

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	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/39527
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏 名	わ だ ひさし 和 田 尚
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 1 0 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 7 年 1 0 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 濱 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 $7.5 \times 10^6 / 2\text{ml}$ 中にp2Caペプチドを各種濃度に加え、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⁵¹Cr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 $10^{-5} \sim 10^{-6}\text{M}$ 、付加には $10^{-2} \sim 10^{-4}\text{M}$ 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、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^b抗体および抗I-E^b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^bおよびI-E^b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に対する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レベルでは成熟した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^{-6} 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。