



Role of a soluble cytotoxic factor in concanavalin A-induced cellular cytotoxicity to rabbit erythrocytes

能勢, 真人

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

1979-02-28

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙0615

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2000615>

※ 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。



氏名・(本籍) の能勢眞人 (京都府)

学位の種類 医学博士

学位記番号 医博ろ第 532 号

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学位授与の日付 昭和 54 年 2 月 28 日

学位論文題目 ROLE OF A SOLUBLE CYTOTOXIC FACTOR IN CONCANAVALIN A INDUCED CELLULAR CYTOTOXICITY TO RABBIT ERYTHROCYTES
ウサギ赤血球に対する concanavalin A-induced cellular cytotoxicity における soluble cytotoxic factor の役割

審査委員 主査 教授 京極方久
教授 杉山武敏 教授 木幡陽

論文内容の要旨

I 緒言

T リンパ球は、自己免疫、腫瘍免疫あるいは同種移植免疫における標的細胞傷害作用に重要な役割を演じている。しかしこの T リンパ球による細胞傷害機構はなお不明な点が多く、近年 mitogen 依存性の T リンパ球介在性細胞傷害反応がその解析の極めて有用な手段として Perlmann らをはじめとする多くの研究者により用いられて来た。中でも concanavalin A (以下 Con A) 依存性の細胞傷害反応は、Con A を介した活性化リンパ球と標的細胞との結合が標的細胞破壊をうながすのに本質的なものであるとされ、この系に soluble cytotoxic factor (以下 SCF) が関与するという事実は現在まで報告されていない。一方、他の実験系において、phytohemagglutinin や可溶性抗原で T リンパ球を長時間刺激し、その培養上清を精製・濃縮することによって、その中に lymphotoxin と呼ばれる SCF が存在することが、Granger らや Waksman らにより既に明らかにされている。しかしこの様な SCF が実際 T リンパ球による俊敏かつ強力な細胞傷害反応の中でいかなる役割を果しているか、また SCF がいかなる機構により標的細胞を破壊せしむるかについては現在なお明らかでない。

本稿において著者らは、ウサギ赤血球を標的細胞に用いることにより、極めて感度の高い Con A 依存性のリンパ球介在性細胞傷害反応系 (concanavalin A - induced cellular cytotoxicity, 以下 Con A C C) を確立した。そしてこの系においてリンパ球より放出される SCF がこの標的細胞破壊機構の主役を担っていることを明らかにし、リンパ球と標的細胞との Con A を介した結合はこの SCF の作用をより有効にしているにすぎないことを示酸した。さらに、この SCF が標的細胞膜レセプターとの結合を介して標的細胞破壊をうながすことを明らかにし、この結合機構に複合糖質が関与

している可能性を示唆した。

II 材料及び方法

Effector : SD系ラット脾細胞より Unanue の方法に従ってリンパ球を分離した。これを primary Lymphocytes とし、一部を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の Con A 存在下あるいは非存在下で24時間培養後、cytotoxic effector lymphocytes (以下CEL) およびそのコントロールとし、それぞれの培養上清の超遠沈上清を SCF およびそのコントロールとした。

細胞傷害反応: 新鮮ウサギ赤血球を sodium ^{51}Cr でラベル後標的細胞とし、これに Effector としての① primary lymphocytes + Con A ② CEL ③ methyl - α - mannoside で処理後の CEL (treated CEL) ④ SCF を、それぞれ24時間作用させた後、各々の cytotoxicity を標的細胞より特異的に放出された ^{51}Cr の release percent で表わした。一方、 treated CEL による 細胞傷害作用を形態的にとらえるため、 Keder らの方法に準じて poly - L - lysine を被ったプラスチックシャーレにウサギ赤血球 monolayer を作り、その上に treated CEL を作用させ位相差顕微鏡で観察した。

III 結 果

ウサギ赤血球に対する Con ACC: primary lymphocytes と標的細胞を種々の濃度の Con A 存在下で反応させると、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で最大の cytotoxicity を認めた。この系に methyl - α - mannoside を加え Con A の細胞表層の糖質への結合を阻止すると、 cytotoxicity は完全に阻害された。

しかし、ひとたび Con A で活性化した CEL との反応系に methyl - α - mannoside を加えても、また CEL の膜表面になお結合している Con A を取り除くためあらかじめ methyl - α - mannoside で処理した treated CEL を Effector に用いても、著明な cytotoxicity の低下は認められず、 Effector と標的細胞との Con A を介した結合そのものがこの細胞傷害機序の本質ではないと考えられた。一方 Con A 存在下でのリンパ球の培養上清に標的細胞に対し顕著な cytotoxicity を認め、この SCF が Con ACC における標的細胞破壊に本質的な役割を果していると推察された。

CEL の単一細胞レベルでの細胞傷害反応 : SCF の Con A CC における役割をさらに検討するために、 treated CEL をウサギ赤血球 monolayer 上で反応させた。培養開始後数分間で treated CEL は赤血球の隙間をぬってシャーレ底面の poly - L - lysine に固着され、 24 時間後にはそれらの約 5% にブラークの形式を認めたが、 いづれの CEL にも赤血球との結合像は見られなかった。以上の所見から CEL より放出される SCF そのものが周囲の赤血球の傷害を引き起こし、 SCF は C - Con A CC において本質的な役割を果たしていると考えられた。

SCF の性状 : SCF は slow acting で、標的細胞の特異的な ^{51}Cr の放出が起こるまでに作用開始後 6 時間以上を要した。 SCF の細胞傷害活性はウサギ赤血球によりその細胞数に依存して吸収され、また前もって SCF を 2 時間吸着させた標的細胞は 24 時間後に有意な傷害を生じた。これらの所見は、 SCF がウサギ赤血球膜上のある種のレセプターとの結合を通じて標的細胞に傷害を及ぼす可能性を示唆している。

SCF の細胞傷害反応に対する单糖の阻害効果 : SCF と標的細胞との反応系に種々の单糖を加え

ると、N-acetylglucosamine、ついでmannose、galactoseに、それぞれの濃度に比例してSCFのcytotoxicityの阻害が認められた。さらにこれらの単糖はSCFの標的細胞への吸着をも阻害した。

IV 考 察

従来Con A CCにおけるCon Aの役割は、リンパ球の活性化およびリンパ球と標的細胞とのCon Aを“bridge”とする結合であると考えられ、この反応系にはいかなる標的細胞を用いてもリンパ球のSCF放出の事実を見出すことは出来なかった。著者らのウサギ赤血球を標的細胞に用いた実験結果から、Con Aで活性化したリンパ球より放出されるSCFがCon A CCの本質であり、リンパ球と標的細胞とのCon A “bridge”による相互の近接がSCFの作用をより有効にしていると考えられる。

ウサギ赤血球は、従来のリンパ球介在性の細胞傷害反応の標的細胞として用いられてきた種々の有核細胞に比して、細胞膜レベルでSCFの作用機序を論じ得る点で極めて有用である。SCFの標的細胞への吸着実験あるいはウサギ赤血球による吸収実験から得た所見から、SCFは赤血球膜上のある種のレセプターと反応することが考えられ、さらに単糖によるこれらの阻害実験から、このレセプター構造にN-acetylglucosamineやmannoseを末端残基とする複合糖質が関与している可能性が示唆された。このことは、近年Remoldのマクロファージ遊走阻止因子の結合基がマクロファージ膜上の α -L-fucose残基であるという報告や、Ashwell一派のasialo-glycoproteinが肝細胞膜上のgal-actosyl receptorに認識されるという報告などと類似している。SCFの作用機構に複合糖質が関与するという所見は、従来現象学的にしか論じ得なかったリンパ球介在性細胞傷害機構の分子レベルでの解析を進める上で今後極めて重要であると考える。

V 結 語

concanavalin A-induced cellular cytotoxicityにおいて、ウサギ赤血球を標的細胞とする簡便かつ感度の高い方法を確立した。同時にこの系にsoluble cytotoxic factor(SCF)を検出し、これがこの細胞傷害反応に本質的な役割を果していることを明らかにした。SCFの細胞傷害活性はウサギ赤血球に吸収され、また吸着し、SCFが赤血球膜表面のレセプターを介して作用していることが示唆された。またある種の単糖は、SCFによる細胞傷害反応およびSCFのウサギ赤血球への吸着を阻害した。SCFの細胞傷害機構におけるこれらの所見の意義について考察した。

論文審査の結果の要旨

免疫学的機序によって細胞が破壊されるいわゆるimmunocytolysis機構は大きく2つに分けられる。即ちアレルギー反応の分類(Coombs)のII型とIV型に属するもので前者には補体依存性cyt-olysis, opsonization, immunoadherence ADCCらが属し、後者は所謂effector(killer)Tによる反応である。これらのimmunocytolysis反応は人間の自己免疫、腫瘍免疫あるいは同種移

植免疫において重要な役割りを演じているのみならず、正常個体でも種々の原因により発生した異常細胞を破壊して個体の恒常性を保つ上にも働いているものである。

これらの immunocytolysis の中でも主役の一つと信じられている effector T 細胞による 細胞傷害機構は不明の点がなお多く、近年諸種の mitogen 依存性の T リンパ球介在性細胞傷害反応がその解析に用いられるようになった。この中 Con A 依存性のものにおいては Con A を介した活性化リンパ球と標的細胞との結合が標的細胞の破壊をうながすのに必須のものとされ、この系には soluble cytotoxic factor (SCF) = lymphotoxin が関与するとの報告は未までなかった。さらに他の PHA や特異抗原で活性化された他のリンパ球からは SCF が放出されるとの報告があるが、その物質の標的細胞破壊機序については現在なお明らかにされていなかった。

申請者はこの点に注目し、新にウサギ赤血球を標的細胞に選ぶことによって、極めて感度の高い Con A 依存性のリンパ球介在性細胞傷害反応系を確立し、その系においては活性化されたリンパ球から放出される SCF が存在し、それがこの系の標的細胞破壊機構の主役を演じていることを明らかにした。そしてリンパ球と標的細胞が Con A を介して結合することがこの cytolysis に不可欠のものではなく、単に effector と標的細胞の間の距離を短くすることによって SCF の効果を大にしているに過ぎないことをも明らかにした。更にこの SCF は slowacting であり、その活性はウサギ赤血球に吸収され、また吸着されることから赤血球膜上にある種のレセプターと反応することが考えられ、さらにいくつかの单糖による阻害実験から、このレセプターには N-acetylglucosamine や mannose を末端残基とする複合糖質が関与している可能性が示唆された。

これらの成果は、これまで充分解明されていなかった Con A により誘導された effector T による標的細胞破壊機序において、soluble cytotoxic factor が主役を演じ、細胞同志の結合は不可欠ではなく、さらにその SCF は標的細胞表面の GluNac やマンノーズ 残基を持つ糖蛋白を構成成分とするレセプターに働くという事実を明らかにして、これまで現象学的にしか論じ得なかつたリンパ球介在性細胞傷害機構の分子レベルでの解析を進める上で重要な手がかりを与えたもので、免疫学とくに免疫病理学の発展に寄与するところは計り切れない程の重大な発見であり業績である。よって本申請者は医学博士の学位を得る資格があると認める。