

## 論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 11 年度博士課程 入学

氏 名 李 元雨

指導教官名 吉川 泰弘

論文題目 Studies on extrathymic  $CD4^+CD8\alpha\alpha^+$  double positive T cells in the peripheral blood of cynomolgus monkeys.  
(カニクイザルの末梢血  $CD4^+CD8\alpha\alpha^+$  両陽性胸腺外 T 細胞に関する研究)

本論文はカニクイザルの末梢血 DP T 細胞の加齢に伴う変化とその免疫的意義を明らかにすることを目的としたものである。

免疫機能に重要な役割を果たしている T 細胞は胸腺内で  $CD4^-CD8^-$  両陰性細胞から、 $CD4^+CD8^+$  両陽性 (DP: double positive) 細胞を経て CD4 または CD8 のみを発現した single positive (SP) T 細胞へ成熟分化し、それぞれヘルパー T 細胞 ( $T_H$ ) と細胞傷害性 T 細胞 (CTL) として免疫応答の中樞をになう。一方、胸腺は比較的早期に退縮することから、胸腺退縮後の T 細胞の起源についてはいまだに十分な解明がなされていない。最近、ヒトの末梢リンパ球中には  $CD4SP$ 、 $CD8SP$  T 細胞だけでなく、少数の DPT 細胞が存在し、末梢 DPT 細胞が一時的あるいは持続的に増加することが報告された。DPT 細胞の増加はウイルス感染、自己免疫疾患、白血病、腫瘍などの罹患者のみならず正常なヒト (特に、高齢者) でも認められる。これらの末梢 DPT 細胞は  $CD8\alpha\beta$  ヘテロダイマーの胸腺 DP 細胞と異なり、 $CD8\alpha\alpha$  ホモダイマーであることから、胸腺外で分化した T 細胞 lineage である可能性が示唆されているが、末梢 DPT 細胞の免疫学的意義については未だ明らかではない。

興味深いことに、マカカ属サル類、ブタ、ニワトリでは正常個体の末梢中に DP T 細胞が比較的高レベルで存在していることから、免疫応答において何らかの役割を果たしている可能性が示唆されている。特に、マカカ属カニクイザル (*Macaca fascicularis*) では加齢にともない末梢血中に高頻度に  $CD4^+CD8\alpha\alpha^+$  DPT 細胞が出現することが報告されている。この末梢 DPT 細胞は、①胸腺退縮時期の前後で急激に増加すること、②胸腺内の未分化 T 細胞と異なり胸腺マーカーを発現しておらず、休止期成熟記憶細胞の表現型を示すこと、③細胞傷害活性とヘルパー機能を併せ持つ、特異な T 細胞であること、④一部の  $CD4 SP$  T 細胞と同じ T 細胞レセプター  $V\beta$  鎖の clonality を持つことなどが明らかされてきた。これらの知見は、成熟カニクイザルの末梢 DPT 細胞が胸腺退縮後に胸腺外分化した T 細胞である可能性を強く示唆しているが、末梢 DPT 細胞の起源、分化過程、遺伝支配に関しては未だ明らかになっていない。本研究では、この末梢血 DPT 細胞の由来および分化過程を明らかにし、ヒトを含む高等動物における胸腺外分化 T 細胞の免疫学的な意義を解明することを目的とする。本論文は 4 章から構成される。以下に各章の要約と意義を述べる。

第 1 章は、カニクイザルの DPT 細胞レベルに及ぼす遺伝的影響について述べている。DPT 細胞はカニクイザルで胸腺退縮が完了する 10 歳以上で急激に増加するが、一部の個体では増加が見られないことから、DP T 細胞レベルに遺伝的要因が関与する可能性が考えられた。そこで、10 歳以上の個体で構成される 24 家系について DP T 細胞レベルを調査し、家系調査の結果を基に DPT レベルに及ぼす遺伝的影響を解析した。まず、無作為に抽出した 195 頭で調査した DPT 細胞レベルの分布から、DPT 細胞レベルが末梢リンパ球の 5% 以上を占める固体を高レベル群、以下を低レベル群と定義した。両親が高×高の組み合わせ

(13 頭) からは 69.2%、高×低の組み合わせ (9 頭) からは 33.3% の高レベルの子供がそれぞれ生まれたが、低×低の組み合わせから生まれた 2 頭はいずれも低レベルであった。さらに、両親と子供の DPT レベルとの相関で得られる遺伝率 ( $h^2$ ) が  $0.54 \pm 0.19$  であることから、カンクイザルでは末梢 DPT 細胞レベルに遺伝的要因が関与する可能性が示唆された。

第 2 章では、DPT 細胞の出現時期を特定し、胸腺退縮との関連を明らかにする目的で行った 5 年間の縦断的調査結果を述べている。6 歳齢の 12 頭のカンクイザルを DPT 細胞レベルにより、高中低の 3 群に分けて 5 年間の縦断的調査を行った結果、高群 (>5%) の 3 頭では 7 歳で 10% 以上に急増した。中群 (1-5%) の 6 頭では DPT 細胞レベルは徐々に増加し、9 歳齢で 5% 以上となったが、低群 (<1%) の 3 頭では DPT 細胞レベルは 11 歳まで変化しなかった。このことから、大部分のカンクイザルでは胸腺退縮が完了する 10 歳前に DPT 細胞レベルが 5% 以上に達することが明らかになった。さらに、DPT 細胞が急増した個体では 6 歳齢の時点で休止期成熟記憶 T 細胞の表現型を示す細胞の割合が高いことから、免疫系の成熟度が DPT 細胞レベルに影響することが示唆された。末梢血 DPT 細胞の起源を明らかにする目的で、胸腺起源細胞マーカーである TREC (T cell receptor excision circles) の定量的測定法ができる PCR-ELISA をセットアップした。このシステムを用いて 5 年間の縦断的調査で DPT 細胞が急増した個体 (3 頭) と変化しなかった個体 (3 頭) から T 細胞を分離し、cjTREC のレベルを調べた結果、末梢 DPT 細胞増加が認められたサルでの cjTREC のレベルが有為に低かったことから、胸腺退縮が加齢に伴う DPT 細胞増加要因の一つと考えられた。

第 3 章では、カンクイザルの末梢 DPT 細胞と腸管上皮細胞間リンパ球 (IEL) 中の DPT 細胞との性状比較を述べている。マウス等では胸腺外 T 細胞の分化の場として小腸上皮の IEL が考えられている。IEL の 20-30% が  $CD4^+CD8\alpha^+$  両陽性 (IEL-DP 細胞) の表現型を持っていることから、末梢 DPT 細胞は IEL の一部が小腸上皮から末梢に移動したものである可能性も示唆されてきた。そこで、DPT 細胞レベルが高い群 (>5% : 4 頭) と低い群 (<5% : 4 頭) のカンクイザルから IEL を分離し、IEL-DP のレベルを比較した結果、両集団で IEL-DP 細胞レベルに有意な差は認められなかった。さらに、末梢 DPT 細胞と IEL-DP 細胞について細胞表面マーカー (インテグリン、活性化マーカー、メモリー細胞マーカー、共刺激分子) の発現をフローサイトメトリー (FACS) で調べた結果、末梢 DPT 細胞が非粘膜組織ホーミング細胞の表現型 (インテグリン  $\alpha 4^{high}$ 、 $\beta 1^{high}$ 、 $\beta 2^{high}$ 、 $\beta 7^{variable}$ 、また  $CD103^-$ ) を示すのに対し、IEL-DP 細胞は粘膜組織ホーミング細胞の表現型 (インテグリン  $\alpha 4^{low}$ 、 $\beta 1^{low}$ 、 $\beta 2^{low}$ 、 $\beta 7^{high}$ 、また  $CD103^+$ ) を示すことが明らかになった。さらに、活性化マーカー (CD69) の結果から、IEL-DP は末梢 DPT 細胞と異なり活性化状態であることも判明した。末梢 DPT 細胞と IEL-DP の由来を明らかにするため、RT-PCR-SSCP (single-strand conformational polymorphism) 法を用いて IEL-DP と末梢 DPT 細胞の T 細胞レセプター V $\beta$  鎖の clonality を比較した結果、両者に共通の T 細胞レセプター V $\beta$  鎖は認められなかった。これらの結果から、末梢 DPT 細胞が IEL-DP 細胞に由来する可能性は否定された。

第 4 章では、テロメア長の解析により、末梢 DPT 細胞の分化過程を記述している。テロメアは細胞の分裂回数と関連して短縮することから、末梢リンパ球の分化段階を解析する手法としてテロメア長が使われている。Section 1 ではまず、テロメア固有の反復配列と相補性を示す蛍光標識の PNA (Peptide Nucleic Acid) プローブを用いてハイブリダイズしたリンパ球の蛍光強度から相対的なテロメア長をフローサイトメトリーで測定する方法 (Flow FISH) を確立した。その方法により、年齢の異なるカンクイザル (0 歳から 35 歳までの 55 頭) の末梢血リンパ球のテロメア長を測定したところ、末梢リンパ球のテロメア長は 10.5kbp (kilo base pairs) から 16.5kbp まで分布しており、平均値は  $14.2 \pm 1.2$  kbp であった。またカンクイザルのリンパ球のテロメア長短縮スピードは一年あたり平均で 62.7bp とヒト

の 59bp とほぼ同様な値であった。次に、末梢リンパ球の分化過程解析に Flow FISH が応用可能か否かを調査した。ナイーブ T 細胞マーカーである CD62L をマーカーにして、CD4 及び CD8 SP T 細胞から高純度の CD62L<sup>+</sup> 及び CD62L<sup>-</sup> T 細胞をソートし、それぞれのテロメア長を比べた。その結果、CD4 及び CD8 SP T 細胞の CD62L<sup>+</sup> T 細胞のテロメア長が CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> T 細胞より、それぞれ 920bp、450bp 長いことが明らかになった。これらの結果から、加齢に伴うメモリー T 細胞の増加が末梢リンパ球のテロメア長短縮の要因と考えられた。Section 2 では、DPT 細胞のテロメア長の解析結果を述べている。DPT 細胞がメモリー T 細胞の表現型を示すことから、DPT 細胞のテロメア長は短いことが推測されていたが、DPT 細胞のテロメア長はメモリー CD4 SP よりも短いことが明らかになった。末梢 DPT 細胞と CD4SP 細胞が同一の起源である可能性が示唆されているが、両者のテロメア長の比較から DPT 細胞は CD4 SP T 細胞の一部が末梢で clonal expansion した細胞集団である可能性が高いと考えられた。

以上、本論文はカニクイザルの末梢血 CD4<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DPT 細胞の起源、分化過程、遺伝支配に関して新たな知見を提供した。胸腺退縮後の末梢 T 細胞の出現機構については未だに確証は得られていない。末梢 DPT 細胞の出現というヒトとは異なるシステムを有するカニクイザルの特性を利用して、胸腺外分化 T 細胞の免疫学的な意義を解明するためには、今後、抗原認識に関わる胸腺外 T 細胞のマーカーである CD8 $\alpha$  ホモダイマーの役割についての研究が必要となる。