



Role for Bcl-6 in the generation and maintenance of memory CD8⁺T cells

市井, 啓仁

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2002-09-30

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2645

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002645>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 63 】

氏名・(本籍) 市井 啓仁 (石川県)
博士の専攻分野の名称 博士(医学)
学位記番号 博い第1458号
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付 平成14年9月30日

【 学位論文題目 】

Role for Bcl-6 in the generation and maintenance of
memory CD8⁺ T cells
(メモリーCD8⁺ T 細胞の生成維持における Bcl6 の役割)

審査委員

主査教授 黒田 嘉和
教授 熊谷 俊一
教授 大北 裕

学位論文の内容要旨

Homeostatic Proliferationはリンパ球の減少した環境(抗癌剤投与後、放射線照射後、臓器移植時の免疫抑制剤投与後、HIV感染発病後など)において、胸線からの供給だけでなく末梢の成熟T細胞が自ら増殖しその恒常性を維持する機構である。一般的に末梢のT細胞は胸腺から供給され、その数は生涯ほぼ一定に保たれている。老齢化し、胸腺が萎縮しどんどT細胞の供給が起こるわけなくなつてからでも一定に保たれている。これらのことより抹消のT細胞が増殖し、その恒常性を維持しているであろうと考えられていた。このHomeostatic Proliferationと名付けられた増殖においてCD8T細胞はCD44 high CD122high, Ly6C highで定義される表面マーカーを発現する。これは抗原特異的なmemoryCD8T細胞の表面マーカーと同一のもので、実際機能的にもほぼ同一である。しかし、その生理的な重要性はわかつていない。

memory T細胞とは、一般的に抗原特異的な年齢と共に暴露される抗原量に比例して増えると考えられていた。しかし、このmemory T細胞は生後すぐのマウスにおいても確認でき、驚くべきことに生後4週齢頃まで増加する。その後、8週齢頃まで減少しその後ゆっくりと増加する。マウスにおいて生後4週齢頃までは急激に体が成長する時期であり、T細胞数が胸線からの供給だけでは間に合わず、抹消のT細胞が増殖していると考えられた。そこで、生後4週齢までの脾臓においても、Homeostatic Proliferationが生理的に起きているのかを証明しようとした。

一般的に、実験系としてHomeostatic ProliferationはnaiveCD8T細胞(CD44low, Ly6Clow)を、放射線照射後、又はRAG欠損マウスのようにリンパ球のないマウスに移植した際に見られる。放射線照射を行わないマウスに移植してもこの現象はほとんど確認できない。

しかし、naiveCD8T細胞(CD44low, Ly6Clow)をCFSE(carboxyfluorescein diacetate-succinimidyl ester)でラベルし、生後すぐのマウス腹腔内に移植し、その後、1~3週目にこれらの細胞を解析するとゆっくりとした速度で増殖するのが確認できる。これらのことより、発達期におけるmemoryマーカーを持つCD8T細胞の増加はHomeostatic Proliferationによりおこることが確認できた。

更に、この時、表面マーカーCD44, Ly6C、により、この増殖過程にあるCD8T細胞が4つのstageに分けられることがわかった。それぞれのstageをstage A (CD44low, Ly6Clow), stage B (CD44high, Ly6Clow), stage C (CD44high, Ly6C high), stage D (CD44low, Ly6C high)とし、各stageの機能について評価した。主に増殖を行っているのはstage Bとstage Cであり、 α CD3の刺激後8時間でIFN- γ 産生を認めるのはstage Cのみであった。また、stage Cにおいてはもう一つのmemoryCD8T細胞のマーカーであるCD122(IL-15R α)をほとんどの細胞が発現しており、apoptosis 関連蛋白であるBcl-2の発現の増加も認めた。これらのことより従来のmemoryCD8T細胞とはstage Cの細胞であり、このsubsetとは別に主に増殖を行うsubsetが存在することがわかった。又、これらのsubsetは発達期においても増加しており、生理的に重要なsubsetと考えられた。

そのため、このsubsetの重要性を解析するため、様々な遺伝子改変マウスを調べた。その結果Bcl6欠損マウス(KO)においてHomeostatic Proliferationがうまく機能しておらず、又逆にT細胞にBcl6を強発現させたトランスジェニック(Tg)においては、この現象が長く強く観察することができた。

野生型マウス(Wt)ではmemoryCD8T細胞が約50~60%と最も増加する4週齢に

おいても、KOにおいては約25~30%と著名な増加を認めなかつた。また、この比率は週齢を重ねても増加することはなかつた。逆にTgにおいては4週齢において70~80%と著名な増加を認めた。特にKOにおいてはstage Bにおける細胞数が減少していた。

それぞれのマウスのnaiveCD8T細胞(CD44low, Ly6Clow)を放射線照射後のマウスに移植した。Tgにおいては、移植後3週間たつてもstage B, stage Cに多数の細胞が存在し、増殖を続けているが、KOのnaiveCD8T細胞を移植した群では、移植後1週間ではHomeostatic Proliferationがほぼ同様に生じるが、移植後2週間ですでに大半がCD44 lowとなり増殖を止めてしまう。このことは、Bcl6がCD8T細胞がstage B, Cに留まりその増殖に重要であることを示している。

これらの結果より、Bcl6が抗原特異的なmemoryCD8T細胞の分化においても重要な役割を果たしているのではないかと考え解析した。

Wt, Tg, KOマウスをOVAをパルスした、野生型マウス骨髄由来の樹状細胞又はOVAを発現しているワクチニアウイルスにて免疫し、OVA特異的memoryCD8T細胞数を解析した。

免疫後、すべての時間、すべての方法においてTgマウスのOVA特異的memoryCD8T細胞は最も増加しKOマウスでは最も少なかつた。

更にそのメカニズムを解析するため、CD8T細胞の90%以上がOVA特異的なTCRを持つOT-1マウスと交配しダブルトランスジェニックマウスを作成し、免疫した。

OT-1マウスに比べ、OT-1x lck-Bcl6マウスではCD44highのsubsetが長期間存続し、Homeostatic Proliferationと同様、増殖するためのstageを維持することにより抗原特異的memoryCD8T細胞を増加させることができた。

これらの結果より、Bcl6は胚中心B細胞を介しての記憶B細胞への分化だけでなくmemoryCD8Tへの分化をも制御していることが明らかになった。このようにひとつの転写抑制因子により異なる細胞において免疫学的記憶というひとつの現象を制御しているというのは非常に興味深いことである。これらの転写抑制されている共通の因子を明らかにすることにより、免疫学的記憶のさらなる解明、ひいては新たなるワクチンの開発にもつながるであろう。

| 論文審査の結果の要旨 | | | |
|------------|---|----|-------|
| 受付番号 | 甲第 1459 号 | 氏名 | 市井 啓仁 |
| 論文題目 | Role for Bcl-6 in the generation and maintenance of memory CD8 ⁺ T cells メモリー CD8 ⁺ T 細胞の生成維持における Bcl6 の役割 | | |
| 審査委員 | 主査 黒田嘉和 副査 熊谷俊一 副査 大井和也 | | |
| 審査終了日 | 平成 14 年 7 月 25 日 | | |

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

Homeostatic Proliferation はリンパ球の減少した環境(抗癌剤投与後、放射線照射後、臓器移植時の免疫抑制剤投与後、HIV 感染発病後など)において、胸腺からの供給だけでなく末梢の成熟 T 細胞が増殖しその恒常性を維持し、外来抗原の侵入にサイトカイン産成や細胞傷害活性の高い memory T 細胞を増加させるものである。

一般的に抹消の T 細胞は胸腺から供給され、その数は生涯ほぼ一定に保たれている。老齢化し、胸腺が萎縮しどんど T 細胞の供給がおこなわれなくなつてからでも一定に保たれている。これらのことより末梢の T 細胞が増殖し、その恒常性を維持しているであろうと考えられていた。この Homeostatic Proliferation と名付けられた増殖において CD8T 細胞は CD44^{high} CD122^{high}, Ly6C^{high} で定義される表面マーカーを発現する。これは抗原特異的な memoryCD8T 細胞の表面マーカーと同一のもので、実際機能的にもほぼ同一である。

一般的に抗原特異的な memory T 細胞は年齢と共に暴露される抗原量に比例して増えると考えられていた。しかし、この memory T 細胞は生後すぐのマウスにおいても確認でき、驚くべきことに生後 4 週齢頃まで増加する。マウスにおいて生後 4 週齢頃までは急激に体が成長する時期であり、T 細胞数が胸腺からの供給だけでは間に合わず、末梢の T 細胞が増殖していると考えられた。

実験系として Homeostatic Proliferation は naiveCD8T 細胞を、放射線照射後、又は RAG 欠損マウスのようにリンパ球のないマウスに移植した際に見られる。放射線照射を行わないマウスに移植してもこの現象はほとんど確認できない。

しかし、naiveCD8T 細胞を生後すぐのマウス腹腔内に移植し、それらの細胞を解析するとゆっくりとした速度で増殖するのが確認できる。これらのことより、発達期における memory マーカーを持つ CD8T 細胞の増加は Homeostatic Proliferation によりおこることが確認できた。

更に、この時、表面マーカー CD44, Ly6C、により、この増殖過程にある CD8T 細胞が 4 つの stage に分けられることがわかった。かく stage の機能について評価した。主に増殖を行っているのは stage B と stage C であり、 α CD3 の刺激後 8 時間で IFN- γ 産生を認めるのは stage C のみであった。また、stage C においては CD122(IL-15R α) をほとんどの細胞が発現してお

り、Bcl-2 の発現の増加も認めた。これらのことより従来の memoryCD8T 細胞とは stage C の細胞であり、この subset とは別に主に増殖を行う subset が存在することがわかった。

Bcl6 欠損マウス(KO)において Homeostatic Proliferation がうまく機能しておらず、又逆に T 細胞に Bcl6 を強発現させた遺伝子導入マウス(Ick-Bcl6)においては、この現象が長く観察することができた。

それぞれのマウスの naiveCD8T 細胞を放射線照射後のマウスに移植した。

Tg マウスにおいては、移植後 3 週間たっても stage B, stage C に多数の細胞が存在し、増殖を続けているが、KO マウスの群では、移植後 1 週間では Homeostatic Proliferation がほぼ同様に生じるが、移植後 2 週間ですでに大半が CD44^{low} となり増殖を止めてしまう。このことは、Bcl6 が CD8T 細胞が stage B, C に留まりその増殖に重要なことを示している。

これらの結果より、Bcl6 が抗原特異的な memoryCD8T 細胞の分化においても重要な役割を果たしていると考え解析した。それぞれのマウスを OVA を抗原として免疫し、OVA 特異的 memoryCD8T 細胞数を解析した。

免疫後、Tg マウスの OVA 特異的 memoryCD8T 細胞は最も増加し KO マウスでは最も少なかった。

これらの結果より、Bcl6 は記憶 B 細胞への分化だけでなく memoryCD8T への分化をも制御していることが明らかになった。このようにひとつの転写抑制因子により異なる細胞において免疫学的記憶という現象を制御しているというのは非常に興味深いことである。これらの転写抑制されている因子を明らかにすることにより、免疫学的記憶のさらなる解明、ひいては新たなるワクチンの開発にもつながるであろう。

本研究は、CD8T 細胞について、そのメモリーCD8T 細胞への分化を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったメモリーCD8T 細胞の分化における Bcl6 の関与において homeostatic proliferation にともなったメモリーT 細胞分化と抗原特異的な分化について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。