

## 論文の内容の要旨

応用動物科学 専攻  
平成 11 年度博士課程 進学  
氏名 安田 琢和  
指導教官名 小野寺 節

論文題目 : Analysis of mechanisms of enhanced T cell responses in *plt* mice  
(*plt* マウスにおける T 細胞反応増強機構の解析)

リンパ節、パイエル板、脾臓など 2 次リンパ組織の T 細胞領域に発現しているケモカイン CCL21(SLC: secondary lymphoid tissue chemokine) および CCL19(ELC: EBV-induced molecule 1 ligand chemokine)は、T 細胞や樹状細胞がこれらの 2 次リンパ組織へ遊走する現象に深く関与している。ナイーブ T 細胞は CCL21 および CCL19 の共通の受容体である CCR7 (CC chemokine receptor 7) を発現しており、血流中から二次リンパ組織の高内皮細静脈を経て CCL21、CCL19 を発現する T 細胞領域へ遊走する。末梢組織で抗原を取り込んで活性化された樹状細胞も CCR7 を発現し、輸入リンパ管を経てリンパ節 T 細胞領域へ遊走し、抗原特異的ナイーブ T 細胞の反応を促すと考えられている。*plt* (paucity of lymph node T cells) マウスでは CCL21 と CCL19 の発現を欠き、ナイーブ T 細胞と樹状細胞の 2 次リンパ組織 T 細胞領域への遊走に異常が認められる。したがって *plt* マウスでは in vivo に免疫しても T 細胞反応がみられないか低下すると推測されたが、実際に検討してみると T 細胞反応の立ち上がりにやや遅延

は見られたが反応自体はむしろ増強され、しかも極めて長期間持続していた。この現象のメカニズムを明らかにできれば、生体内で本来見られるT細胞反応の制御メカニズムを知る有力な手がかりになると考えられる。本研究では *plt* マウスにおける免疫後のT細胞、樹状細胞の動態を解析し、*in vivo* T細胞反応における増強機構の解析を試みた。

## 第1章 ケモカイン CCL21 および CCL19 を欠損する *plt* マウスにおける T 細胞の活性化起因性細胞死の解析

ニワトリ卵白アルブミン(OVA)を抗原とし、CFA(Complete Freund's Adjuvant)とともにマウス足蹠に免疫し、所属リンパ節である膝下リンパ節の T 細胞について反応性を検討した。*in vitro* において OVA で再刺激した際の T 細胞増殖反応の測定を行うと、免疫後 9 日目には、*plt* と野生型マウスでともに同程度の高い反応性がみられた。その後、野生型マウスでは 16 日目から 18 日目の間で反応性の低下がみられたが、*plt* マウスでは 20 日目でも低下せず高い反応性が続いた。免疫後の所属リンパ節内の T 細胞数を測定したところ、野生型マウスでは免疫後 16 日目をピークとする急激な増加がみられ、以後は急激に減少した。*plt* マウスでは免疫により増加した後、20 日後にも減少せず増加したままであった。OVA 特異的 T 細胞抗原レセプター(TCR)を構成することが報告されている V $\beta$ 8 と V $\beta$ 14 の発現をみると、これらの TCR-V $\beta$ 鎖を発現する T 細胞は T 細胞全体の増加と減少に合わせて増減がみられ、OVA に反応する T 細胞にはみられないとされる V $\beta$ 6陽性 T細胞には免疫による増減はみられなかった。このことから、抗原 OVA に反応する T細胞の増加が強く示唆された。

野生型マウスで 18 日目以降に反応性が低下するのは抑制性細胞が出現するためであるという可能性がある。免疫後 20 日目の野生型マウスと *plt* マウスそれぞれの所属リンパ節細胞を混合して抗原に対する反応を見たところ、T 細胞増殖反応の抑制はみられず、この可能性はないと考えられた。次に野生型マウスで免疫後の所属リンパ節において増加した T 細胞の減少はアポトーシスによるのではないかとする可能性について検討を行った。野生型マウスでは、免疫後 18 日をピークとするアポトーシスを誘導された T 細胞の割合の増加がみられた。しかし *plt* マウスでの T細胞のアポトーシスの誘導率は、免疫前に比べ、むしろ減少していた。この時、免疫後 18 日目の所属リンパ節細胞で、TCR-V $\beta$ 8 を発現する T 細胞の割合が *plt* マウスでより、野生型マウスで多くみられた。

このことから野生型マウスでは OVA に反応して増加した T 細胞にアポトーシスが誘導されたと考えられた。一方、*plt* マウスでは、抗原に反応した T 細胞に誘導されるアポトーシスがわずかであったため、抗原に対する反応性が持続しているという可能性が示唆された。

活性化された T 細胞の細胞死の機構として、T 細胞レセプターへの繰り返し刺激により Fas-FasL の系を介し誘導される Activation-induced cell death (AICD) が考えられていて、これには T 細胞自身による自殺も含まれるとされている。そこで、Fas と FasL を発現する T 細胞の割合を検討したところ、野生型マウスではどちらにも免疫後に増加がみられた。*plt* マウスでは Fas を発現する T 細胞で免疫によりわずかな割合の増加がみられたが、FasL を発現する T 細胞はむしろ減少していた。このことは *plt* マウスにおいて T 細胞のアポトーシスの誘導が少ないことの説明となり得るかもしれない。

## 第 2 章 増強された T 細胞反応を呈するケモカイン CCL21 および CCL19 を欠損する *plt* マウスにおける樹状細胞の役割

樹状細胞は、T 細胞に抗原を提示し、免疫反応を開始させるという重要な役割を担っている。足蹠に免疫後の所属リンパ節内の樹状細胞数を測定したところ、野生型マウスでは免疫後 14 日目をピークとする増加がみられ、以後は減少していた。*plt* マウスでも同様の増加がみられたが、以後の減少は緩やかであった。増加した樹状細胞が足蹠に免疫された抗原を保持していることを検討するため、FITC 標識 OVA で免疫し、FITC を保持した樹状細胞の検出を試みた。野生型マウスでは免疫後 14 日目まで FITC を保持した CD11c 陽性細胞が検出されたが、20 日目には減少していた。*plt* マウスでもそのような細胞がみられ、20 日目にも存在が認められた。この長期間存在する *plt* マウスの樹状細胞が、T 細胞の長期にわたる反応を助けているとも考えられる。所属リンパ節におけるアポトーシス樹状細胞を検討してみると、野生型マウスでは 16 日目をピークとするアポトーシスの誘導が認められたが、*plt* マウスでは明らかなピークは認められず、アポトーシスの誘導はあるとしても軽微であった。通常、抗原提示を行った樹状細胞は速やかな細胞死を迎えるとされているが、*plt* マウスでは、この細胞死を免れていると考えられる。樹状細胞は、自身が活性化した CD4 陽性 T 細胞によって Fas-FasL の系を介して細胞死が誘導されるとする機構が報告されているが、*plt* マウスで所属リンパ節に長期間存在するのは、FasL を発現

した T 細胞の割合が、免疫前に比べ、減少していることと関係があるかもしれない。

### 第3章 正常リンパ節移植による T 細胞反応の制御

*plt* マウスでも、正常なリンパ組織を移植すれば T 細胞反応の制御が回復するかどうかを検討した。*plt* マウスの鼠蹊部に野生型マウスのリンパ節を移植すると、移植リンパ節へ一時的に細胞の流入が強くなり重量が増加するが、その後減少して一定になる。一定になった後、足蹠に免疫をすると、免疫後 30 日目には、野生型マウスでみられた T 細胞反応の制御がみられるようになった。*plt* マウスのリンパ節を *plt* マウスに移植したのでは、このような制御の回復はみられなかった。移植した野生型マウスリンパ節中の T 細胞の割合が、免疫前に比べ、30 日目では減少していることから、移植リンパ組織による T 細胞反応の制御が考えられた。この時、レシピエントである *plt* マウスの所属リンパ節では、免疫前後で T 細胞の割合に変化はみられなかった。

*plt* マウスでは樹状細胞から T 細胞への抗原提示の場であるリンパ節の T 細胞領域の形成不全が報告されているにも関わらず、T 細胞反応が誘導される。これは、野生型マウスでみられるような本来の領域ではないが樹状細胞と T 細胞の接触があるためであると説明される。しかし、そのような接触では頻度や効率の低下が考えられる。このことが、その後の T 細胞の活性化、さらには樹状細胞の動態に影響を与えている可能性がある。野生型マウスで細胞死が進行している時期の、*plt* マウスでのリンパ節構造および樹状細胞と T 細胞の局在については、現在のところ明らかにできてはいないが、細胞死の際に正常リンパ節環境が重要であることは、第3章で示した移植実験の結果により示唆されている。

以上の結果から、*plt* マウスにおける免疫後の T 細胞反応の増強と長期にわたる持続は、所属リンパ節内で T 細胞と樹状細胞のアポトーシスの誘導が軽微であったことから、各細胞の減少がわずかとなり、もたらされたと考えられた。そしてこのことは *plt* マウスのケモカイン CCL21 および CCL19 の欠損により生じるリンパ組織内での T 細胞と樹状細胞の局在および相互作用の異常が影響していると考えられた。