

氏 名	う 京 直 哉
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2753 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Costimulation through OX40 is crucial for induction of an alloreactive huma T cell response (OX40を介する補助刺激はヒトのT細胞のアロ反応の誘導にとって重要である)
論文調査委員	(主 査) 教 授 三 森 経 世 教 授 湊 長 博 教 授 内 山 卓

論 文 内 容 の 要 旨

OX40は、主に活性化CD4⁺T細胞に発現誘導され補助刺激を伝える膜分子として知られている。OX40を介する補助刺激はメモリーT細胞の生存、IL-4産生の増強などにあって重要であると報告されている。一方近年の移植医療の進歩に伴い造血幹細胞移植後の移植片対宿主病や臓器移植後の移植片拒絶などの合併症が問題となっているが、これらのアロ免疫反応に基因する病態にOX40を介する補助刺激が関与していることが示唆されている。アロ免疫反応の *in vitro* のモデルであるアロリンパ球混合試験 (MLR) においてT細胞の反応が顕在化するには数日を要し、この間に主にアロ樹状細胞からT細胞にT細胞レセプター (TCR) を介する刺激及びCD28, OX40などを介する補助刺激が次々に伝えられ、最終的なT細胞の反応の性格が決定されると考えられている。しかしどのような刺激がどのような時間的経過で加わるのか、またどのシグナル系が重要であるのかは明らかにされていない。そこで本研究ではアロMLRの系を用いて抗体を用いたブロッキングの実験を行い、ヒトのアロ免疫反応におけるOX40系の役割について代表的な補助刺激であるCD28系と比較し検討した。

まず末梢血単核球細胞を用いた7日間の2方向性MLRが抗HLA-DR抗体やCTLA-4/Fcと同様に抗OX40抗体によっても強く抑制されることを見出した。この現象をさらに詳細に解析するために、精製したCD4⁺T細胞をアロ樹状細胞で刺激する1方向性MLRの系を準備した。即ち、単球をGM-CSFとIL-4の存在下で培養して未熟樹状細胞に分化させ、これに単球培養上清を加えて成熟樹状細胞を作成した。これらの細胞にOX40が発現することをフローサイトメトリーを用いて確認した。アロ成熟樹状細胞とCD4⁺T細胞を混合培養するとT細胞上にOX40が発現したが、抗HLA-DR抗体またはCTLA-4/Fcを加えておくとOX40の発現はほぼ完全に抑制されたことから、OX40の発現にはTCR, CD28のシグナルの両方が必要であることが示唆された。種々の抗体の非存在下または存在下に上記1方向性MLRの混合培養を行い、5日目の[3H]TdRの取り込みによってCD4⁺T細胞の増殖反応を定量した。その結果、CD4⁺T細胞の増殖は抗HLA-DR抗体やCTLA-4/Fcと同様に抗OX40L抗体によってもほぼ完全に抑制された。培養上清中のIL-2をIL-2依存性T細胞株CTLL-2を用いたバイオアッセイで測定したところ、抗OX40L抗体の添加によってIL-2の産生が著明に抑制されていることが示された。最後に、セルソーターを用いてOX40Lを発現していない樹状細胞を純化し同様の増殖試験を行った。共培養の期間を通じてこれらの樹状細胞にはOX40Lの発現が殆ど検出されなかったがT細胞の十分な増殖反応が起こり、この反応は抗OX40L抗体の存在により強く抑制された。我々の用いた抗OX40L抗体には細胞毒性が認められないことを確認しているので、恐らく僅かな量のOX40LがT細胞との反応局所に発現し、必要十分なシグナルを伝達しているものと推測される。以上より、アロ単球由来樹状細胞によるCD4⁺T細胞の活性化と増殖においてOX40系はCD28系より下流に位置しCD28系に依存しているが、しかし最終的なT細胞の反応にとって必須のシグナルを伝えること、そしてそれは少なくとも一部にはIL-2の産生を介していることが示された。OX40系はヒトのアロ免疫反応にとって極めて重要なシグナルを伝えていると考えられる。

論文審査の結果の要旨

活性化T細胞に発現するOX40を介する刺激が急性GVHDの病態に関与していることがマウスの系では示されているが、ヒトにおいては一致した結果が得られていない。そこで本研究ではアロリンパ球混合試験（MLR）の系を用いて、ヒトのアロ免疫反応におけるOX40を介する刺激の寄与について解析を行った。

まず、健常者末梢血単核球細胞を用いた二方向性MLRにおける増殖反応は、抗HLA-DR抗体、CTLA-4/Fc及び抗OX40リガンド（OX40L）抗体によって強く抑制された。次に、OX40Lを発現している単球由来のアロ成熟樹状細胞（DC）とCD4⁺T細胞を用いた一方向性MLRにおいてT細胞上にOX40が発現し、その発現はT細胞レセプターおよびCD28を介する刺激に依存性であることが判った。この系に抗OX40L抗体を添加するとT細胞の増殖反応はほぼ完全に抑制され、また、培養上清中のIL-2をCTLL-2バイオアッセイで測定した所、抗OX40L抗体の添加によってIL-2産生が著明に抑制されていることが判った。さらにOX40Lを発現していないDCを純化し同様の増殖試験を行った所T細胞の十分な増殖が起こり、DC上にはOX40Lが殆ど検出されなかったにも関わらず、その反応は抗OX40L抗体の添加により強く抑制された。以上よりヒトのCD4⁺T細胞のアロ免疫反応にとってOX40を介する補助刺激は重要であることが示された。

本研究は、ヒトOX40/OX40L系の機能の解明に貢献し、ヒトのアロ免疫反応の究明に寄与するところが多い。従って、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は平成16年2月2日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。