.61	5.7	20.7	8.7	12.7	16.9	8.1	85.9	83.7	71.1	3.6	3.1	11.8	2.4
	P-value	P<0.01	P<0.05	NS	P<0.01	NS	P<0.01	P<0.01	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	P<0.05	NS	NS	NS
BALB/c 11-13 wks	male	29.1	1.85	0.123	0.049	13.8	8.2	3.44	18.5	28.5	17.1	22.3	25.3	13.1	78.7	70.7	64.5	2.4	6.5	9.9	5.8
	female	23.5	1.42	0.137	0.066	22.6	9.3	4.28	20.7	27.4	15.2	27.9	25.1	12.0	79.9	62.6	64.3	2.1	9.1	10.3	6.0
	P-value	P<0.01	P<0.01	NS	P<0.01	P<0.01	P<0.05	NS	NS	NS	NS	P<0.05	NS	NS	NS	P<0.05	NS	NS	P<0.05	NS	NS
C3H/HeN 8-9 wks	male	25.4	1.59	0.093	0.038	20.5	4.6	1.31	25.2	22.6	15.1	27.3	17.4	9.3	74.9	60.9	75.4	5.7	11.5	7.2	10.1
	female	21.6	1.25	0.095	0.050	20.1	4.9	1.11	28.4	19.1	13.8	28.9	15.1	7.1	59.9	57.3	78.0	12.1	13.4	6.8	21.9
	P-value	P<0.01	P<0.01	NS	P<0.01	NS	NS	P<0.05	P<0.05	P<0.05	NS	NS	P<0.05	NS	NS	NS	P<0.05	NS	P<0.01	NS	NS

**Table 2** 精巣摘除による各臓器の重量, 各分画の単核球の比率(%)の変化, 3匹ずつの平均を示す.

		organ weight (g)			%intermediate TCR cells			%bright TCR cells			%CD4+CD8-cells			%4+8+ cells	%CD4-CD8-cells			%CD4-CD8+ cells		
		liver	spleen	thymus	liver	spleen	thymus	liver	spleen	thymus	liver	spleen	thymus	thymus	liver	spleen	thymus	liver	spleen	thymus
day 13	Sham op.	1.53	0.105	0.029	19.1	4.7	1.34	26.2	23.2	15.6	24.5	17.4	9.9	85.0	60.9	74.8	2.33	14.3	7.6	2.8
	Ox.	1.66	0.148	0.056	17.0	4.1	0.75	25.3	14.3	14.1	23.6	12.6	9.4	86.8	61.3	82.8	1.38	13.8	4.5	2.4
	P-value	NS	P<0.05	P<0.01	NS	P<0.05	P<0.01	NS	P<0.01	NS	NS	P<0.05	NS	NS	NS	P<0.05	P<0.01	NS	P<0.01	NS
day 19	Sham op.	1.67	0.095	0.040	21.6	3.5	1.07	21.0	25.2	15.5	26.3	18.2	9.7	86.0	63.2	73.1	1.73	10.1	8.5	2.6
	Ox.	1.63	0.129	0.052	22.3	3.2	0.75	15.6	14.0	15.7	22.8	11.3	9.6	84.8	67.9	83.9	1.61	9.0	4.7	4.0
	P-value	NS	P<0.05	P<0.01	NS	NS	NS	NS	P<0.05	NS	P<0.05	NS	NS	NS	NS	P<0.01	NS	NS	P<0.05	NS
day 28	Sham op.	1.63	0.086	0.039	17.5	3.7	0.91	24.0	21.3	14.2	24.6	17.0	11.2	85.0	63.1	75.9	1.42	10.7	6.9	2.5
	Ox.	1.47	0.131	0.058	18.8	3.1	0.65	23.3	19.4	16.0	24.6	13.3	14.1	82.7	64.1	80.0	1.03	11.0	6.6	2.2
	P-value	NS	P<0.05	P<0.01	NS	NS	NS	NS	NS	P<0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
day 30	Sham op.	1.64	0.090	0.036	15.4	4.1	1.19	32.5	25.1	14.6	26.9	17.9	12.5	81.6	60.6	73.6	2.65	12.4	8.3	3.2
	Ox.	1.55	0.106	0.054	15.4	3.9	0.83	23.0	17.9	16.8	19.6	13.5	15.0	78.4	69.1	80.2	2.32	11.2	6.2	4.3
	P-value	NS	NS	P<0.05	NS	NS	P<0.05	P<0.01	P<0.01	NS	P<0.05	P<0.01	NS	NS	P<0.05	P<0.01	NS	NS	P<0.01	P<0.01

Sham op.: 同時に実験したコントロール Ox: orchietomy

胞の減少は、胸腺内の intermediate TCR 細胞の減少を裏付けていた。また肝、脾で  $CD4^+$  細胞が減少、脾で  $CD8^+$  細胞が減少したが、 $CD4/CD8$  比には大きな変化を認めなかった。

#### 4. テストステロン投与による変化

テストステロン 10 mg 投与7, 14, 26日後のマウス

では、その蛋白同化作用と思われる体重増加が認められた。肝、脾の重量、単核球数は増加したが胸腺は重量も単核球数も減少した (Fig. 6-A)。これはエストロゲンを投与したときと類似した変化であった。

% intermediate は肝で不変、脾でやや増加、胸腺で明らかに増加 (exp./cont. ratio では day 7=217, day

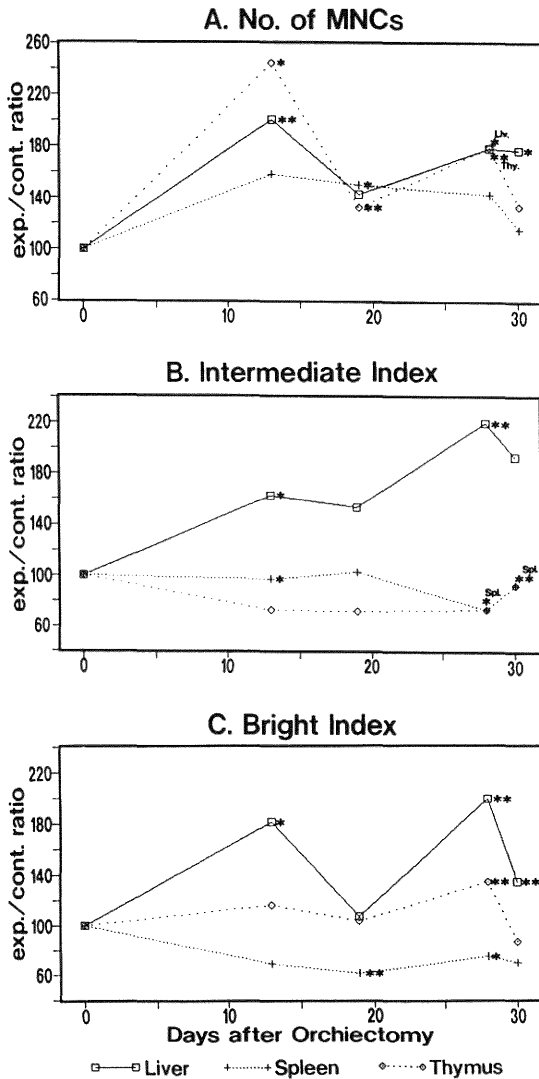


Fig. 5 精巣摘除による各臓器の単核球数 (A.), intermediate index (B.), bright index (C.) の経時的変化。

同時に実験したコントロールに対する比率 (exp./cont. ratio) を y 軸に表した。

\*\* :  $p < 0.01$ , \* :  $p < 0.05$

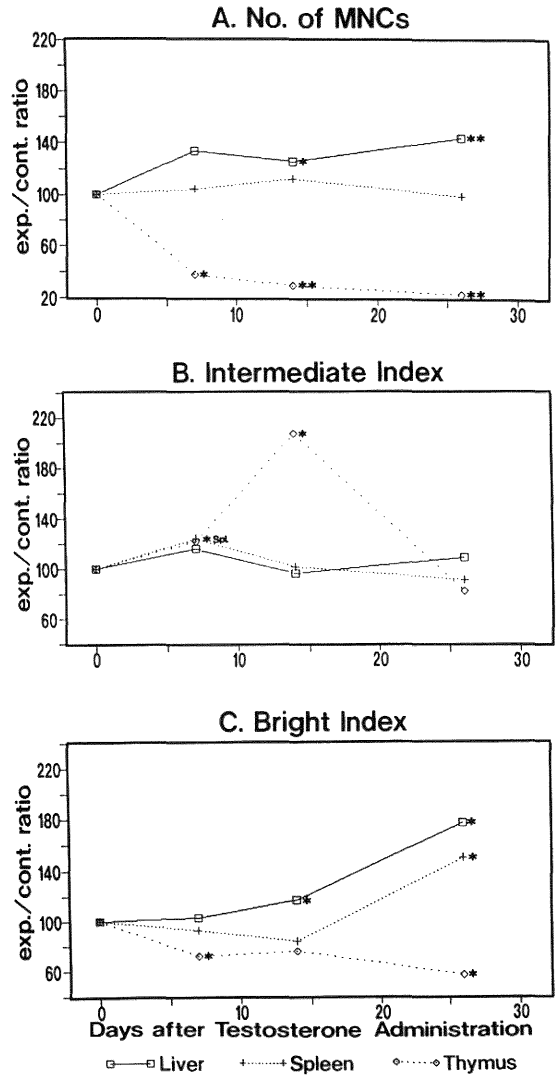


Fig. 6 テストステロン 10 mg 皮下投与による各臓器の単核球数 (A.), intermediate index (B.), bright index (C.) の経時的変化。

exp./cont. ratio で表した。

\*\* :  $p < 0.01$ , \* :  $p < 0.05$



14=256, day 26=178) した. intermediate index でも肝は変化なく, 脾, 胸腺では増加していた (Fig. 6-B). % bright TCR cells は各臓器で変化なかったが, bright index では肝でむしろ増加し, 胸腺では減少と, 好対照であった (Fig. 6-C). CD4, CD8 の2重染色では胸腺の CD4<sup>+</sup>8<sup>-</sup> 細胞が増加し, intermediate TCR 細胞の増加を裏付けていた. また, day 7 の肝で CD4/CD8 比が減少 (4.5→2.9) し, 増加した bright TCR 細胞は CD8 細胞であると思われた.

### 5. 精巣摘除術+テストステロン補充投与

精巣摘除術の術後12日にテストステロン (Te と略す) を皮下投与し, さらに7日後に解析した. Fig. 7-A で示すように, 肝, 脾単核球数は除精+Te で相加作用が認められた. 胸腺細胞数の変化は, exp./ont. ratio で評価すると除精+Te で61に対して, 除精のみが132, Te 単独投与 (別実験, Fig. 6 より計算) では38と, 血中 Te レベルと胸腺細胞数は逆相関することが明らかとなった.

さらにこれまでと同様, 単核球を FACS で分析し, 細胞分画の比率から intermediate index と bright index を求めて Fig. 7-B, C で示した. これで比較すると, intermediate TCR 細胞は, 除精術後の肝で増加, 胸腺では減少する. しかし Te の補充で, 肝・胸腺ともに control と同レベルに復帰することが判明した. すなわち, 肝と胸腺の intermediate TCR 細胞の, テストステロンに対する感受性は正反対であった. 一方, 肝の bright TCR 細胞は除精+Te の相加作用で若干の増加が認められた.

## 考 察

これまで, intermediate TCR 細胞は肝臓における特徴的なT細胞で, 胸腺外分化T細胞 (extrathymic T cells) と同義語であった. しかし, 放射線照射 (γ線) を行ったマウスの, 全身の免疫臓器の H-E あるいは免疫組織標本と単核球のフローサイトメトリーによる解析によって, intermediate TCR 細胞は放射線抵抗性であり, これが肝臓のみならず赤脾髄や胸腺の髄質にも少数ながら存在することが証明されてきた<sup>18)</sup>. このことから, intermediate TCR 細胞の主なる分化成熟する場は肝臓ではあるが, これをそのまま '胸腺外 (extrathymic)' 分化T細胞というよりむしろ 'primitive' T cells と呼び替えた方が良いとされるようになった<sup>19)</sup>. 胸腺がまだ未発達の甲殻類などでも肝臓を持つものは, その肝臓内にリンパ球様細胞を認め<sup>5)</sup>, また, マウスの個体

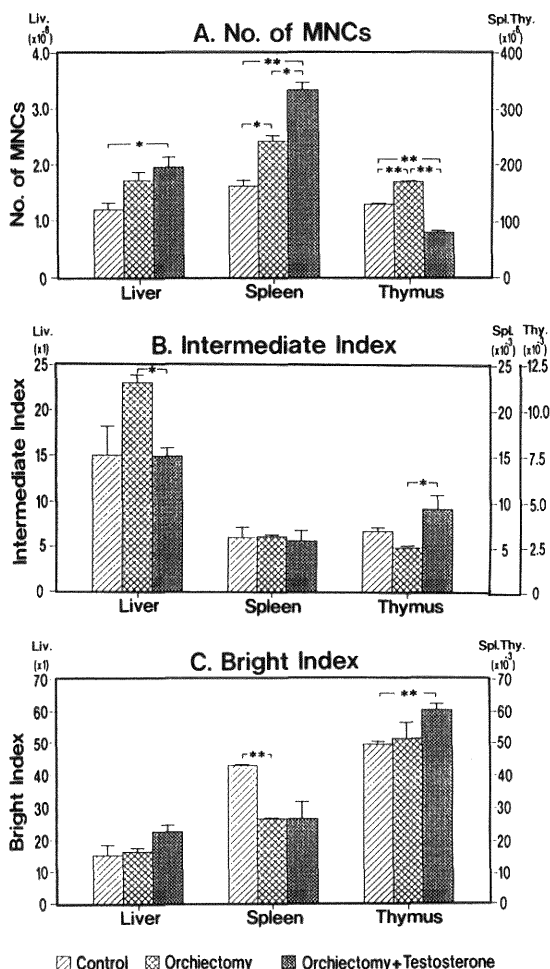


Fig. 7 精巣摘除の12日後にテストステロン 20 mg 補充投与しさらに7日後の各臓器の単核球数 (A.), intermediate index (B.), bright index (C.).

\*\* : p < 0.01, \* : p < 0.05

発生においても胸腺にT細胞が現れる胎生14日以前に, 肝臓でT細胞が胎生11~12日に一時的に出現する<sup>20)</sup> ためである. 一方胸腺内 (intrathymic) 分化したT細胞 (bright TCR 細胞) は, 系統・個体発生学的にも新しく, 高等哺乳類では通常の状態では primitive T cells よりも優位となっているために 'regular' T cells と呼ばれるようになった<sup>19)</sup>.

今回の実験ではまず, intermediate TCR (primitive T) 細胞が, 肝臓や他の臓器で雄より雌マウスにおいて優勢であり, bright TCR (regular T) 細胞は脾, 胸

腺で雄マウスで比較的优势であることを示した。雌は体重や肝重量が雄より少ないため、総単核球数の他、臓器の重量 (gram) 当りの FACS での各分画の細胞数 (index) で比較した。実験した3系統全ての肝の intermediate index は雌で高かった。脾、胸腺については B6 マウスでは肝と同じ傾向であったが、BALB, C3H マウス (8~13 週齢) では明らかな性差を認めなかった。これらは、24~26 週齢で解析した B6 よりも若く、加齢とともに雌優位が顕著になってくるためと思われる。bright index については、肝臓ではやはり常に雌で高値をとったが、その性差は intermediate index で認めた差に比べて比較的小さかった (Fig. 4)。さらに BALB, C3H において、脾、胸腺の bright TCR 細胞はむしろ雄で優位となっていた。このような免疫臓器の性差は性ホルモンによる影響が1つに考えられた。

これまでも性ホルモンが胸腺に及ぼす影響についてはかなり研究されてきた。胸腺リンパ球の分化・成熟は胸腺上皮細胞 (thymic epithelial cells; TEC) の機能に依存している<sup>21)</sup> が、TEC には性ホルモンのリセプターが存在する<sup>14)</sup> ため、性ホルモンの増加はひいては TEC 増殖を抑え胸腺機能を低下させる<sup>22)</sup>。性ホルモンの血中レベルが低下すると TEC から  $\text{thymosin } \beta_4$  が分泌され、視床下部からの性腺刺激ホルモン分泌ホルモンを介して、下垂体の性腺刺激ホルモンが性腺のエストロゲンやテストステロンの分泌を促進するという、“hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG)-thymic axis” が考えられている<sup>14)</sup>。

胸腺外分化T細胞もまた、性ホルモンの影響を受けることが明らかになった。エストロゲンの投与<sup>23)</sup> では胸腺内T細胞分化は抑制されるが、肝臓における胸腺外分化は促進される、すなわちエストロゲンは免疫臓器としての胸腺と肝臓 reciprocal に働いているということが解明された。今回は、同じ性ホルモンであるアンドロゲンについても検討した結果、“HPG-thymic and extra-thymic axis” という仮説の可能性も考えられた。

精巣摘除術後は血中テストステロンは低下する。このとき、肝単核球数は増加し、intermediate index も増加した。対照的に胸腺では、単核球総数は増加したが、intermediate index は減少した (Fig. 5)。つまり血中テストステロンの低下は、① 肝の intermediate T を増殖させ、② bright T も増殖させ、また ③ 胸腺の intermediate T を抑制し、④ bright T をやや増殖させた。③④については多少合わないものの、①②は生理的に除精状態にあるともいえる雌の、雄に対する性差と

傾向が一致する。このことから、血中のテストステロンレベルはT細胞の性差を形成する大きな因子の一つとなっていると思われる。

テストステロン投与では、肝 intermediate index は不変、bright index を増加させ、胸腺での intermediate index は増加、bright index は減少した (Fig. 6)。つまり、上記③④ (精巣摘除術後) とちょうど反対の変化がみられた。①②がやや矛盾するのは、薬理的な量のテストステロン投与は、同じステロイドホルモンであるエストロゲン投与時 (エストロゲン投与後5~10日目のマウス<sup>23)</sup> や生理的に血中エストロゲンの1,000倍にも及ぶ上昇を示す妊娠後期、産褥期のマウス (Kimura, M., 投稿準備中) では、胸腺、肝臓ともに intermediate TCR 細胞が急速に増加している) に類似する作用となるためと思われる。さらに除精+テストステロン補充は胸腺の総細胞数や肝、胸腺の intermediate index をコントロールレベルまで引き戻した (Fig. 7-B)。投与実験によっても、テストステロンは胸腺内、胸腺外のT細胞の両者に影響を及ぼしていることが裏付けられた。

さらに、肝臓の intermediate TCR 細胞の除精術での変化 (上記①) と胸腺のそれ (③) を比較すると、表面マーカー上は同じでも臓器が違えば、テストステロンは全く逆に作用していることがわかった。cell sorter で得られた肝の intermediate TCR 細胞と、胸腺の intermediate TCR 細胞のサイトカインに対する応答性を調べると、肝 intermediate TCR 細胞は胸腺のそれより IL-2 に対して著しい応答性を示し、IL-1 についても有意な差が認められている<sup>24)</sup>。これらより、同じ intermediate TCR 細胞であってもその局在する臓器により、ホルモンや種々のサイトカインの刺激に対する反応性が異なることが明らかとなった。またサイトカイン産生能にも違いがみられることから<sup>24)</sup>、その由来や機能に相違があることが強く示唆される。

今回の検討で男性ホルモンの増減が免疫系に及ぼす影響は決して少なくないことが明らかとなった。マウスの去勢術は、肝臓の intermediate TCR 細胞を増殖させた。MCA105 (fibrosarcoma) を同系のマウスに接種すると、肝の単核球数や intermediate TCR 細胞は増殖し、細胞障害活性を持ってくる<sup>12)</sup>。またこのときの腫瘍に浸潤するTリンパ球の60%は、intermediate TCR 細胞である<sup>19)</sup>。疫学的に男性では、例外も多少あるものの、一般に悪性腫瘍の発生頻度が女性よりも高い。もともと男性では血中アンドロゲンが高く、胸腺外経路、特に異常自己監視を司る (マウスにおける) intermediate

TCR 細胞が比較的抑制された状態にあり、発生した癌細胞がこれらからエスケープしやすくなっているとも考えられる。他方、MRL-lpr/lpr マウス (SLE のモデルマウス) の自己免疫病の発症は、各臓器の intermediate TCR 細胞 (= 胸腺外経路) が過剰に活性化されるためである<sup>25)</sup>。このことから、臨床的に、多くの自己免疫疾患が女性において発生頻度が高いのは、胸腺外経路が女性で比較的優位であるためとも推察できる。このように性ホルモンが免疫系を介して、疾患の発症や病勢に影響を与えていると考えられ、興味深い。ヒトの胸腺外分化T細胞は CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> あるいは CD3<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> の細胞といわれるが<sup>19)</sup>、これについての検討は今後の課題である。

肝臓は、胸腺外分化の中核として機能しており、アンドロゲンや他の性ホルモンによりT細胞の胸腺外分化と胸腺内分化はバランスを保ちながら相拮抗して免疫系のホメオスタシスを維持しているものと考えられた。

稿を終えるに当たり、御指導、御校閲を賜りました恩師 佐藤昭太郎教授に深謝致します。また直接御指導いただいた医動物学教室 安保 徹教授、渡部久実博士に深く御礼申し上げます。

## 参 考 文 献

- 1) Yoshikai, Y., Reis, M.D. and Mak, T.W.: Athymic mice express a high level of functional  $\gamma$ -chain but greatly reduced levels of  $\alpha$ - and  $\beta$ -chain T-cell receptor messages. *Nature*, **324**: 482~485, 1986.
- 2) Ohteki, T., Seki, S., Abo, T. and Kumagai, K.: Liver is a possible site for the proliferation of abnormal CD3<sup>+</sup>4<sup>+</sup>8<sup>-</sup> double-negative lymphocytes in autoimmune MRL-lpr/lpr mice. *J. Exp. Med.*, **172**: 7~12, 1990.
- 3) Bandeira, A., Itohara, S., Bonneville, M., Buren-Defranoux, O., Muto-Santos, T., Coutinho, H. and Tonegawa, S.: Extrathymic origin of intestine intraepithelial lymphocytes bearing T-cell antigen receptor  $\gamma\delta$ . *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **88**: 43~47, 1991.
- 4) 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.
- 5) Abo, T.: Extrathymic differentiation of T lymphocytes and its biological function. *Biomed. Res.*, **13**: 1~39, 1992.
- 6) Ohteki, T., Okuyama, R., Seki, S., Abo, T., Sugiura, K., Kusumi, A., Ohmori, T., Watanabe, H. and Kumagai, K.: Age-dependent increase of extrathymic T cells in the liver and their appearance in the periphery of older mice. *J. Immunol.*, **149**: 1562~1570, 1992.
- 7) Iiai, T., Watanabe, H., Seki, S., Sugiura, K., Hirokawa, K., Utsuyama, M., Takahashi-Iwanaga, H., Iwanaga, T., Ohteki, T. and Abo, T.: Ontogeny and development of extrathymic T cells in mouse liver. *Immunology*, **77**: 556~563, 1992.
- 8) Abo, T., Ohteki, T., Seki, S., Koyamada, N., Yoshikai, Y., Masuda, T., Rikiishi, H. and Kumagai, K.: The appearance of T cells bearing self-reactive T cell receptor in the livers of mice injected with bacteria. *J. Exp. Med.*, **174**: 417~424, 1991.
- 9) Abo, T., Kusumi, A., Seki, S., Ohteki, T., Sugiura, K., Masuda, T., Rikiishi, H., Iiai, T. and Kumagai, K.: Activation of extrathymic T cells in the liver and reciprocal inactivation of intrathymic T cells by bacterial stimulation. *Cell. Immunol.*, **142**: 125~136, 1992.
- 10) Seki, S., Abo, T., Ohteki, T., Sugiura, K. and Kumagai, K.: Unusual  $\alpha\beta$ -T cells expanded in autoimmune lpr mice are probably a counterpart of normal T cells in the liver. *J. Immunol.*, **147**: 1214~1221, 1991.
- 11) Seki, S., Abo, T., Sugiura, K., Ohteki, T., Kobata, T., Yagita, H., Okumura, K., Rikiishi, H., Masuda, T. and Kumagai, K.: Reciprocal T cell responses in the liver and thymus of mice injected with syngeneic tumor cells. *Cell. Immunol.*, **137**: 46~60, 1991.
- 12) Ohmori, K., Iiai, T., Watanabe, H., Tanaka, T., Miyasaka, M. and Abo, T.: Activation of extrathymic T cells in the liver of mice bearing syngeneic tumors. *Biomed. Res.*, **14**: 65~79,

- 1993.
- 13) Murosaki, S., Yoshikai, Y., Ishida, A., Nakamura, T., Matsuzaki, G., Takimoto, H., Yuuki, H. and Nomoto, K.: Failure of T cell receptor V $\beta$  negative selection in murine intestinal intra-epithelial lymphocytes. *Int. Immunol.*, **3**: 1005~1013, 1991.
- 14) Grossman, C.J.: Interaction between the gonadal steroids and the immune system. *Science*, **227**: 257~261, 1985.
- 15) Watanabe, H., Ohtsuka, K., Kimura, M., Ikarashi, Y., Ohmori, K., Kusumi, A., Ohteki, T., Seki, S. and Abo, T.: Details of an isolation method for hepatic lymphocytes in mice. *J. Immunol. Methods*, **146**: 145~154, 1992.
- 16) Tanaka, T., Tsudo, M., Karasuyama, H., Kitamura, F., Kono, T., Hatakeyama, M., Taniguchi, T. and Miyasaka, M.: A novel monoclonal antibody against murine IL-2 receptor  $\beta$  chain. *J. Immunol.*, **147**: 2222~2228, 1991.
- 17) Kimura, M., Watanabe, H. and Abo, T.: Selective activation of extrathymic T cells in the liver by glycyrrhizin. *Biotherapy*, **5**: 167~176, 1992.
- 18) Kimura, M., Watanabe, H., Ohtsuka, K., Iiai, T., Tsuchida, M., Sato, S. and Abo, T.: Radioresistance or intermediate TCR cells and their localization in the body of mice revealed by irradiation. *Microbiol. Immunol.*, **37**: 641~652, 1993.
- 19) Abo, T.: Extrathymic pathways of T-cell differentiation: A primitive and fundamental immune system. *Microbiol. Immunol.*, **37**: 247~258, 1993.
- 20) 飯合恒夫, 小川 充, 渡部久実, 木村元彦, 安保 徹: 胎生期の肝におけるT細胞の分化. 日本免疫学会総会・学術集会記録, **22**: 131, 1992.
- 21) Wekerle, H. and Ketelsen, U-P.: Thymic nurse cells—Ia-bearing epithelium involved in T-lymphocyte differentiation? *Nature*, **283**: 402~404, 1980.
- 22) 坂部 貢, 川嶋一成, 清水勤治: 「視床下部—下垂体—性腺—胸腺」軸の関連. 細胞, **24**: 486~490, 1992.
- 23) Okuyama, R., Abo, T., Seki, S., Ohteki, T., Sugiura, K., Kusumi, A. and Kumagai, K.: Estrogen administration activates extrathymic T cell differentiation in the liver. *J. Exp. Med.*, **175**: 661~669, 1992.
- 24) 宮路智香子, 渡部久実, 安保 徹: 肝臓の胸腺外分化 intermediate TCR 細胞の IL-7 に対する応答性. 日本免疫学会総会・学術集会記録, **23**: 636, 1993.
- 25) 飯合恒夫, 小川 充, 渡部久実, 広川勝彦, 安保 徹: MRL-1pr/1pr マウスにおける異常T細胞の複数の分化経路の可能性について. 日本免疫学会総会・学術集会記録, **23**: 241, 1993.

(平成6年1月6日受付)