

論文の内容の要旨

論文題目 ヒト T 細胞機能及び活性化におけるテトラスパン・スーパーファミリー
の役割—CD9分子を中心として—

指導教官 森本 幾夫 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 小林 弘

(序論)

T 細胞は、免疫応答の中核的な役割を果たしている。その中でも CD4⁺T 細胞は、その中心的存在である。ヒト CD4⁺T 細胞は、CD45RO⁺CD29^{high} メモリー T 細胞サブセット、CD45RA⁺CD29^{low} ナイーブ T 細胞サブセットという機能的に異なる二大サブセットから構成され、これら T 細胞サブセットが直接的、間接的に相互作用し T 細胞による免疫応答の調節がなされている。各 T 細胞サブセットの機能解析とその細胞表面分子の構造及び機能の研究によって、T 細胞上の細胞表面分子は単なるサブセットのマーカーとしてだけでなく、その機能に密接に関わっていることが明らかとなってきた。

1993 年に当研究室の野島らは、メモリー T 細胞サブセットに優位に発現する CD82 分子を報告した。この分子は、N 末端、C 末端ともに、細胞内に存在し、4 回膜貫通型の蛋白質と推定され、テトラスパン・ファミリーという新しいファミリーを形成している。その発現は、血液系細胞を始め、上皮細胞、内皮細胞、神経細胞など様々な組織で認められ、細胞の活性化、増殖、運動性、融合などの機能に関与していると考えられているが、その生体での役割は不明である。

森本らは、ヒト T 細胞サブセットにおける免疫応答の調節機構の詳細を明らかにする目的で、種々の T 細胞サブセットに対するモノクローナル抗体を樹立し、その対応抗原分子を同

定し、解析を行ってきた。この目的で、抗 5H9 抗体も樹立されたが、その対応抗原は不明であった。

本研究においては、抗 5H9 抗体は CD45RA⁺ナイーブ T 細胞サブセットの一部と優位に反応することから、この対応抗原分子がナイーブ T 細胞サブセットの機能に関わっている可能性を考え、第一部では、この 5H9 抗体の対応抗原の解析及び分子の同定を行った。その結果、テトラスパン・ファミリーに属する CD9 分子であった。第二部では、更に、この分子の機能解析としてアポトーシス誘導能の解析と CD9⁺CD45RA⁺T 細胞の機能を解析し、T 細胞に発現する CD9 分子の意義について検討した。

(第一部)

緒言)

CD45RA⁺ナイーブ T 細胞サブセットの機能やその意義について更に明らかにするために、このサブセットの一部と優位に反応する抗 5H9 抗体の対応抗原分子の解析及び同定を行った。

方法及び結果)

抗 5H9 抗体は、ヒト赤白血病細胞株 K562 を BALB/c マウスに免疫することによって得られた。フローサイトメトリーで解析すると、5H9 抗原は末梢血 T 細胞の平均 $26.6 \pm 9.5\%$ $n=5$ に発現し、CD45 アイソフォームとの関係は、CD45RO⁺細胞では $4.9 \pm 3.7\%$ と発現は乏しいが、CD45RA⁺細胞では $22.6 \pm 10.2\%$ と優位に発現していた。さらに、PHA などのマイトージエン刺激による T 細胞の活性化にともなって、陽性率は 57% に増強し、T 細胞に対する抗 CD3 抗体と抗 5H9 抗体による固相化刺激によって、共刺激活性を誘導することが明らかとなった。そして、免疫沈降法では分子量約 24kDa の蛋白質であることが判明し、レトロウイルスベクターによる発現クローニング法を用いて cDNA クローニングを行い、その塩基配列を決定したところヒト CD9 であった。

結論)

CD45RA⁺ナイーブ T 細胞サブセットに優位に発現し、T 細胞の活性化に伴う発現の増強や、共刺激活性を有する 5H9 抗原はテトラスパンファミリー分子の CD9 であることが明らかとなった。同じテトラスパンファミリーに属する CD82 が、メモリーサブセットに優位に発現しているというこれまでの報告からも、各サブセットの機能への関わりが強く示唆された。

(第二部)

緒言

これまで、マウス T 細胞においては、CD9 は CD3/T 細胞抗原受容体(TCR)依存性の共刺激シグナルとそれに引き続いてアポトーシスを介する活性化細胞死を誘導するとの報告がある。第二部では、ヒト CD9 分子を介するアポトーシスの検討とヒト CD9⁺CD45RA⁺T 細胞サブセットの機能を検討することによって、テトラスパンファミリー分子 CD9 のヒト T 細胞における機能的意義について検討した。

方法及び結果

1. 抗 5H9 抗体による CD9 のクロスリンクに伴うアポトーシスの誘導

ヒト末梢血 T 細胞で CD3/TCR と CD9 の共刺激では、マウスで報告されているような増殖反応の低下がおこらなかったことから、更に抗 5H9 抗体と抗マウス Ig を用いて、液相クロスリンクによる刺激後のアポトーシスについて、Rapid PI 染色法を用いて検討した。はじめに、末梢血 T 細胞、PHA-activated T cell blasts を用いて検討した結果、抗 5H9 抗体では、アポトーシスは誘導出来なかった。更に、末梢血由来の T 細胞クローンを用いて同様の検討を行ったところ、CD9 の発現が高い 2 種類のクローン(clone1, clone2)に対してアポトーシスが誘導された。そこで、CD9 が発現していない Jurkat T 細胞株で、Jurkat CD9 トランスフェクタント細胞を作製し、抗 5H9 抗体によるクロスリンクを行ったところアポトーシスを誘導することが出来た。これらの結果から、抗 5H9 抗体を単独で用いた CD9 のクロスリンクで、T 細胞に対してアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。

2. 抗 5H9 抗体の autologous mixed lymphocyte reaction(autoMLR)に対する影響

次に CD9 分子が、T 細胞と non-T 細胞 (マクロファージや樹状細胞、B 細胞など) との細胞-細胞間相互作用に関与しているかを検討するために、mixed lymphocyte reaction の系に抗 5H9 抗体を添加し、その影響を検討した。allogeneic MLR や PHA 刺激においては、コントロール抗体、あるいは抗 5H9 抗体を添加しても、³H チミジンの取り込みに変化は認めなかったが、autologous MLR の系に、抗 5H9 抗体を添加した場合のみ、抗体なし及びコントロール抗体の場合と比較して有意に抑制した(P<0.05)。このことから、CD9 分子が autologous MLR に関与している可能性が強く示唆された。

3. CD9⁺T 細胞サブセットの自己抗原に対する反応性について

さらに、抗 5H9 抗体が autologous MLR を抑制したことや CD45RA⁺T 細胞サブセットが、

自己抗原への反応性を示すサブセットであるとの報告などから、CD9⁺CD45RA⁺T 細胞サブセットの自己抗原に対する反応性を検討した。自己抗原としては、 β_2 -glycoprotein I(β_2 GPI)を用いた。CD9⁺CD45RA⁺サブセット(平均±標準偏差：21210±3851 cpm)と CD9⁺CD45RA⁺サブセット(平均±標準偏差：13930±652 cpm)を比較すると、有意に CD9⁺CD45RA⁺サブセットに高い反応が認められた。このことから、CD45RA⁺ T 細胞サブセットの中でも CD9⁺CD45RA⁺T 細胞が自己抗原反応性サブセットを多く含む可能性が示唆された。

結論)

ヒト CD9 分子は T 細胞上において、CD9 単独の液相クロスリンクにより、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。これまで、ヒト T 細胞では発現していないと考えられていた CD9 分子が、ヒト T 細胞でも発現し、CD3/TCR 刺激依存性の共刺激あるいは CD9 単独の刺激によるアポトーシスを誘導し、機能分子としての役割を果たしている可能性が示された。また、抗 5H9 抗体は、autologous mixed lymphocyte reaction を抑制し、更に CD9⁺CD45RA⁺T 細胞サブセットは、自己抗原 (β_2 GPI) に対して反応性を示すサブセットを多く含むことから、自己免疫との関連性を示す CD45RA⁺ナイーブ T 細胞サブセットの一部がテトラスパンファミリー分子 CD9 の発現によって機能制御されている可能性が示唆された。

今後は、CD9 のリガンドや会合分子の同定などを含めた共刺激活性及びアポトーシス誘導メカニズムといった T 細胞における CD9 分子の機能解析をさらに深く研究していくこと、全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患患者で、CD9 分子の機能異常を検討していくことは、自己免疫疾患の病態メカニズムの解明にせまる新しいアプローチとなり、新たな治療法開発に結びつく可能性も期待される。