

(論文内容の要旨)

未熟胸腺細胞は、T細胞レセプター(TCR)のMHC(Major Histocompatibility Complex)分子に対するクラス特異性に応じて、クラスI分子に反応するTCRであればCD8陽性の細胞傷害性T細胞へ、クラスII分子に反応するTCRであればCD4陽性のヘルパーT細胞へと分化する。この分化決定のメカニズムについて、従来の研究は、CD4、CD8 coreceptorの役割に注目したものであった。申請者は、coreceptorのKOマウスにおいても分化決定はMHC分子のクラスに応じて起こることから、従来の研究を補うメカニズムがあるのではないかと考え、研究を行った。

申請者は発想を変えて、抗原提示分子側からのアプローチを試み、MHC分子のクラス間で構造上の違いを比較したところ、MHCクラスII分子 α 鎖の膜貫通ドメイン(TM)の中心部には、種を超えて保存されたCysがあるが、MHCクラスI分子にはないことに気づいた。このような位置のCysには、非酵素的にパルミチン酸修飾が起こることが知られており、パルミチン酸化した膜分子は、細胞膜上で糖脂質マイクロドメイン(rafts;ラフト)に会合する傾向がある。そこで、MHCクラスII分子にパルミチン酸化が起こっているか、また、ラフトに会合して提示されることが、胸腺細胞の分化決定に影響するかどうかを調べた。

まず、 ^3H -palmitic acidによる標識実験を行ったところ、マウスI-A^d分子にチオエステル結合による修飾が起こっていることがわかった。また、high-oxygen-submersion-fetal thymic organ culture (HOS-FTOC)法を使ったマウス胸腺培養の実験系で、methy- β -cyclodextrin (MCD)を使って物理的に、あるいは、mevinolinを加えて代謝的にcholesterolを制限した培養条件下では、CD4 T細胞へ分化する細胞の数が減少し、CD8 T細胞は増加する傾向があることがわかった。このCD4、CD8 T細胞の相補的な数の変化が、CD4 T細胞への分化、あるいは、生き長らえ(生存)が制限された結果によるのか、それとも、CD4 T細胞へ分化すべきMHC class II反応性T細胞の分化決定が、CD8 T細胞へと転換した結果によるのかを明らかにするため、次にMHC class II反応性TCRのtransgenic mouseであるDO11.10胸腺細胞の分化を調べた。その結果、CD4 T細胞の増加は、本来MHC class II分子を認識してCD4 T細胞へ分化すべき胸腺細胞が、CD8 T細胞へと分化した結果であることがわかった。このことは、CD4 T細胞への分化決定がMHC分子のラフト会合性に依存して起こる一方、CD8 T細胞への分化は、ラフト非依存性に起こることを示唆した。また、reaggregated thymic organ culture (RTOC)を使って、抗原提示側である胸腺上皮細胞側のcholesterolを制限するだけでも、CD4からCD8へとT細胞分化がシフトすることが明らかとなった。最後に、I-A^d分子のTMに存在するCysをSerに置換したI-A^{dm}分子を発現する胸腺上皮細胞による胸腺細胞の分化を調べたところ、ラフト会合性が大きく失われたI-A^{dm}分子を認識したDO11.10胸腺細胞では、CD8へ傾いた分化決定が起こることが明らかとなった。

(論文審査の結果の要旨)

申請者は、胸腺細胞の CD4、CD8 T 細胞への分化決定機構について、従来の胸腺細胞側からのアプローチに対し、胸腺上皮細胞側に注目し、MHC 分子のクラスによる提示様式の違いに注目して、MHC class II 分子のラフト会合性が CD4 T 細胞の分化誘導に重要な役割を持つことを示した。新たな視点から胸腺分化のメカニズムの 1 つを明らかにした研究である。

審査員からは、以下のようなコメントや指摘があった。

1. 胎児胸腺培養の分化実験のデータ自体は、実験グループ間の差が少なく、結果に記述されているほど明らかな結論を導くに十分でない印象を受ける。
2. ラフトに会合して、均一に希釈や分配ができにくいラフト会合性分子の解析に、希釈により定量性をもたせる ELISA を使うことは適当か、また、ラフトに相乗りした他の分子が ^3H -標識された分子を解析する際に混入する可能性はないか。
3. 膜分子の共会合をみるための蛍光顕微鏡による観察では、非生理的な抗体分子による架橋を見ており、実際に、TCR が認識する際にラフト会合性を示すかどうかは、わからないのではないか。
4. **methy- β -cyclodextrin** を用いた **cholesterol** の除去実験では、胸腺のどこまで浸透が期待できるのか、また、細胞への影響が多大な方法であるが、問題はないか。
5. 変異 I-A^{dm} 遺伝子の **transgenic** あるいは **knock-in** を作製した方がよかったのではないか。
6. 胸腺上皮細胞に発現される変異 I-A^{dm} 分子にラフト会合性が失われていることを直接、証明する必要はないか。
7. 胸腺上皮細胞上の変異 I-A^{dm} 分子には、自己ペプチドが結合していることを前提とした実験系なのか。確認の必要はないか。
8. CD4 T 細胞の減少が、CD8 T 細胞への転換によるのではなく、CD4 T 細胞の寿命が短くなり、見かけ上そうなった可能性は？
9. FTOC の実験は予備的な実験にすぎないため、RTOC および I-A^{dm} 分子を使った、より決定的なデータを前面に出した論文構成にした方がよかったのではないか。

これらの質問やコメントに対し、申請者は、おおむね適切な応答をし、論拠をあげて議論をすることができた。また、論文内容に不正確な点やあいまいな表現があった部分について修正を加えて改訂をした。以上の経緯をふまえ、審査員一同、本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。

引続いて、平成 20 年 1 月 1 7 日、論文内容とそれに関する口頭試問を行った結果、合格と認めた。