

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

獣医学専攻

平成 12 年度博士課程入学

氏 名： 下島 昌幸

指導教官： 明石 博臣

論文題目： T cell responses in feline immunodeficiency virus-infected cats  
(ネコ免疫不全ウイルス感染ネコにおける T 細胞応答)

ネコ免疫不全ウイルス（以下 FIV）は、ネコに免疫不全様症状を引き起こす原因体である。このウイルスに対するワクチンが現在必要とされており、ネコ免疫系への関心が高まっている。しかし、感染制御における T 細胞の重要性や T 細胞を構成する  $CD4^+$ ・ $CD8^+$ リンパ球の動態に関する報告はいくつかあるものの、十分な解析がなされているとは言いがたい。本研究は、より良いワクチン作製やより効率的なワクチン開発に役立てるため、FIV 感染における T 細胞免疫応答を明らかにすることを目的とした。

実験を行なう上で有用なツールである抗体の種類がネコにおいては限られており、まずその充実化を試みた。第一・二・七章では、あらかじめ標的分子を設定し、その cDNA 同定・発現・抗体作製を行なった。第三章では、標的分子は不明であっても特徴ある性状（何かの反応の阻害や誘導等）を示す抗体が得られた場合を想定し、その標的分子を短時間かつ簡便に同定する方法を確立した。第四章では、第三章の方法が抗体以外の分子（ここでは FIV Env タンパク）にも応

用可能であることを示した。

第五・六章では、得られた抗体や既存の抗体を用い、FIV 感染ネコの末梢血 T 細胞の表面抗原および機能解析を行なった。第七・八章は細胞株における解析であるが、得られた抗体の一つ（抗 CD56）を用いて FIV 感染性について調べた。

各章の要約は以下の通りである。

第一章： T 細胞表面抗原 CD2 は、T 細胞と抗原提示細胞等との接着や T 細胞の活性化に重要な分子である。ネコ CD2 cDNA を、末梢血単核球由来 cDNA より PCR により新たに同定した。ネコ CD2 のアミノ酸配列中には、ヒトやその他の動物の CD2 分子の立体構造・細胞内シグナル伝達に重要な配列が高度に保存されていた。ネコ CD2 分子を発現させその単クローン抗体 (SKR2) を得た。SKR2 抗体はネコ CD2 発現細胞-ヒト赤血球間で認められるロゼット形成を阻害した。これらのことは、ネコと特にヒトの CD2 の構造および機能の類似性を示すものと考えられた。SKR2 抗体は、T 細胞に加え単球の検出にも有用であった。本抗体は第六章でも用いた。

第二章： インテグリン  $\alpha$ L 鎖 CD11a は、T 細胞と抗原提示細胞等との接着に重要な分子である。T 細胞受容体 (TCR) は、T 細胞の抗原特異的な応答を規定する分子である。CD122 は、IL-2 受容体を構成する  $\beta$  鎖で、IL-2 によるシグナル伝達に必須の分子である。昆虫細胞発現ネコ CD11a を用いて抗ネコ CD11a 単クローン抗体 TMM11a を得た。ネコ TCR $\alpha$  および TCR $\delta$  の定常領域に、ネコ CD2 (第一章) のシグナルペプチド領域を N 末に、ヒスタグ配列を C 末に付加して発現させた。ネコ CD122 の cDNA を PCR により新たに同定し、C 末にヒスタグ配列を付加して発現させた。これらの発現により、TCR や CD122 分子に対する抗体作製などが容易になると考えられた。TMM11a 抗体は第六章でも用いた。

第三章： 抗体が認識する細胞表面分子を同定する場合に発現クローニング法は極めて有効である。そのスクリーニングが短時間かつ簡便に行なえる方法を確立した。モデルとして、CD4<sup>+</sup> MYA-1 細胞の cDNA ライブラリーからの、抗 CD4 抗体による CD4 cDNA の同定を

試みた。ライブラリー導入法としてレトロウイルスベクター、ライブラリー導入細胞としてミエローマ、選択法としてパンニングを用いた。その結果、わずか 6 日間の培養および 3 回の培養液交換のみでスクリーニングを終え、効率よく CD4 cDNA を得ることができた。

第四章： 第三章で確立した方法を、FIV と反応する細胞表面分子の同定に応用した。ライブラリー導入細胞の保持には、抗体ではなくウイルス液を用いた。その結果、FIV との結合性を有するヘルパーT 細胞活性化抗原 OX40 (CD134) を同定した。OX40 は単に FIV との結合性を有する分子であるだけでなくリンパ球指向性 FIV の感染に必要な分子 (受容体) であり、FIV 抗原特異的な CD4<sup>+</sup>細胞に FIV が感染することが FIV の病態の根底にあると考えられた。

第五章： FIV 感染により、感染ネコの末梢血リンパ球 (PBL) には CD8β 鎖の減少した CD8<sup>+</sup>細胞が増加し、一方 CD4<sup>+</sup>細胞は減少する。抗 CD8α・抗 CD8β・抗 CD4 抗体を用い、FIV TM2 株感染ネコの PBL の機能解析を行なった。CD8α<sup>+</sup>β<sup>+</sup>細胞のみでなく、CD8α<sup>+</sup>β<sup>-</sup>細胞および CD4<sup>+</sup>細胞も FIV 増殖抑制作用を持つことが明らかとなった。いずれの細胞集団による抑制作用も、少なくとも一部は MHC 非拘束性・抗原非特異的である可能性が示された。抗 FIV 活性を主に担う細胞は個体により異なり、病態進行の指標となりうる CD4:CD8 比との関連も認められなかった。

第六章： 白血球共通抗原 CD45 は、T 細胞の分化段階 (ナイーブやメモリー等) により発現型が変化する分子である。主要組織適合抗原複合体 (MHC) は、抗原提示を行なう分子である。FIV 感染ネコの PBL における CD2・CD11a・CD45RA 様および MHC II 分子の発現について、CD4 もしくは CD8 (α および β 鎖) 分子発現との関連性、または細胞サイズもしくは細胞内顆粒との関連性をフローサイトメトリーにより解析した。CD8α<sup>+</sup> PBL 中には、CD8β 鎖の発現減少を伴う CD11a 分子発現増加・細胞内顆粒増加・MHC II 分子減少を示す亜群が存在した。CD8α<sup>+</sup> PBL の CD45RA 様分子の発現量は様々であった。この

ような表現系の多様性は CD4<sup>+</sup> PBL では認められず、FIV 感染は主に CD8<sup>+</sup>細胞群に様々な変化を誘導するものと考えられた。

第七章： CD56 は神経細胞接着分子 (N-CAM) の一つの型 (140 kDa 型) で、NK 細胞や一部の T 細胞に発現する分子である。昆虫細胞発現ネコ CD56 を用いて抗ネコ CD56 単クローン抗体を得た。本抗体はフローサイトメトリーのみでなくイムノブロット解析にも用いることができた。ネコ CD56 分子は培養ネコ T 細胞 (CD4<sup>+</sup>および CD8<sup>+</sup>) および MYA-1 細胞株に発現しており、N-CAM の 140 kDa 型ではあるが高度にシアル化されていると考えられた。これらのことは、ネコ CD56 がヒト CD56 と似た性状や分布を持つことを示すと考えられた。抗ネコ CD56 単クローン抗体は第八章でも用いた。

第八章： MYA-1 細胞は FIV に高感受性・IL-2 依存性のネコリンパ芽球細胞株である。MYA-1 細胞の CD56 発現・長期培養の FIV 感染性への影響を解析した。長期培養により MYA-1 細胞の CD56 陽性率は増加し、CD56<sup>+</sup> MYA-1 細胞は CD56<sup>-</sup> MYA-1 細胞に比べより多くの FIV (抗原) を産生 (発現) し、また CD4 分子は FIV 感染によってより減少した。長期培養の MYA-1 細胞では、FIV による細胞変性効果の出現は起こりやすくなったが、FIV 産生量は減少した。FIV 感染の解析における、本細胞株の培養期間の重要性が示唆された。

本研究により、FIV 感染制御における CD8<sup>+</sup> T 細胞 (時に CD4<sup>+</sup> T 細胞) の重要性や、CD8<sup>+</sup> T 細胞内に見られる多くの亜群の存在が示された。免疫応答機構の解明には、さらに多くのネコ分子の同定やリガンド同定・サイトカイン定量・抗原性解析等を行なう必要性が示唆された。ワクチン開発に直接役立つような結果は得られなかったが、著者の研究により明らかになった上述の多くの事実は、今後の FIV/ネコ研究の確固たる礎となるはずである。またアレルギーや自己免疫疾患等の分野にも貢献するものであると期待する。