

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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏 名	和田 尚 <small>ひさし</small>
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。