

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
山口智子	主査 教授 竹 中 洋 主査 教授 窪 田 隆 裕 副査 教授 佐 野 浩 一 副査 教授 林 秀 行 副査 教授 清 水 章
主論文題名 IFN- γ : A Cytokine Essential for Rejection of CTL-Resistant, Virus-Infected Cells (インターフェロン- γ : 細胞傷害性T細胞に非感受性なウイルス感染細胞の拒絶に必須なサイトカイン)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究目的》</p> <p>ウイルス感染で誘導された細胞傷害性 CD8+T細胞 (CTL) は、ウイルスに感染したリンパ腫細胞や肥満細胞腫細胞を <i>in vitro</i> で傷害することができる。しかし、CD8 ノックアウトマウスにインフルエンザウイルスやセンダイウイルスを感染させても、ウイルスがクリアランスされたという報告もあり、CTL のウイルス感染に対するエフェクター細胞としての評価は定かではない。李らは、ウイルス抗原特異的 CTL の傷害活性が、ウイルス感染した細胞の種類 (リンパ系、上皮系など) によって感受性が異なることを報告し、CTL 非感受性ウイルス感染細胞の場合、CTL 以外のエフェクター細胞または分子が <i>in vivo</i> では存在することを示唆した。また、IFN-γ は cytopathic ウイルスのクリアランスに関与していると言われている。申請者の研究目的は、CTL 非感受性ウイルス感染細胞の拒絶における IFN-γ の <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> での役割を調べることである。</p> <p>《方 法》</p> <p><i>in vitro</i>: センダイウイルス特異的 CTL は、センダイウイルスを感染させた BALB/c IFN-γ +/+マウス (以下正常マウス) あるいは -/-マウス (以下 IFN-γ ノックアウトマウス) の脾臓細胞とセンダイウイルス持続感染線維芽細胞との混合培養で誘導した。CTL の細胞傷害活性は、⁵¹Cr で標識された標的細胞が、CTL によって傷害された結果遊離する ⁵¹Cr の量で測定した。</p> <p><i>in vivo</i>: 正常マウスおよび IFN-γ ノックアウトマウスとこれらにセンダイウイルスを感染させたマウスに、センダイウイルス持続感染細胞を皮下移植し、経時的に腫瘤の大きさを計測した。また、CTL 非感受性細胞の皮下移植では、同時に IFN-γ ノックアウトマウスに IFN-γ を皮下投与した場合と C12MDP-liposome を静脈注射してマクロファージを特異的に除去した場合も調べた。</p> <p>《結 果》</p> <p><i>in vitro</i>: 正常マウスおよび IFN-γ ノックアウトマウス由来のセンダイウイルス特異的 CTL は、センダイウイルス持続感染 RL male 1Tリンパ腫細胞を非常に強く傷害したが、ウイルス持続感染 Meth A 線維肉腫には不活性であった。</p> <p><i>in vivo</i>: 正常マウスおよび IFN-γ ノックアウトマウスは、皮下移植したウイルス持続感染 RL male 1</p>	

細胞を拒絶した。一方、正常マウスは、センダイウイルス非感染、感染を問わず、皮下移植したセンダイウイルス持続感染 Meth A 細胞を拒絶したが、IFN- γ ノックアウトマウスは、センダイウイルス非感染、感染を問わず、拒絶できず腫瘍は増殖し続けた。センダイウイルス持続感染 Meth A 細胞を拒絶できない IFN- γ ノックアウトマウスに IFN- γ を皮下投与すると、正常マウス同様、拒絶できた。また正常マウスに Cl2MDP-liposome を静脈注射しマクロファージを特異的に除去した場合、センダイウイルス持続感染 Meth A 細胞の拒絶は抑制された。

以上の結果より、CTL 非感受性ウイルス感染細胞の拒絶には IFN- γ が必須であり、エフェクター細胞としてマクロファージの関与が示唆された。

《考 察》

CTL はパーフォリンと Fas/FasL の 2 つの経路による細胞傷害性を持つため、従来のウイルス実験はそれらのノックアウトマウスを用いて実験され、CTL が noncytopathic ウイルスのクリアランスに、IFN- γ などの soluble factors は cytopathic ウイルスのクリアランスに関与していると言われてきた。一方、李らは、もともと cytopathic であるセンダイウイルスの defective interfering (DI) 変異株を用いて noncytopathic のセンダイウイルス持続感染株を作成し、種々の DI ウイルス感染細胞を標的細胞として用いた。その結果、抗原特異的 CTL がウイルス感染リンパ腫細胞や線維芽細胞には高い細胞傷害活性を示すのに対し、ウイルス感染皮膚細胞や扁平上皮癌細胞、線維肉腫細胞には活性を示さないことを報告した。さらに、申請者は、ウイルス感染細胞の皮下移植で、CTL 感受性 RL male 1T リンパ腫細胞は IFN- γ 非依存的に拒絶されたのに対し、CTL 非感受性 Meth A 線維肉腫細胞は IFN- γ 依存的に拒絶されることを明らかにした。これらの結果より、ウイルス感染細胞が増殖し続けるか拒絶されるかは、感染したウイルスの性質によるのではなく、むしろウイルスが感染した細胞の種類によって異なり、CTL 非感受性ウイルス感染細胞のクリアランスには IFN- γ が必須であることが示唆された。

IFN- γ と IL-1 α/β は、移植された Meth A 線維肉腫細胞の増殖を相乗的且つ cytostatic に阻害することが知られている。しかし、申請者は、ウイルス感染 Meth A 細胞をウイルス感作、非感作の同系正常マウスに移植すると、IFN- γ ノックアウトマウス同様、移植後 8 日目まで移植感染細胞は増殖し、ほぼ同じ径の腫瘍を形成すること、しかし、その後、正常マウスでは移植後約 20 日で拒絶され、IFN- γ ノックアウトマウスでは増殖し続けることを明らかにした。したがって、感染防御機構は cytostatic より cytotoxic に働いていると思われる。

cytopathic ウイルスの 1 種である B 型肝炎ウイルスの増殖は、CTL が誘導される前に IFN- γ や TNF によって 90% 以上阻害されることが知られており、IFN- γ や TNF といった soluble factors が CTL 以外の細胞を介して傷害活性を示し、ウイルスの増殖を阻止している可能性が示唆されている。また、同種異系移植の拒絶時に浸潤してくるマクロファージも CTL 非感受性皮膚細胞、扁平上皮癌細胞、線維肉腫細胞に傷害活性があり、CTL に先行して移植部に出現することが知られている。申請者は、Cl2MDP-liposome を用いてマクロファージを特異的に除去すると、ウイルス感染 Meth A 細胞の拒絶が遅延することを見出した。したがって、非リンパ系組織に感染した cytopathic ウイルスの制御は、soluble factors と CTL 以外の細胞を介した細胞傷害活性によるのかもしれない。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	山 口 智 子
論文審査担当者		主 査 教 授 竹 中 洋 主 査 教 授 窪 田 隆 裕 副 査 教 授 佐 野 浩 一 副 査 教 授 林 秀 行 副 査 教 授 清 水 章	
主論文題名 IFN- γ : A Cytokine Essential for Rejection of CTL-Resistant, Virus-Infected Cells (インターフェロン- γ : 細胞傷害性T細胞に非感受性なウイルス感染細胞の拒絶に必須なサイトカイン)			
論文審査結果の要旨			
<p>免疫担当細胞による非自己(同種異系細胞など)やウイルス感染細胞の認識と傷害は、生体防御機構において非常に重要で、CD8⁺細胞傷害性T細胞(CTL)がその主役と考えられている。しかし、心臓や皮膚の同種移植片拒絶にCTLは必須ではなく、CD8 ノックアウトマウスにインフルエンザウイルスやセンダイウイルスを感染させても、ウイルスがクリアランスされたとの報告があり、CTLの評価は定かではない。一方、ウイルス抗原特異的CTLの傷害活性が、ウイルス感染した細胞の種類(リンパ系、上皮系など)によって感受性が異なることや、CTL非感受性ウイルス感染細胞に対するCTL以外のエフェクター細胞または分子(IFN-γなど)のin vivoでの存在も報告されている。申請者は、CTL非感受性ウイルス感染細胞の拒絶におけるIFN-γのin vitroおよびin vivoでの役割を調べ、以下の結果を得た。</p> <p>(1) ウイルス特異的CTLの細胞傷害活性は標的細胞種によって異なり、ウイルス感染したBalb/3T3線維芽細胞、P815肥満細胞腫細胞、RL male 1Tリンパ腫細胞には活性を示すが、Meth A線維肉腫細胞、KLN205扁平上皮癌細胞には活性を示さなかった。(2) CTLに傷害されるウイルス感染細胞の拒絶にはIFN-γは必須ではなかった。(3) CTLに傷害されないウイルス感染細胞の拒絶にはIFN-γが必須で、マクロファージを特異的に除去すると、拒絶が遅延した。</p> <p>以上の結果は、生体内ではすべての組織や細胞がCD8⁺CTLに感受性を持っているわけではないことを示唆している。また、CD8 ノックアウトマウスがセンダイウイルスをクリアランスできたのは、CTL以外の細胞が上皮細胞や一部の間葉系細胞を傷害した可能性があり、マクロファージの関与が示唆された。</p> <p>本研究は、自己/非自己の識別について新たな知見を提供するものである。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第9条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) Journal of Interferon and Cytokine Research 25(6): 328-337, 2005</p>			