

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 王 泳

本研究は *in vivo* における $CD8\alpha^+$ DC の発生機構を明らかにするため、放射線照射した近郊系マウスに脾臓由来 $CD8\alpha^+CD11c^-$ lineage phenotype(Lin)⁻ 細胞を移入するシステムを用いて、同細胞の $CD8\alpha^+$ DC 前駆細胞としての可能性を検討した研究であり、下記の結果を得ている。

1. *in vivo* における $CD8\alpha^+$ DC の前駆細胞を同定するために、 $CD8\alpha^+CD11c^-$ Lin⁻ 細胞を脾臓より単離した。3-color 蛍光染色より、本細胞は CD3 ϵ 、B220、CD11b、Gr-1、NK1.1、Ia、CD40、CD86、CD4 のいずれの表面抗原も発現していなかったが、CD8 β を発現していた。本細胞は非常に数が少なく、C57BL/6 マウスでは、全脾臓細胞の 0.2~0.25% であった。Gimsa 染色の結果、 $CD8\alpha^+CD11c^-$ Lin⁻ 細胞は、リンパ球系細胞様の丸い形状をしていた。さらに、本細胞集団は、骨髄及び種々のリンパ節においても検出され、全リンパ節細胞の 0.2% 及び骨髄白血球の 0.06% であった。
2. *in vivo* において $CD8\alpha^+CD11c^-$ Lin⁻ 細胞が $CD8\alpha^+$ DC に分化するか否かを明らかにするために、 5×10^5 個の Ly5.2B6 マウス脾臓由来 $CD8\alpha^+CD11c^-$ Lin⁻ 細胞を、致死量の放射線照射した Ly5.1B6 マウスの尾静脈内に移入した。ドナー由来 Ly5.2⁺Ia⁺ 細胞は、移植後 7 日目においてすでに脾臓で検出され、移植後 14 日目にピークとなった。これらドナー由来細胞は、中位から高レベルの Ia と共に、DC に特徴的な CD11c、DEC-205、CD40、CD86 分子を発現していた。驚いたことに、移植後 7-21 日目において、これらのドナー由来細胞のすべてが CD8 α を発現しており、機能の点では、これらドナー由来 Ly5.2⁺CD8 α^+ Ia⁺ 細胞が、アロ T 細胞の増殖を誘導した。さらに、移入された脾臓由来 $CD8\alpha^+CD11c^-$ Lin⁻ 細胞は胸腺及びリンパ節にホーミングし、それぞれの臓器において $CD8\alpha^+$ DC へと分化している可能性が示唆された。

次に、*in vivo* において $CD8\alpha^+CD11c^-$ Lin⁻ 細胞が他の系統の細胞へと分化する可能性について検討した。移植後の各 time point (1,2,3,4 wks) におけるドナー由来 (Ly5.2⁺)

細胞の、CD3ε、NK1.1、Gr-1 の発現について解析したが、いずれの lineage marker も検出されなかった。

3. 脾臓におけるドナー由来 DC の局在を解析するために、CD8α⁺CD11c⁻Lin⁻ 細胞を用いて再構築したマウス脾臓の凍結切片を、Ly5.2 及び CD11c、DEC-205、CD8α にて染色した。CD8α の染色は、PALS の T 細胞領域に認められた。また、全てのドナー由来細胞は T 細胞領域に局在し、それらは CD11c、DEC-205 を発現していた。
4. ドナー由来 DC のサイトカイン産生パターンについて解析するために、Ly5.1 骨髄細胞を移植して再構築した Ly5.1B6 マウスの CD8α⁺ DC、及び Ly5.2 脾臓由来 CD8α⁺CD11c⁻Lin⁻ 細胞を Ly5.1B6 マウスに移植して再構築した Ly5.2⁺CD8α⁺Ia⁺ DC を、それぞれ脾臓より高純度でソートした。これらの細胞を、GM-CSF、IFN-γ、Pansorbin の存在下で 40 時間培養した後、培養上清中の IL-12p70 量を ELISA により定量した。同様に、これらの細胞を、rmIL-12 の存在下で 48 時間培養した後、培養上清中の IFN-γ 量を ELISA により定量した。その結果、IL-12p70 及び IFN-γ の産生が、ドナータイプ DC の培養上清に高いレベルで認められた。
5. 最後に、ナイーブ Ly5.2 マウス及び再構築マウスの脾臓由来 Ly5.2⁺CD8α⁺Ia⁺ DC、または、ドナー Ly5.2⁺CD8α⁺CD11c⁻Lin⁻ 細胞における、ケモカイン、ケモカインレセプターの発現パターンについて RT-PCR により解析した。再構築マウスの脾臓由来 Ly5.2⁺CD8α⁺Ia⁺DC は、CCR2,CCR5,CCR6,CCR7 及び T 細胞遊走活性を持つ MDC を発現していた。一方、Ly5.2⁺CD8α⁺CD11c⁻Lin⁻ 細胞は CCR2,CCR5,CCR7 を発現していたが、CCR6 及び MDC は発現していなかった。

以上、本論文はマウス脾臓 CD8α⁺CD11c⁻Lin⁻細胞の、CD8α⁺ 樹状細胞のコミットした前駆細胞としての同定を世界で初めて成功したものである。本研究は細胞レベルあるいは分子レベルにおいて、異なった造血前駆細胞からの CD8α⁺ DC の発生を理解するうえで非常に有効であると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。