



Title	Cytokine synthesis and apoptosis by intestinal intraepithelial lymphocytes
Author(s)	山本, 正文
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40455
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

氏 名	やまもと まさふみ 山 本 正 文
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 6 1 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 8 年 5 月 9 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	Cytokine synthesis and apoptosis by intestinal intraepithelial lymphocytes (腸上皮細胞間リンパ球(IEL)によるサイトカイン産生とアポトーシス)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 清野 宏 (副査) 教 授 瀧岡 利之 教 授 平野 俊夫

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

腸管上皮細胞間に存在するリンパ球 (intraepithelial lymphocytes : IEL) は、免疫学的特徴および機能に関して、他の末梢組織のリンパ球とは異なるユニークな特徴を有していることで知られている。IEL は、そのほとんどが CD3⁺ T 細胞であり、実験系マウスでは約50%の頻度で $\gamma\delta$ TCR を発現している T 細胞が認められる。また、多数の胸腺外分化 T 細胞の存在が示唆されている。免疫機能に関しては、細胞傷害活性、経口免疫寛容の解除、Th1, Th2型サイトカイン産生能などの報告がなされている。本研究では、このような特徴を持つ IEL が、生体内に粘膜面を介して侵入してくる種々の抗原刺激に対してどのように反応しているかを検討するため、サイトカインの産生能を中心に *in vitro* におけるマウス IEL の免疫・生物学的特徴について検討した。

[方法ならびに成績]

1) IEL の生物学的特徴

IEL は、消化管上皮を介して様々の抗原ならびにマイトジェン様物質に絶えず接しているので、多くの T 細胞が活性化された状態にあることが考えられる。新鮮分離した IEL を propidium iodide (PI) に染色し、フローサイトメトリーを用いて、その細胞周期を測定すると興味ある結果が得られた。対照の脾臓より分離したリンパ球と比較してほとんど差は認められず、96.7%の IEL (脾臓, 96%) が G₀+G₁ 期であった。一般的に活性化されたプラスト細胞は低比重で、細胞周期が G₁ 期あるいは S/G₂+M 期である。逆に休息期の細胞は高比重で、その大部分が G₀ 期であると考えられている。よって、IEL を比重遠心法により、高比重と低比重分画に分け、その細胞周期を検索すると、両分画とも約96%が G₁+G₀ 期であった。しかしながら、各々の分画の IFN- γ および IL-5 産生能をサイトカイン特異的 ELISPOT 法により、タンパク質レベル、また、RT-PCR と cDNA-mRNA dot-blot hybridization 法により、mRNA レベルで比較すると低比重分画には、高いサイトカイン産生能が認められ、高比重分画にはほとんど認められなかった。また、低比重分画における T 細胞の約50%が $\gamma\delta$ T 細胞であるが、高比重分画の T 細胞には $\gamma\delta$ T 細胞が約20%しか含まれていなかった。これらの結果から、低比重分画には G₁ 期の活性化 T 細胞が含まれていることが示唆された。ま

た、高比重分画の IEL は G₀ 期にあると考えられた。

2) TCR-CD3複合体を介した刺激に対する IEL の反応

IEL の低比重および高比重分画が、TCR-CD3複合体を介した刺激に対してどのような反応を示すかを解析するため、両分画の CD3⁺T細胞を抗 CD3, 抗 $\gamma\delta$ TCR, 抗 $\alpha\beta$ TCR 抗体で刺激し、チミジン取り込みにより細胞増殖能を検索した。高比重分画の T細胞が低比重分画群に比較してより活発な細胞増殖を示した。また、高比重分画の CD3⁺IEL は、抗体刺激後、サイトカイン産生細胞の増加が認められたが、低比重分画 T細胞においては、その数は減少していた。抗体刺激後、両分画の T細胞から DNA を分離し、電気泳動法により解析すると低比重分画 T細胞にはアポトーシスの大きな特徴の一つである DNA の fragmentation が認められた。高比重分画 T細胞においては TCR-CD3複合体を介する刺激に対して、アポトーシス化はほとんど認められなかった。これらの結果から、高比重分画 IEL は TCR-CD3複合体を介する刺激により活性化され、サイトカイン産生細胞へと移行するが、すでにサイトカインを産生している低比重分画の T細胞は新たな刺激によって、アポトーシス化へと進んでいくものと考えられる。

[総括]

以上の実験により IEL は次のような特徴を持つことが示された。

- 1) 新鮮分離された IEL は低比重と高比重に分けることができ、低比重分画 IEL だけにサイトカイン産生が認められた。
- 2) 高比重分画の T細胞を TCR-CD3複合体を介したシグナルにより刺激すると、細胞は活性化され、サイトカイン産生能は増加した。
- 3) 低比重分画の T細胞を TCR-CD3複合体を介したシグナルにより刺激すると、細胞はアポトーシスへと移行した。
- 4) 以上のことから、高比重分画 IEL は粘膜上皮細胞層において、外界から侵入してくる病原細菌などの刺激に対して反応する T細胞であり、逆に低比重分画はネガティブな反応をして細胞死に向かうものと推察される。

論文審査の結果の要旨

粘膜面における第一線の防御機構である上皮細胞層に存在する腸上皮細胞間リンパ球 (intraepithelial lymphocytes : IEL) の免疫・生物学的解析は、腸管における免疫機構を解明する上で、非常に重要である。本研究では IEL の T細胞レセプター (TCR) -CD3複合体を介したシグナルに対する反応をそのサイトカイン産生能を中心に解析を加えた。IEL はその比重の違いにより 2つの分画に分離でき、低比重分画 IEL には、自発的にサイトカインを産生する T細胞が存在し、高比重分画の T細胞には、同様なサイトカイン産生能が欠如していることを明らかにした。また、これらの細胞の細胞周期を解析すると、高比重分画の T細胞は G₀ にあり、低比重分画の T細胞の多くは G₁ 期にあることが確認された。次に、この 2つの分画の T細胞を *in vitro* で、TCR-CD3複合体を介したシグナルによって刺激すると、高比重分画の T細胞は活性化され、顕著な細胞の増殖およびサイトカイン産生能が上昇することを示した。さらに、自発的なサイトカイン産生が認められる低比重分画の T細胞は活性化されず、アポトーシスへと移行することを明らかにした。多様多様な抗原が侵入し、活性化のシグナルが常に入ってくる腸管という特殊な環境において、高比重分画 IEL の様に新たな刺激に対応できる T細胞の存在を明らかにしたことは、粘膜面における第一線の防御機構を解明する上で非常に重要である。これらの研究は、腸管を介して侵入してくる種々の抗原刺激に対して、IEL がどのように反応するかを明らかにしたものであり、腸管の免疫機構における T細胞の役割について解明する大きな手がかりとなるものである。よって、学位の授与に値すると考えられる。