

氏名	よこ やま ひさし 横 山 恒
学位	博 士 (医学)
学位記番号	新大院博(医)第1184号
学位授与の日付	平成17年 3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Estimation of effector cytotoxic lymphocytes against male H-Y antigens induced by two-step stimulations as CD8 ⁺ NK1.1 ⁻ TCR ^{int} and CD8 ⁺ NK1.1 ⁺ TCR ^{int} cells (2段階刺激により生じるH-Y抗原特異的細胞傷害性T細胞としてのCD8陽性NK1.1陰性T細胞レセプター中等度陽性細胞及びCD8陽性NK1.1陽性T細胞レセプター中等度陽性細胞に対する検討)
論文審査委員	主査 教授 内 藤 眞 副査 教授 青 柳 豊 副査 教授 安 保 徹

博士論文の要旨

【目的】雄特異的 H-Y 抗原はマイナー抗原であるが、臓器移植において拒絶反応に関わる抗原として知られており、MHC 上に提示され T 細胞に認識される。この T 細胞はこれまで胸腺内分化 T 細胞というよりも unconventional T 細胞(IL-2R β ⁺TCR^{int} 細胞)であるとも報告されている。今回、我々は 2 段階刺激で生じる H-Y 抗原特異的細胞傷害性 T 細胞を誘導し、この T 細胞の解析により CD3^{int}NK1.1⁻CD8⁺細胞及び CD3^{int}NK1.1⁺CD8⁺細胞の関与を検討した。

【方法】雄 C57BL/6(B6)マウスの脾細胞を雌 B6 マウスに腹腔内投与し、経時的に肝、脾リンパ球を FACScan により解析した。移入後 2, 3, 4 週目に雌 B6 recipient の肝、脾リンパ球を採取し、雌及び雄 B6 脾リンパ球の ConA blast を target として ⁵¹Cr を用いて細胞傷害試験を行った。また、これら雌 B6 recipient 肝、脾リンパ球及び NKT, NK, あるいは CD8⁺細胞を in vivo で除去した肝、脾リンパ球を effector 細胞とし、放射線照射雄 B6 脾リンパ球を stimulator 細胞とする混合リンパ球反応 (MLR) を 4 日間行い、同様な細胞傷害試験を行った。

【結果】腹腔内投与後、各臓器リンパ球数に変化は無かったが、肝臓において 2 週目で一過性に IL-2R β ⁺CD3^{int} (unconventional T 細胞)、NK1.1⁺CD3^{int} 細胞 (NKT 細胞) の割合が増加した。細胞傷害試験において、雄 B6 脾細胞を腹腔内投与したのみでは活性が認められず、二次刺激として MLR 後に細胞傷害試験を行ったところ、H-Y 抗原特異的細胞傷害活性が認められた。In vivo で二次刺激を行っても細胞傷害活性は認められなかった。そこで、NKT, NK, CD8⁺細胞を in vivo で除去した肝、脾リンパ球を effector 細胞として細胞傷害試験を行ったところ、NKT 細胞除去群と CD8⁺細胞除去群において活性低下が認められた。このことより、H-Y 抗原特異的細胞傷害活性誘導における effector 細胞は NKT 細胞と CD8⁺細胞であると考えられた。次に NKT 細胞の関与を調べるために CD1d ノックアウトマウス及び J α 281 ノックアウトマウスを用いて細胞傷害試験を行い、H-Y 抗原特異的細胞傷害活性誘導をした。活性は比較的保たれていたことから、effector 細胞として CD8⁺NKT 細胞 (CD3^{int}NK1.1⁺CD8⁺細胞) の関与が考えられた。最後に cell sorting により CD3^{int}NK1.1⁻CD8⁺細胞と unconventional T 細胞である CD3^{int}NK1.1⁻CD8⁺細胞を分離し、これらを effector 細胞として細胞傷害試験を行ったところ、CD3^{int}NK1.1⁻CD8⁺細胞でより高い活性が認められた。

【考察】2段階刺激で生じるH-Y抗原特異的細胞傷害活性誘導において、effector細胞はCD3^{high}NK1.1⁻CD8⁺細胞よりもCD3^{int}NK1.1⁻CD8⁺細胞であることが示唆された。また、NKT細胞欠損マウス(B6)を用いた実験で、このマウスではCD4⁺NKT細胞を欠損しているがCD8⁺NKT細胞は残存しており、細胞傷害活性が比較的保たれていることから、effector細胞としてはCD3^{int}NK1.1⁻CD8⁺細胞の関与も考えられた。以前にも同様な実験系でH-Y抗原特異的細胞傷害活性誘導に関して報告されているが、unconventional T細胞という観点からは検討がなく、H-Y抗原に対する認識という点でCD3^{int}NK1.1⁻CD8⁺細胞とCD3^{int}NK1.1⁺CD8⁺細胞の関与が示唆される。

【結論】H-Y抗原に対する認識とH-Y抗原特異的細胞傷害活性誘導におけるeffector細胞という点でunconventional T細胞の関与が示唆された。

審査結果の要旨

臓器移植の拒絶反応に関わる雄特異的H-Y抗原はT細胞に認識され、このT細胞亜群(IL-2R β ⁺TCR^{int}細胞)は胸腺外分化T細胞と考えられている。申請者はH-Y抗原特異的細胞障害性T細胞を誘導して、その細胞性格を検討した。雄マウスの脾細胞を雌マウス腹腔内に移入し、肝脾リンパ球の解析、細胞障害試験を行ったところ、胸腺外分化T細胞とNKT細胞が増加し、H-Y抗原特異的細胞障害活性のeffector細胞はNKT細胞とCD8⁺細胞であった。後者はcell sortingによる検索で胸腺外分化T細胞(CD3^{int}NK1.1⁻CD8⁺細胞)と考えられた。またCD4⁺NKT細胞を欠損するマウスを用いた同様な実験ではeffector細胞としてCD8⁺NKT細胞(CD3^{int}NK1.1⁺CD8⁺細胞)の関与が考えられた。

以上、本研究は拒絶反応に関わる雄特異的H-Y抗原の認識と細胞障害機構に胸腺外分化T細胞とNKT細胞が関与することを示した点に学位論文としての価値を認める。