

Title	老化促進マウス系を用いた老化にともなう免疫学的特性の検討
Author(s)	深井, 貴子
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41075">https://hdl.handle.net/11094/41075</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	深井 貴子
博士の専攻分野の名称	博士 (歯学)
学位記番号	第 13552 号
学位授与年月日	平成 10 年 2 月 25 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	老化促進マウス系を用いた老化にともなう免疫学的特性の検討
論文審査委員	(主査) 教授 浜田 茂幸 (副査) 教授 松矢 篤三 助教授 森崎市治郎 講師 前田 定秋

## 論文内容の要旨

### [目的]

環境要因をも含めた生体の複合的な加齢変化である老化の機序については、最近、老化のモデル動物の開発・確立とあいまって、個体・細胞レベルでの解析が進められてきている。歯周疾患に関する疫学的調査からは高齢者ほど罹患率の高いことが明らかにされているが、老化に伴う免疫学的特性、特に歯周疾患の成立に関与する免疫応答の加齢変化については不明な点が多く残されている。そこで本研究では、老化のモデル動物実験系の一つである老化促進マウス (Senescence Accelerated Mouse; SAM) を用いて、B細胞の老化に伴う反応性、特に歯周病原性細菌に対する反応性の変動について検討した。次に、宿主の免疫調節機構において中心的役割を果たすと考えられるT細胞について、免疫細胞間の相互作用を *in vitro* で表現する反応系の一つと考えられる自己リンパ球混合培養反応 (autologous mixed-lymphocyte reaction; AMLR) を指標として老化に伴う応答性の変化を検討した。さらに、フローサイトメトリーを用いて CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup>T 細胞を中心とする種々の T 細胞サブセットの解析を行い、AMLR との関連性についても検討を加えた。

### [材料と方法]

#### 1. マウス

京都大学胸部疾患研究所より供与された促進老化徴候を示す SAM-P マウスおよび正常老化の SAM-R マウスを自家繁殖させて用いた。

#### 2. マイトジェン活性と多クローン性B細胞活性化反応

10%牛胎児血清を含む RPMI 培地に浮遊させた脾細胞浮遊液に *Escherichia coli* K12株および *Porphyromonas gingivalis* 381株より分離・精製した LPS (それぞれ EcLPS, PgLPS と略) を含む種々のマイトジェンを添加後、37°C, 5% CO<sub>2</sub>-大気中で48時間培養した。培養終了20時間前に [<sup>3</sup>H] チミジンを添加し、その取り込み量を液体シンチレーションカウンターで測定した。EcLPS および PgLPS による多クローン性B細胞活性化反応は、ヒツジ赤血球に対するプラーク形成細胞数を Cunningham 法を用いて測定した。

### 3. T細胞および非T細胞の調製と AMLR

AMLR の反応細胞としてのT細胞画分は、脾細胞をセファデックス G10 カラムを通過させてマクロファージを可及的に除去後、抗マウス免疫グロブリン抗体を用いたパンニング法により調製した。一方、AMLR の刺激細胞は、脾細胞を抗マウス CD90モノクローナル抗体と補体で溶解後、マイトマイシンC処理して得た非T細胞画分を用いた。T細胞と非T細胞を混和後、37°C、5% CO<sub>2</sub>-大気中で培養を行った。培養終了20時間前に [<sup>3</sup>H] チミジンを添加し、その取り込み量を測定した。AMLR は、T細胞画分のみでの培養系での測定値を差し引いた値 ( $\Delta$ DPM) で表した。

### 4. T細胞サブセットの検索

T細胞画分の CD3, CD4, CD8, CD45RB, IL-2 レセプター,  $\gamma\delta$ -TCR に対する蛍光標識モノクローナル抗体を組み合わせて多重蛍光抗体染色を行った。測定・解析はフローサイトメーターを用いてゲートをかけたリンパ球画分について行った。

### 5. T細胞でのサイトカイン mRNA の発現

各サイトカインに特異的な primer を用いた reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法により、無刺激時での SAM マウスT細胞の IFN $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10および TGF $\beta$  の mRNA の発現について比較検討した。

## [結果と考察]

### 1. マイトジェン活性と多クローン性B細胞活性化反応

SAM-P マウスの脾細胞は LPS を含む各種の供試マイトジェンに対して、SAM-R マウスのそれと比較して反応性が低く、特に、*P. gingivalis* の LPS に対する反応性は著しく低下した。この低反応性は、培養時間やマイトジェン濃度によるものではなく、前者の老化促進に伴う変化であると結論された。また、多クローン性B細胞活性化反応についても、SAM-P マウスでは同月齢の SAM-R マウスと比較して有意の低下を示すことが明らかとなり、B細胞の反応性が老化にともない低下することが強く示唆された。

### 2. AMLR

SAM-P マウスでは培養1日目の時点で AMLR のピーク応答性を示し、培養2日目以降は徐々に低下した。一方、SAM-R マウスではこれまでの報告と一致して培養3日目に AMLR のピークが認められた。その結果、培養3日目時点では SAM-P マウスでは SAM-R マウスと比較して有意に低い AMLR 値を示した。しかし、7カ月齢までの若齢 SAM-P マウスにおいては、SAM-R マウス同様、培養3日目で最大 AMLR がみられ、AMLR からみたT細胞の反応性に関してはこの時期では老化の影響が認められなかった。さらに、24カ月齢の SAM-R マウスあるいは24カ月齢の BALB/c マウスにおいては培養1日目に反応のピークが認められた。これらのことから、AMLR の反応性の変動は SAM-P マウスに特異的に観察されるものではなく、マウスT細胞の老化にともなう一般的な現象であることが強く示唆された。

### 3. T細胞サブセットの検索

SAM-P マウスおよび SAM-R マウスの脾臓T細胞サブセットの検索の結果、CD3 陽性細胞中の CD4, CD8 陽性細胞率については両マウス間で著しい差は観察されなかった。

AMLR における主たる反応細胞と考えられる CD4陽性細胞中の CD45RB 強陽性 (CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup>) T細胞率については、両マウスともピーク時の AMLR 値と有意の正の相関が認められた。しかし、両マウス間での有意の差は観察されなかった。一方、胸腺外分化T細胞サブセットと考えられる CD3 弱陽性で IL-2 レセプターを発現している T細胞 (CD3<sup>lo</sup>IL-2R<sup>+</sup>T細胞) の比率は、SAM-P マウスで有意に高い値を示した。しかし、いずれのマウスにおいても CD3<sup>lo</sup>IL-2R<sup>+</sup>T細胞率とピーク時の AMLR 値との有意の相関関係は認められなかった。また、 $\gamma\delta$ -TCR を持つT細胞 ( $\gamma\delta$ -T細胞) 率についても両マウス間での有意の差は観察されなかった。

### 4. T細胞でのサイトカイン mRNA の発現

SAM-P マウスT細胞のサイトカイン産生能を mRNA レベルで検討した。その結果、IFN $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5,

IL-6, IL-10およびTGF $\beta$ のmRNA発現はいずれも認められ、SAM-Pマウスに特定のサイトカイン産生能の欠落はないことが示された。しかし、SAM-Pマウスでは2カ月齢のSAM-Pマウスと比較してIL-2mRNAの発現が弱く、老化にともなってIL-2産生能が低下していることが示唆された。

#### [結論]

1. 促進老化を示すSAM-Pマウス(12カ月齢)では、マイトジェン活性や多クローン性B細胞活性化反応が低下しており、B細胞の老化にともなう反応性の低下が明らかにされた。
2. SAM-PマウスではAMLRのピークの反応が培養1日目に認められ、老化と関連してAMLRの反応性の変動が示された。この現象は、24カ月齢のSAM-RマウスやBALB/cマウスでも認められることから、T細胞の老化にともなう現象の一つであることが強く示唆された。
3. SAM-Pマウス、SAM-RマウスともCD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup>T細胞率とピークのAMLR値との間に有意の正の相関が認められ、SAM-Pマウスにおいても同T細胞サブセットがAMLRの主たる反応細胞であることが示された。一方、CD3<sup>lo</sup>IL-2R<sup>+</sup>T細胞の比率はSAM-Pマウスにおいて有意に高値を示した。
4. T細胞でのサイトカインmRNAの発現に関しては、SAM-PマウスでIL-2mRNAの発現の低下が認められたものの、その他では老化にともなう明確な差異は観察されなかった。

### 論文審査の結果の要旨

老化のモデル動物の一つである老化促進マウス(SAM)を主として用いて、老化にともなうBおよびT細胞の免疫応答の変化を検討した。SAM由来B細胞は加齢にともない*Porphyromonas gingivalis* LPSに対するマイトジェン活性および多クローン性抗体産生能が著明に低下し、これに対してT細胞機能については、宿主免疫調節能の指標とされる自己リンパ球混合培養反応を行うと培養早期に著明な反応を示し、以後は低下するという特異なパターンを示すことを明らかにした。さらにこの現象が胸腺外分化T細胞群(CD3<sup>lo</sup>IL-2R<sup>+</sup>)の上昇と関連することを示唆した。

以上の業績は、老化にともなう宿主の免疫応答の変化を、免疫担当細胞の機能から明らかにしたものであり、博士(歯学)の申請に値するものと認める。