

論文内容の要旨

【目的】

骨髓異形成症候群 (MDS) の造血障害には、主に異常 T 細胞クローンによる免疫学的機序の存在が示唆されているが、その詳細は不明である。我々は MDS 患者の末梢血より T 細胞株 K2-MDS を樹立し報告した。(Leukemia Research 2000)。今回、K2-MDS 細胞の健康人 CD34 陽性細胞に対する細胞障害活性について検討した。

【方法と結果】

健康人骨髓から、CD34 陽性細胞を純化した後に K2-MDS 細胞と共培養を行い、CD34 陽性細胞の細胞障害活性を測定した。その結果、K2-MDS 細胞は濃度依存性に細胞障害活性を認めたが、Jurkat 細胞ではその活性を認めなかった。一方、Transwell 及び K2-MDS 細胞の培養上清を用いた系では細胞障害活性を示さなかった。Annexin V 法を用いて解析した結果、K2-MDS 細胞は、CD34 陽性細胞に対して 52.1%のアポトーシスを誘導した。K2-MDS 細胞は、細胞障害分子 perforin、granzyme B を発現し、かつ concanamycin A 添加により活性は阻害されたことから、その細胞障害活性経路が perforin-granzyme B 系であることが示唆された。近年、NK 細胞や細胞障害性 T 細胞の細胞障害モデルで、fractalkine とそのレセプター CX3CR1 が注目されている。K2-MDS 細胞は CX3CR1 を細胞表面に発現し、CD34 陽性細胞での fractalkine 発現も確認された。その細胞障害活性が、抗 fractalkine 中和抗体及び可溶性 fractalkine によって特異的に阻害されたことから、この K2-MDS 細胞の細胞障害機構は fractalkine CX3CR1 系を介することが示された。

【結論】

perforin-granzyme 陽性細胞障害性 T 細胞株 K2-MDS 細胞は fractalkine CX3CR1 システムを介して、健康人骨髓 CD34 陽性細胞に対して細胞障害を示すことが示された。

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	2004年10月1日 公表	出版物名 Clinical Immunology
	公 表 内 容	
	全 文	2004年10月1日 発行

氏 名 森 田 泰 慶

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 医 第 8 4 3 号

学位授与の日付 平成 17 年 3 月 22 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学位論文題目 A perforin/granzyme-positive MDS-derived T cell line, K 2-MDS, induces apoptosis in CD34+ cells through the fractalkine/CX 3 CR1 system
(K 2-MDS 細胞は fractalkine/CX 3 CR 1 系を通じて骨髓 CD 34 陽性細胞にアポトーシスを誘導する)

論文審査委員 (主 査) 教授 金 丸 昭 久

(副主査) 教授 義 江 修

(副主査) 教授 福 岡 正 博

論文審査結果の要旨

【目的】

骨髄異形増殖症候群(MDS)は造血幹細胞異常であり、無効造血を特徴とする。シクロスボリンAなどの免疫抑制療法が奏効する症例があることから、その造血障害に異常T細胞クローンによる免疫学的機序の存在が示唆されているが、その詳細は不明である。

我々は以前MDS患者の末梢血よりT細胞株K2-MDSを樹立し、その解析を進めてきた。今回、MDSの無効造血における新たな病態を明らかにするために、K2-MDS細胞の造血幹細胞への細胞障害活性とその機序を解析した。

【方法】

健康人から骨髄を採取し、造血幹細胞マーカーであるCD34を指標としてCD34陽性細胞を純化した。K2-MDS細胞とPKH-26色素でラベリングしたCD34陽性細胞との共培養、Transwell及び培養上清を用いた系で、K2-MDS細胞のCD34陽性細胞への細胞障害活性をフローサイトメトリーで検討した。コントロールには、Jurkat細胞を用いた。また、Annexin V法で早期アポトーシスの観察を行った。K2-MDS細胞の細胞障害因子の検討で、perforin、granzymeBの細胞内発現、およびFas ligandの細胞表面発現をフローサイトメトリーで検討した。次に、perforinの特異的inhibitorであるconcanamycin Aを共培養系に添加し、細胞障害活性への影響を検討した。K2-MDS細胞の細胞認識機構の検討で、K2-MDS細胞のCX3CR1発現、CD34陽性細胞のfractalkine発現をRT-PCRおよびフローサイトメトリーで検討した。抗fractalkine中和抗体および可溶性fractalkineを共培養系に添加し、細胞障害活性への影響を検討した。CX3CR1陽性細胞のCD34陽性細胞への細胞障害活性の検討で、高速セルソーターを用いて、健康人よりCD4陽性細胞およびCX3CR1陽性CD8陽性細胞をソーティングし、細胞障害活性を検討した。最後に、fractalkine陽性で人臍帯血管内皮細胞である、HUVEC細胞へのK2-MDS細胞の細胞障害活性を検討した。同時に、抗fractalkine中和抗体の細胞障害活性への影響を検討した。

【結果】

健康人骨髄CD34陽性細胞との共培養の結果、K2-MDS細胞は濃度依存性に細胞障害活性を認められたが、Jurkat細胞では同活性を認めなかった。一方、Transwell及び培養上清を用いた系では同活性を示さなかった。Annexin V法では、K2-MDS細胞は、52.1%のアポトーシスを誘導した。また、K2-MDS細胞は、細胞障害因子perforin、granzyme Bを発現し、かつconcanamycin A添加により活性が阻害されたことから、perforin/granzyme B系を介して細胞障害を起こすことが示唆された。TCRを細胞表

面に有さないK2-MDS細胞は、CX3CR1を細胞表面に発現し、CD34陽性細胞でのfractalkine発現も確認された。その細胞障害活性が、抗fractalkine中和抗体及び可溶性fractalkineによって特異的に阻害されたことから、K2-MDS細胞の細胞障害認識機構はfractalkine/CX3CR1系を介することが示された。また、K2-MDS細胞は、HUVEC細胞に対しても細胞障害活性を示し、fractalkine中和抗体によりその活性が阻害された。

【考察】

MDSの無効造血における新たな病態を明らかにするために、K2-MDS細胞の造血幹細胞への細胞障害活性とその機序を解析した。K2-MDS細胞は、健康人CD34陽性細胞に対して細胞障害活性を認めた。培養上清およびTranswellを用いた細胞非接着の系で同活性を認めないことから、その細胞障害経路は、non secretory systemが重要であることが推測された。そこでK2-MDS細胞の有する細胞障害因子について検討したところperforin/granzyme系が重要であることが明らかになった。TCRを有さないK2-MDS細胞は、CD34陽性細胞を認識する新たな分子の検討が必要であった。近年、NK細胞や細胞障害性T細胞の細胞障害モデルで、fractalkineとそのレセプターCX3CR1が注目されている。K2-MDS細胞はCX3CR1の発現により細胞を認識し、リガンドであるfractalkine発現依存性に細胞障害活性を示すことが明らかになった。健康人CX3CR1陽性細胞は、健康人CD34陽性細胞に対して細胞障害活性を示さないことから、fractalkineとCX3CR1の結合のみでは細胞障害分子の分泌が生じない細胞内シグナル伝達機構の相違、あるいはTCRまたはCX3CR1の個々の細胞間での優位性の相違などが推測された。

MDS由来のT細胞株はK2-MDS細胞以外に報告がなく、MDSの無効造血に関する新たな病態機序を解析する上で、良いモデルとなり得る可能性が示唆された。

【結論】

MDS由来T細胞株K2-MDS細胞は、fractalkine発現細胞に対して細胞障害活性を示し、その経路としてperforin/granzyme経路が重要であることが示された。

これらの研究成果は、MDSの無効造血の病態解明に大きな手がかりを与えるものであり、以上の点から本論文は医学博士の学位を授与するに値するものと考えられる。