The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Thymic stromal cells eliminate T cells stimulated with antigen plus stromal Ia molecules through their cross-talk involving the production of interferon-γ and nitric oxide
Author(s)	邰, 旭光
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39885
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

【15】

氏　　名	部（たい）　旭（きょく）　光（こう）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　12364　号
学位授与年月日	平成8年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学　位　論　文　名	Thymic stromal cells eliminate T cells stimulated with antigen plus stromal Ia molecules through their cross−talk involving the production of interferon−γ and nitric oxide （胸腺ストローマ細胞による抗原レセプター刺激T細胞除去の分子機構：interferon−γ（IFN−γ）と一酸化窒素（NO）の関与）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　濱岡　利之 （副査） 教　授　平野　俊夫　　教　授　宮坂　昌之

論文内容の要旨

［目的］

胸腺は，T細胞の増殖／分化に必要な微小環境を提供する器官である。胸腺におけるT細胞レパートリーの形成は，胸腺細胞上のT細胞抗原受容体（TCR）と胸腺ストローマ細胞上の主要組織適合遺伝子複合体（MHC）との相互作用によって引き起こされると考えられている。TCR刺激によって成熟T細胞は活性化するのに対し，未熟T細胞は同じTCRからのシグナルによって細胞死に導かれるのはパラドックスの一つである。ほとんどの研究は未熟T細胞と成熟T細胞ではTCRからのシグナルが異なると考えているようである。それは可能性の高い一つのメカニズムと考えられるが，それとともに胸腺微小環境の特殊性即ち胸腺ストローマ細胞とT細胞の相互作用により誘導されるシグナルの影響に基づく可能性も考えられる。当研究室では未熟胸腺細胞の分化誘導能を有する胸腺ストローマ細胞クローンが樹立され，このストローマ細胞クローン単層培養上において“抗原＋ストローマ細胞のIa分子”によるTCR刺激を受けたT細胞が死に至る，というclonal deletionモデルが報告されていた。しかしT細胞死が誘導されるメカニズムは不明で，本研究はこの現象の分子機構を明らかにすることを目的とした。

［方法］

胸腺ストローマ細胞株MRL104.8aと，KLH特異的I−E^k拘束性Thクローン（9−16）を用いた。培養上清中のIFN−γ，TNF−αの活性はBioassayで，mRNAの発現はRNase protection assayで測定した。iNOS（inducible type of NO synthase）mRNAの発現は，種々の刺激を受けた胸腺ストローマ細胞から調製したtotal RNAよりRNase protection assayで検出した。培養上清中に産生されたNOはGriess試薬を用いたNO_2^-の測定により行った。T細胞クローンの増殖応答は^{3}H−TdRの取り込みにより測定した。

［成績］

(1)MRL104.8a上でのTCR刺激に際し，T細胞（9−16Thクローン細胞）がいかなるリンフォカインを産生するかを解析した。IL−2は全く検出されない一方，多量のIFN−γとTNF−α活性が検出された。それぞれの産生はmRNAの発現によっても確認された。(2)TCR刺激により誘導されるIFN−γ産生が，このモデルにおけるT細胞死／T細胞増殖抑制に関与する可能性を検討した。抗IFN−γ抗体添加によりIFN−γ活性を中和したところ，T細胞死又は増殖抑制の回避が認められた。(3)次にIFN−γがストローマに作用して，T細胞死／T細胞増殖抑制を誘導する可能性を検討した。抗原刺激の代わりにrINF−γを（Thクローン＋ストローマ）の培養系に加

えたところ，Thクローンの細胞死が認められた。又，rTNF－αも多量に添加した場合には，rIFN－γと同様の結果が得られた。(4)重要なことに，抗原刺激又は抗原非存在下でのrIFN－γ／rTNF－αの添加によって誘導されるT細胞死／増殖抑制に相関して，培養上清に高レベルのNO産生が検出された。(5)NOはNOSによって合成される。NOSのうちiNOSはIFN－γ等の刺激により転写レベルで発現が増強される。そこでMRL104.8aストローマにおけるiNOSmRNA発現制御を検討した。iNOSmRNAは非刺激ストローマでは全く検出されず，rIFN－γ又はrTNF－αの刺激で発現が著明に増強した。又，T細胞クローンとストローマとの培養で抗原添加でTCRが刺激された時，ストローマによるiNOS mRNAの発現が誘導され，且つ上清にNOが産生された。(6)NO産生がT細胞死を惹起することを証明するため，NOS inhibitorであるL－NMMA（N－メチルアルギニン）を培養中に添加した。その結果，rIFN－γ／rTNF－αによって又は抗原添加でTCR刺激により誘導されるNO産生が抑制され，同時にT細胞死の回避も認められた。

［総括］

胸腺ストローマ細胞単層培養上で抗原刺激を受けたT細胞の除去は，T細胞によって産生されるIFN－γ／TNF－αとそれらの刺激に反応してNOを産生する胸腺ストローマ細胞との相互作用によるものであること，そしてNOがT細胞の増殖抑制（細胞死）の最終的エフェクター分子として働くことが明らかになった。これら一連の現象は，胸腺ストローマ細胞上におけるclonal eliminationの一つの分子機構を提示するものと思われる。この分子機構が胸腺で実際に作動しているか否かにつき現在更に解析を進めている。

論文審査の結果の要旨

［題名］Thymic stromal cells eliminate T cells stimulated with antigen plus stromal Ia molecules through their cross－talk involving the production of interferon－γ and nitric oxide（胸腺ストローマ細胞による抗原レセプター刺激T細胞除去の分子機構：interferon－γ（IFN－γ）と一酸化窒素（NO）の関与）

胸腺は，T細胞の増殖／分化に必要な微小環境を提供する器官である。胸腺におけるT細胞レパートリーの形成は，胸腺細胞上のT細胞抗原受容体（TCR）と胸腺ストローマ細胞上の主要組織適合遺伝子複合体（MHC）との相互作用によって引き起こされると考えられている。最近，胸腺内のCD4$^+$CD8$^+$細胞のnegative selectionを誘導するとき，TCR刺激以外にthymic APC／ストローマ由来のsecond signalが必要であるという報告が複数のグループによりなされている。CD28とB7とのinteractionはこのsecond signalの一つを提供し得ることを示す報告がある。ところが，CD28ノックアウトマウスにおいてはthymic selectionは全く正常である。従って，胸腺微小環境から提供される多種のsecond signalの協同でnegative selectionを行っている可能性が考えられる。

当研究室では未熟胸腺細胞の分化誘導能を有する胸腺ストローマ細胞クローンが樹立され，このストローマ細胞クローン単層培養上において“抗原＋ストローマ細胞のIa分子”によるTCR刺激を受けたT細胞が死に至る，というclonal deletionモデルが報告されていた。しかしT細胞死が誘導されるメカニズムは不明で，本研究はこの現象の分子機構を検討した。その結果，T細胞死はT細胞と胸腺ストローマ細胞との相互作用によって惹起されることが示唆された。つまり，（i）抗原＋胸腺ストローマ細胞のIa分子の刺激によってT細胞からIFN－γ／TNF－αが産生される。（ii）これらのリンフォカインが胸腺ストローマ細胞を刺激して，ストローマによる一酸化窒素NOの産生を誘導する。NO産生は誘導型NO合成酵素（iNOS）の活性化によって引き起こされる。（iii）そして，NOがT細胞の増殖抑制（細胞死）のエフェクター分子として働く。今回明らかにされたこれら一連の現象は，胸腺ストローマ細胞上におけるclonal eliminationの一つの分子機構を提示するものと思われる。そして，胸腺ストローマ細胞により産生されるNOがnegative selectionに必要なsecond signalに成り得ることも示唆された。従って，本研究は胸腺におけるclonal deletionの分子機構を今後詳細に検討してゆく上で重要な知見を提供するものと考えられる。