The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Requirement of CD4+ T-cells and antigen presenting cells for primary in vitro generation of CD8+ cytotoxic T-cells against Ld-binding self peptide p2Ca
Author(s)	和田, 尚
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39527
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【 46 】

氏　　名	和田　尚（わだ　ひさし）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　12106　号
学位授与年月日	平成7年10月4日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Requirement of CD4$^+$ T-cells and antigen presenting cells for primary in vitro generation of CD8$^+$ cytotoxic T-cells against L^d-binding self peptide p2Ca (L^{d}結合内因性ペプチドp2Caに対するCTLの誘導におけるCD4$^+$T細胞および抗原提示細胞の必要性)
論文審査委員	(主査) 教授　門田　守人 (副査) 教授　濵岡　利之　　教授　白倉　良太

論文内容の要旨

【目　的】

2Cは，BALB.Bマウス由来の抗BALB／c CTLで，同種L^{d}特異的CTLクローンである。BALB／cマウス脾臓および胸腺細胞よりの酸抽出物のHPLC分画から，この2Cに反応する分画を調べ，2C標的抗原ペプチドとしてアミノ酸配列を同定したのがp2Caペプチドである。本研究においては，p2Caペプチドを用いてin vitroでCTLの誘導が可能であり，しかもその誘導にはクラス1結合ペプチドでありながらCD4陽性T細胞および抗原提示細胞（APC）が必要であることを示した。

【方法と結果】

BALB／cマウス脾細胞7.5x10^6／2ml 中にp2Caペプチドを各種濃度加え，5日間培養した後，効果細胞として用いた。標的細胞には，P815 細胞に各種ペプチドを加え，16時間培養したものを用いた。細胞傷害活性の測定には，4時間^{51}Cr 遊離試験を用いた。

1) 効果細胞の誘導のためおよび標的細胞としてP815 細胞に付加するためのp2Caペプチドの至適濃度を調べた。誘導には10^{-5}～10^{-6}M，付加には10^{-2}～10^{-4}Mが至適濃度であった。これらより，p2Caによる効果細胞の誘導には10^{-5}M，標的細胞の作成には10^{-4}Mの濃度を以後使用した。

2) 各種抗体による細胞傷害性抑制試験を行った。抗CD4抗体では抑制されなかったが，抗CD8抗体で抑制された。また，抗MHC抗体では，抗L^{d}抗体でのみ抑制され，抗D^d，K^d，I-A^d，I-E^{d}抗体では抑制されなかった。

3) p2Caにより誘導されたCTLの特異性を見た。標的細胞として，P815 細胞に各種L^{d}結合性ペプチドを付加したが，p2Caのみに CTL活性を示し，MCMVや tum- ペプチドには示さなかった。また，P815 細胞のみや他の腫瘍細胞，BALB／c脾細胞Con A blastにもCTL活性を示さなかった。

4) p2Ca特異的CTLの誘導に対するCD4陽性T細胞の役割について検討した。抗CD4抗体のin vivo 投与あるいは補体との in vitro 処理によりCD4陽性T細胞を除去したマウスの脾細胞を反応細胞としたとき，p2Caに対するCTLの誘導能は減弱した。しかしこの反応細胞を使用し，B6マウス脾細胞を刺激細胞とした allo に対するCTLは

十分に誘導された。

5) p2Caに対するCTLの誘導におけるAPCの関与につき検討した。ナイロンウールカラム（NW）を通しAPCを除去した脾細胞培養中にp2Caを加えCTLの誘導を見たが，細胞傷害活性は減弱した。このAPC除去脾細胞に腹腔浸出細胞（PEC）を加えると，CTL誘導能は回復した。しかしこのPECをあらかじめ 0.1％パラフォルムアルデヒド（PFA）で処理しておくと，誘導能は回復しなかった。

6) p2Caに対するCTLの誘導におけるクラスII分子の関与につき検討した。培養液中に抗I-A^d抗体および抗I-E^d抗体をともに加え5日間培養したとき，CTLの誘導能は抑制された。しかしそれぞれ単独では抑制されなかった。

【考　察】

正常BALB／cマウスの脾細胞にp2Caペプチドを加え培養するとp2Ca特異的なCTLが誘導された。クラスI結合ペプチドp2Caを高濃度（10^{-5}～10^{-6}M）加えることにより空のMHCクラスI分子に，あるいはすでに存在するペプチドと置換することによりMHCクラスI分子に結合し，CTL前駆細胞を刺激すると考えられた。またp2CaはクラスI結合ペプチドでありながらCTLの誘導にはCD4陽性T細胞が必要であった。このことは，p2Caと高頻度に結合したMHCクラスI分子によりCD4陽性T細胞が刺激されるか，あるいはp2Caペプチドが直接もしくは細胞内経路を経て結合したMHCクラスII分子によりCD4陽性T細胞が刺激されることにより，CTLの誘導を補助したということが考えられた。特にMHCクラスII分子を介した経路の存在は，CTLの誘導にはAPCが必要であったこと，そのAPCをPFAで固定するとCTL誘導能が減弱したこと，培養液中にクラスII分子であるI-A^dおよびI-E^dに対する抗体をともに加えた時にCTLの誘導能が減弱したことなどからも強く示唆された。

p2CaはBALB／c由来の内因性ペプチドであるが，BALB／cマウスの脾細胞にp2Caペプチドを加えるのみでp2CaにCTLが誘導されたことは，生体内においてp2Caに対するCTL前駆細胞は存在するものの，生理的なp2CaレベルではCTLには分化しえないことが考えられた。

論文審査の結果の要旨

本研究は，BALB／cマウス由来L^d結合性自己抗原ペプチドであるp2CaをBALB／cマウス脾細胞と in vitro 混合培養することで，ペプチド特異的CTLの誘導を試みるとともに，この誘導にCD4陽性T細胞が関与するかを検討した。p2Caペプチドを10^{-5}M使用すると容易にp2Ca付加P815標的細胞に対してL^d特異的でペプチド特異的CTLが誘導された。このCTLの誘導にはCD4陽性T細胞および抗原提示細胞が必要であった。また，このペプチドはクラスI結合性でありながら，CTLの誘導にはクラスII分子が必要であった。BALB／cマウス由来ペプチドであるp2Ca をBALB／cマウス脾細胞と混合培養するのみでCTLが誘導されたことは，生理的なp2Ca量ではCTL前駆細胞からCTLへの分化が行えないことが考えられた。

本研究におけるペプチドによるCTL誘導の作用機構の解明は，ペプチドのワクチンへの応用が現実化しようとしている今，非常に重要な問題であり，悪性腫瘍や自己免疫疾患の治療に大いに貢献すると考えられ，学位に値するものと考えられる。