

	いずみ なかこ
氏 名	泉 菜花子
学 位	博 士 (医学)
学位記番号	新大院博(医)第55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	Expansion of NK1.1 <sup>+</sup> intermediate TCR cells and granulocytes in mice transplanted with TAP-1-deficient cells (TAP-1 欠損細胞移植後の宿主マウスにおこる NK1.1 <sup>+</sup> intermediate TCR と顆粒球の増加について)
論文審査委員	主査 教授 内 藤 眞 副査 教授 安 保 徹 副査 教授 藤 井 雅 寛

#### 博士論文の要旨

【目的】 MHC Class I 分子を遺伝的に欠損するマウスの骨髄を 9 Gy の放射線照射した MHC 適合マウスに移植すると、7～10日後に宿主は死亡する。これは宿主のNK細胞が放射線抵抗性であるため、照射後も残っていて、ドナー細胞を非自己と認識し排除するために起こる現象であると考えられている。我々の研究室では、NKT細胞および胸腺外分化T(NK1.1<sup>+</sup>CD3<sup>int</sup>T)細胞の性質と機能について報告してきた。肝臓はNK細胞を豊富に含むが、NKT細胞および胸腺外分化T細胞も多く含む事が知られている。これらの細胞もまた、放射線抵抗性であり、NK細胞と同様にPerforinやFas-Lによる細胞傷害能を有し、Ly49等の自己MHC分子をリガンドとする抑制型受容体を細胞表面に持つ事が報告されている。これらの事からNKT細胞および胸腺外分化T細胞も、MHC Class I分子を欠損する細胞に対して排除能を持ちうるのではないかと考えられた。また、これまでの実験方法では宿主は移植後7～10日で死亡するため、移植後肝臓内の白血球の動態は報告されていなかった。そこで今回の実験では宿主の放射線照射を6Gyで行い、移植後の生存率を上げ、移植後肝臓内の白血球の動態を解析した。

【方法】 宿主として8～10週齢のC57BL/6 (B6)-Ly5.1マウスを用いた。ドナー細胞としてMHC Class I分子を遺伝的に欠損するマウスであるTAP-1KO(B6 background)、シンジェニック対照群

として B6、及びアロジェニック対照群として BALB/c マウスの骨髄細胞を Thy1.2 抗体補体処理して用いた。宿主に 6Gy の放射線照射後、ドナー細胞を  $1 \times 10^7$  個ずつ尾静脈投与し、移植後経時的に肝の白血球を常法により分離しフローサイトメーターを用いて解析した。宿主とドナーの細胞は Ly5.1 抗体を用いて識別した。移植後 3 週目の肝由来白血球の機能の変化を調べるため、クロミウム遊離試験にて細胞傷害能を、及び PMA 刺激に対する活性酸素産性能をルミフォトメーターにて測定した。また、ELISA 法により血清中のサイトカイン量を測定した他、移植後の肝から total-RNA を抽出し RT-PCR 法にて、サイトカイン mRNA の発現の有無を調べた。また、肝のヘマトキシリン・エオシン染色組織標本を作成し顕微鏡下で観察した。NK1.1 抗体を宿主マウスに投与し、NK 細胞および NKT 細胞除去下における移植後の反応についても検討した。

【結果と考察】肝において、白血球数は照射の影響で減少するが、B6-BMT 群では移植後経時的な増加を認め、3 週目では正常値となった。BALB/c-BMT 群においては B6-BMT 群と比較して差異は認められなかった。TAP-1KO-BMT 群においては 2 週目で B6-BMT 群と比較して高い値となる傾向が示された。全白血球中に占めるドナー細胞の割合は、B6-BMT 群では経時的に増加し、3 週目で 60~80% を占めるが、TAP-1KO-BMT 群においては 1 週目から 2 週目にかけて約 40% となり増加が認められるが、3 週目には約 15% 以下となり減少を認めた。肝の組織学的観察では TAP-1KO-BMT 群の 2 週目と 3 週目にのみ、胆管および門脈域に白血球の著しい浸潤を認めた。宿主リンパ球の細胞表面抗原を解析した結果、TAP-1KO-BMT、BALB/c-BMT 群において胸腺外分化 T 細胞が B6-BMT 群と比べ増加した。NK 及び NKT 細胞の増加は 2~3 週目では認められなかった。また、TAP-1KO-BMT 群の 2~3 週目において顆粒球 (Mac-1<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>細胞) の著しい増加を認めた。細胞傷害活能は BALB/c-BMT 群のリンパ球は BALB/c-脾 ConA blast に対して高い細胞傷害能を示したが、TAP-1KO-BMT 群では TAP-1KO-脾 ConA blast に対しては認められなかった。YAC-1 に対する細胞傷害能は TAP-1KO-BMT、BALB/c-BMT 群で、正常 B6 および B6-BMT 群と比較して有為に低下した。PMA 刺激による活性酸素産性能は TAP-1KO-BMT 群の 2 週目と 3 週目において著しく高い値となった。BALB/c-BMT 群では血清中の INF  $\gamma$ 、IL-2 の増加が認められたが、TAP-1KO-BMT 群では検出されず、IL-6、TNF  $\alpha$ 、GM-CSF の炎症性サイトカインの mRNA の発現が認められた。NK1.1 抗体を投与した群においても、非投与群と同様に 2 週目での細胞数の増加、2~3 週目のドナー細胞の低下、胸腺外分化 T 細胞、顆粒球の著しい増加、胆管および門脈域への白血球の浸潤が認められた。

これらのことから、肝臓では移植後 2、3 週目 (後期) で MHC Class I 分子 (TAP-1) 欠損細胞に対する拒絶反応がおこり、それは NK 細胞以外に胸腺外分化 T 細胞、顆粒球が関与している事が示唆された。

## 審査結果の要旨

申請者は MHC クラス I を欠損するマウスの骨髄細胞を放射線照射した MHC 適合マウスに移植し、ドナー細胞が放射線抵抗性の宿主細胞に排除されるモデルを検討した。

その結果、ドナー細胞は一時増加するものの、3 週から減少し、胆管と門脈域に顆粒球の浸潤がみられ、顆粒球の活性酸素産生が亢進し、IL-6、TNF  $\alpha$ 、GM-CSF などの炎症性サイトカインも増加した。NK 細胞の抗体を投与しても、顆粒球の増加、浸潤が認められた。

本研究は MHC クラス I 欠損マウス骨髄細胞の拒絶反応に NK 細胞、胸腺外分化 T 細胞に加え、顆粒球が関与していることを示した点に学位論文としての価値を認める。