

|          |                                                                                                              |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名      | かとう ゆう<br>加藤 悠                                                                                               |
| 学位(専攻分野) | 博 士 (生命科学)                                                                                                   |
| 学位記番号    | 生 博 第 65 号                                                                                                   |
| 学位授与の日付  | 平成 18 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   | 生命科学研究科高次生命科学専攻                                                                                              |
| 学位論文題目   | Presentation of Nonpeptide Antigens to Human $\gamma\delta$ T Cells (ヒト $\gamma\delta$ 型 T 細胞への非ペプチド性抗原提示機構) |

|        |                                    |
|--------|------------------------------------|
| 論文調査委員 | (主 査)<br>教授 湊 長博 教授 稲葉 カヨ 教授 杉田 昌彦 |
|--------|------------------------------------|

### 論 文 内 容 の 要 旨

T 細胞には、 $\alpha\beta$  型 T 細胞と同様に、免疫グロブリン様受容体を持つ  $\gamma\delta$  型 T 細胞が存在する。 $\gamma\delta$  型 T 細胞は、結核菌、マラリア、サルモネラ、HIV などの感染患者末梢血中において増加が見られ、感染局所に浸潤していることから、病原性微生物の生体防御応答に寄与していることが報告されている。またマクロファージに先駆けて腫瘍へ浸潤し、炎症性サイトカインである IFN- $\gamma$  を産生するなど、腫瘍免疫においても重要な働きをしていることが示唆されている。

代表的な抗原としては、結核菌成分であるイソペンテニル二リン酸などのリン酸抗原や、病原性微生物が排出するイソブチルアミンなどのアルキルアミン抗原や骨粗鬆症治療薬として臨床応用されているパミドロネートなどの窒素含有型ビスフォスフォネートなどの非ペプチド性化合物を認識することが報告されている。以上のように、 $\gamma\delta$  型 T 細胞の抗原群については詳細な解析が進められているが、いかにして、これら非ペプチド性抗原が  $\gamma\delta$  型 T 細胞受容体に提示され、認識されているかについては不明な点が多い。

申請者は、この  $\gamma\delta$  型 T 細胞への抗原提示機構の解明について研究を進めてきた。まず、申請者は、非ペプチド性抗原を効率よく提示する細胞を同定することを最初の目的とし、 $\gamma\delta$  型 T 細胞のサイトカイン産生を指標として、様々ながん細胞における抗原提示能の検討を行った。その結果、多くのヒトがん細胞において  $\gamma\delta$  型 T 細胞への非ペプチド性抗原提示能が見られ、特に、ヒト膀胱がん細胞、ヒト腎臓がん細胞が最も良い抗原提示細胞であることを示した。また、マウス、ラット、サルなどのヒト以外の動物種に由来するがん細胞群においても、 $\gamma\delta$  型 T 細胞の活性化能がみられなかったことから、明確な種特異性を確認した。ここから、多くのヒトがん細胞に特異的な抗原提示に関与する分子が存在することを示した。次に、申請者は、 $\gamma\delta$  型 T 細胞と抗原提示細胞との細胞間接着が重要な働きをしていることに注目し、接着分子の関与を検討した。抗原提示能をもつヒト膀胱がん細胞、ヒト腎臓がん細胞において、強い ICAM-1 の発現が見られたが、乳がん細胞、胃がん細胞にはほとんどみられなかった。次に、ICAM-1 を強制発現した肺がん細胞において、 $\gamma\delta$  型 T 細胞の活性化誘導能を検討したところ、非ペプチド性抗原を処理した ICAM-1 発現細胞において、親株よりも強い IFN- $\gamma$  産生誘導能、及び、増殖誘導能が確認された。これらのことから、 $\gamma\delta$  型 T 細胞がエフェクター機能を発揮する上で、抗原提示細胞に発現する ICAM-1 と  $\gamma\delta$  型 T 細胞に発現するそのレセプターである LFA-1 が結合することが必要であることが示された。次に、フローサイトメトリーを用いて  $\gamma\delta$  型 T 細胞と抗原提示細胞の接着を検討した。 $\alpha\beta$  型 T 細胞では、抗原非存在下では抗原提示細胞との接着面形成が認められないことが知られているが、興味深いことに、 $\gamma\delta$  型 T 細胞においては、抗原提示細胞と遭遇すると同時に、抗原の存在にかかわらず強い接着がみられた。更に、その細胞間接着は、非ペプチド性抗原非存在下では維持できないが、抗原存在下では持続し続けることでサイトカイン産生や増殖能などのエフェクター機能が誘導されることが明らかとなった。これらのことから、 $\alpha\beta$  型 T 細胞とは異なり、 $\gamma\delta$  型 T 細胞は感作されなくても抗原提示細胞との接着が可能であり、抗原提示細胞表面上の抗原を確認していることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

申請者は、 $\gamma\delta$  型 T 細胞と抗原提示細胞間で働く補助刺激分子として、 $\gamma\delta$  型 T 細胞上に発現する CD6 分子と、そのリガンドで抗原提示細胞上に発現する ALCAM 分子を免疫学的手法により同定した。まず、ヒト膀胱がん細胞を免疫原とし、抗原提示能をもつヒトがん細胞でポジティブな細胞染色がみられるモノクローナル抗体を、フローサイトメトリーにより選択し、三種類のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを樹立した。この抗体を用いた免疫沈降により、認識するタンパク質を精製し、トリプシン等の酵素処理によりペプチド断片化した後に MALDI-TOF/MAS によって質量分析した。この分析結果をデータベースで検索し、ALCAM 分子が同定された。そのレセプターである CD6 分子はヒト  $\gamma\delta$  型 T 細胞に発現が見られた。ヒト慢性骨髄性白血病細胞において ALCAM 分子を強制発現し、非ペプチド性抗原を処理した際の、 $\gamma\delta$  型 T 細胞の増殖能を検討したところ、親株と比較し強い増殖誘導能が見られた。また、ベクター型 RNAi システムを用いてヒト肺がん細胞の ALCAM 分子の発現を長期的に抑制し、この細胞の  $\gamma\delta$  型 T 細胞の抗原提示能を検討したところ、増殖が抑制された。また ALCAM 分子、CD6 分子の細胞間接着面における局在を検討したところ、ALCAM 接着面全体に見られるが、CD6 分子は  $\gamma\delta$  型 T 細胞受容体と共局在することが確認された。以上の結果から、ヒトがん細胞上に発現する ALCAM 分子と  $\gamma\delta$  型 T 細胞の CD6 分子の結合が、ヒト  $\gamma\delta$  型 T 細胞受容体からの刺激を補助していることが示唆された。

また申請者は、非ペプチド性抗原提示分子の存在について、リン酸抗原を用いた実験により確認した。ヒト膀胱がん細胞に、リン酸抗原を 37°C で処理した場合に比べ、4°C 処理した場合は高い  $\gamma\delta$  型 T 細胞の反応性が見られた。これは、37°C では細胞内に取り込まれ脱リン酸化酵素の働きにより代謝されていることが考えられ、一方 4°C では、細胞内への取り込みがないにも関わらず高い値が見られたことから、ヒトがん細胞表面上にリン酸抗原が結合していることが示唆される。更に、RI 標識化抗原の 100 倍濃度の RI 非標識化リン酸抗原を同時に処理したところ、値が抑えられたことから、この結合は特異的であると考えられた。

まとめると、1. 多くのヒトがん細胞において  $\gamma\delta$  型 T 細胞へ非ペプチド性抗原提示能があること 2. 非ペプチド性抗原提示機構において、ICAM-1 分子と LFA-1 分子の結合などの接着分子が働き、抗原の有無に関わらず抗原認識の場を形成していること 3. ALCAM 分子、CD6 分子の結合が、 $\gamma\delta$  型 T 細胞受容体からのシグナルを増強し、補助刺激分子として働いていること、4. ヒトがん細胞表面上に、非ペプチド性抗原提示分子が存在すること、が示唆された。

以上より、本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値のあるものと認めた。また平成 18 年 1 月 24 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めたものである。