

論文の内容の要旨

論文題目 **Development and function of thymic macrophages**

(胸腺内マクロファージの起源、分化機構及び機能の解析)

氏名 江指 永二

脊椎動物はウイルスや細菌などの侵入から自己を守るため、食細胞やリンパ球を中心とする複数の防御系（免疫系）を備えている。これらの細胞はすべて骨髄に存在する全能性の造血幹細胞から多段階の分化過程を経て産生される。造血幹細胞は、まず myeloid 系列と lymphoid 系列の二つの前駆細胞に分化する。Myeloid 系列の前駆細胞は赤血球、顆粒球、血小板、樹状細胞(DC)、マクロファージへと分化し、lymphoid 系列の前駆細胞は、B リンパ球及び T リンパ球系前駆細胞へと分化する。その後 T リンパ球系前駆細胞は胸腺へと移入し、成熟した T 細胞へと分化する。胸腺の構造は皮質と髄質とで構成されており、それらが T 細胞の分化や成熟の異なった段階に関与していると考えられている。一般に胸腺構造の構築には胸腺上皮細胞(TEC)と T 細胞との相互作用が重要であると考えられているが、比較的研究の進んでいる T 細胞とは対照的に TEC の機能や分化メカニズムに関しては不明な点が多い。また、胸腺内には DC やマクロファージ等の T 細胞以外の血液細胞も存在しており、これらが T 細胞の成熟に寄与していることが示唆されているが、胸腺内での存在比率が著しく低いことや特異

的表面抗原が不明なことから、その性質や由来等については不明な点が多い。そこで、私は胸腺における TEC の発達と胸腺内マクロファージの分化に関する解析を行った。

IL-6 ファミリーに属するサイトカインであるオンコスタチン M(OSM)は、マウスの胎仔期から成体期を通して胸腺内で発現が認められており、胸腺内においては主に T 細胞により産生される。そこで、OSM が胸腺構造の構築に関与している可能性を考えた。免疫組織染色により OSM 受容体の発現を調べた結果、胸腺内の皮質と髓質の境界領域にその発現が認められた。そこで、OSM 存在下で胸腺細胞の初代培養を試みた。すなわち、出生直前の胎仔から胸腺を摘出し、酵素処理で細胞を分散させた後に、OSM の存在下あるいは非存在下で培養したところ、OSM 存在下では上皮細胞様の細胞が多数増殖した。さらに OSM 受容体遺伝子欠損マウスを用いて解析を行ったところ、野生型のマウスと比較して T 細胞の分化は正常に行われているものの、髓質領域の肥大化、髓質中心領域の消失が見られ、OSM の機能欠損により胸腺構造の異常を引き起こす結果が得られた。以上の結果より、OSM は生体内において TEC に直接作用し、胸腺構造の構築に寄与しているものと考えられた。

胸腺における T 細胞の成熟過程では大量の胸腺細胞がアポトーシスで死滅するが、それらは胸腺内に存在するマクロファージにより貪食されると考えられている。しかし、胸腺内マクロファージの起源及び機能の詳細な解析はなされていなかった。そこでまず、胸腺内に存在するマクロファージの同定を試みた。胎生 14.5 日目の胸腺を酵素処理により分散させた後、表面抗原をフローサイトメーターを用いて解析した。その結果、マクロファージの画分に、CD4 陽性の細胞集団が存在することが分かった。CD4 は、骨髓や腹腔内中に存在するマクロファージでは陰性であった。したがって、この細胞集団は胸腺特異的に存在していることが予想された。さらに、胸腺内では、この CD4 陽性マクロファージは皮質髓質の境界領域に極在していた。皮質髓質境界領域では多数の T 細胞がその分化過程で死滅するため、この領域にはその死細胞をすばやく貪食する細胞の存在が示唆される。CD4 陽性のマクロファージはこの領域に存在するため、この死細胞を処理する細胞であり高い貪食能を備えていることが予想された。そこで、胸腺内に存在する CD4 陰性マクロファージと CD4 陽性マクロファージの死細胞に対する貪食能を比較した。その結果、CD4 陽性のマクロファージは CD4 陰性のものに比べ非常に高い貪食能を有していることが明らかとなった。さらに、腹腔内

に存在するマクロファージを活性化させてもそのような高い貪食能は得られないことから、胸腺内に存在する CD4 陽性マクロファージは通常の腹腔内マクロファージ等とは異なる性質・起源を持つことが示唆された。

機能や起源がマクロファージと比較的近い関係にあると考えられている DC は myeloid 系列の前駆細胞に由来すると考えられていたが、胸腺内に存在する DC は lymphoid 系列に由来することが示されている。そこで、胸腺内 CD4 陽性マクロファージも lymphoid 系列の前駆細胞に由来する可能性を探った。CD4 陽性マクロファージの前駆細胞を検討するために、*in vitro* での培養による分化誘導を試みた。しかし、種々のサイトカイン存在下でも、胎生 14.5 日目の未分化胸腺細胞から CD4 陽性のマクロファージを誘導することはできなかった。この結果は、CD4 陽性マクロファージは可溶性の因子のみでは誘導されないことを示唆していた。CD4 陽性マクロファージは胸腺内において皮質と髄質の境界領域に極在しており、OSM 受容体の発現パターンと酷似していることや OSM が上皮細胞の増殖を促進することから、CD4 陽性マクロファージの分化における OSM と上皮細胞の関与を検討した。そこで、OSM 存在下での胸腺細胞の初代培養を行ったところ、OSM 依存的に増殖する胸腺由来上皮細胞株(FTEC)が得られた。次に、FTEC 細胞株が未分化胸腺細胞から CD4 陽性マクロファージへの分化を誘導できるのかを調べるため、共培養実験を行なった。胎生 14.5 日の未分化胸腺細胞を、OSM、SCF、IL-7 存在下で FTEC 細胞株と共培養した結果、CD4 の強い発現が誘導され、それらの細胞はマクロファージの表現形を示し、強い貪食能を示した。これにより、FTEC 細胞株は CD4 陽性マクロファージの分化を誘導できることが明らかとなった。OSM が血球に直接作用しないこと、FTEC 細胞株の培養上清ではこのような発現誘導が起こらないことから、未分化胸腺細胞と上皮細胞との直接の相互作用が CD4 陽性マクロファージの分化誘導に必要であると考えられた。さらに、未分化胸腺細胞から CD4 陽性マクロファージへの分化過程を詳細に検討するために、胸腺内に存在する最も未分化な T リンパ球系前駆細胞を単離して共培養実験に用いた。その結果、T リンパ球系前駆細胞は IL-7 存在下でのみ FTEC との共培養により CD4 陽性マクロファージへと分化することが明らかとなった。IL-7 は T リンパ球系前駆細胞の生存に必須であることから、CD4 陽性マクロファージが T リンパ球系前駆細胞から分化してくることが強く示唆された。以上の結果より、胸腺内 CD4 陽性マクロファージは、myeloid

系列に属する通常のマクロファージとは異なり、lymphoid 系列に属することが明らかとなった。

次に、胸腺内マクロファージの CD4 の発現について調べた。胸腺内に存在する DC は CD8 陽性と言われており、RAG2 遺伝子欠損(RAG2^{-/-})マウスでは CD8 の発現がみられないことが報告されている。そこで、RAG2^{-/-}マウスにおける CD4 陽性マクロファージの存在を調べた。その結果、RAG2^{-/-}マウスの胸腺では CD4 陽性マクロファージが消失していた。一方、RAG1^{-/-}マウスでは CD4 陽性マクロファージの存在が確認できた。そこで、それぞれの欠損マウス由来の胸腺細胞が *in vitro* 共培養系において CD4 陽性マクロファージへと分化できるのかを検討した。その結果、RAG1^{-/-}胸腺細胞からは正常に CD4 陽性マクロファージが誘導された。しかし、RAG2^{-/-}胸腺細胞はマクロファージへと分化はするものの、CD4 の発現は誘導されなかった。従って、RAG2 が胸腺内マクロファージにおける CD4 の発現に必要であることが明らかとなった。

CD4 陽性マクロファージは *in vitro* 培養系において、OSM 依存性上皮細胞株との相互作用によって誘導される。そこで、CD4 陽性マクロファージの分化に対する OSM の生体内での関与を検討した。OSM によるシグナルは IL-6 ファミリー共通の受容体である gp130 を通して細胞内に伝わる。そのため、細胞内領域欠損 gp130 ミュータントマウス(gp130^{D/D})では OSM の機能欠損が起きている。この gp130^{D/D} マウスの胸腺では、CD4 陽性マクロファージの著しい減少が認められた。しかし、gp130^{D/D} マウスでは IL-6 ファミリーサイトカイン全ての機能が欠損しているため、厳密な意味での OSM の作用解析とはならない。そこで、さらに OSM 受容体遺伝子欠損マウスを用いた解析を行ったところ、胎生 14.5 日において CD4 陽性マクロファージの著しい減少が見られた。このことより、生体内においても OSM が上皮細胞に作用し、その上皮細胞が CD4 陽性マクロファージの分化に寄与していることが示唆された。

以上の結果より、胸腺内 CD4 陽性マクロファージは上皮細胞との相互作用により lymphoid 系前駆細胞から発達することで、通常のマクロファージとは異なる性質を獲得し、その高い貪食能をもって胸腺内で大量に発生する死滅した T 細胞を素早く除去し、自己免疫疾患等の誘発を防いでいる可能性が示された。