

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 荒木 靖人

本研究は抗原刺激により増殖していると考えられる T 細胞クローンを単一細胞遊離法と RT-PCR/SSCP 法により同定する事を目的としており、クローニングした T 細胞抗原受容体をレトロウイルスによりマウスの脾臓細胞に発現させ抗原特異的に機能するかを解析し、下記の結果を得ている。

1. HIV エピトープペプチド P18III B でパルスした樹状細胞で免疫した BALB/c マウスの脾臓細胞を HIV 抗原にて刺激培養した。この細胞は HIV 抗原を発現している細胞に対して高い細胞傷害活性を示した。P18III B でパルスした樹状細胞をマウスに免疫することにより、HIV 抗原特異的細胞傷害性 T 細胞が誘導されることが示された。

2. HIV 抗原で刺激培養した細胞において、RT-PCR / SSCP の解析により明らかな T 細胞のクローンの集積が認められた。刺激培養細胞の中でクローンが増殖している事が判明した。さらに刺激培養細胞の T 細胞抗原受容体のレパトアを調べた。刺激培養細胞では全体的に V β の陽性の割合が高くなるが、HIV 抗原刺激を続けて得られた細胞株では、V β 7 と V β 8.1 + 8.2 の割合が高かった。刺激培養細胞中で SSCP によりクローンの集積が明瞭に認められたは V β 7 であり、この中に HIV 抗原特異的 T 細胞が存在すると考えられた。

3. 刺激培養細胞の CD8 陽性分画より V β 7⁺ / V α 2⁺細胞を単一細胞遊

離法により単離した。単一細胞の RNA より cDNA を合成し、T 細胞抗原受容体の α 鎖、 β 鎖の遺伝子をそれぞれ増幅した。SSCP にて単離する前の刺激培養細胞中で増殖していたクローンを選出し、塩基配列を同定した。

4. クローニングした T 細胞抗原受容体の遺伝子をレトロウイルスベクター pMX を用いて TG40 細胞に感染させた所、約 35%の発現をみた。IL-2、IL-12、concanavalin A にて刺激した BALB/c マウスの脾臓 CD8 陽性 T 細胞に同様に感染させた所、約 20%の $V\beta 7^+ / V\alpha 2^+$ の発現を認めた。クローニングした T 細胞抗原受容体を発現させたマウスの脾臓 CD8 陽性 T 細胞は、HIV 抗原を発現している細胞に対して高い細胞傷害活性を認めた。再構築した CD8 陽性 T 細胞が、抗原特異的に細胞傷害性 T 細胞として機能する事が示された。

以上、本論文は新たな手法による抗原特異的な T 細胞抗原受容体のクローニングであり、これまで知られている手法の中でも最も簡便に抗原特異的 T 細胞を同定できるものである。本研究は、抗原特異的な T 細胞を移入する治療につながるものであり、抗原特異的に免疫を制御する事に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。