

報告書

平成15年度 丸木記念特別奨学研究費B 研究実績報告書

ケモカイン発現欠損マウス (*plt*マウス)におけるワクシニアウイルス抵抗性とウイルス特異的細胞傷害性T細胞の解析

受賞者 松井 政則 (埼玉医科大学微生物学教室)

共同研究者 赤塚 俊隆*, 守屋 修*

【緒言】*plt*マウスは、1987年、東大・医科学研究所において spontaneous にできた変異マウスであり、当時の医科研助教授であった垣内博士(現東邦大教授)らのグループにより解析が行われてきた。通常、抗原が体内に侵入した場合、樹状細胞(DC)などの抗原提示細胞が抗原を二次リンパ組織に運ぶかもしくは直接抗原が二次リンパ組織に到達して、一次リンパ組織から二次リンパ組織に遊走してきたナイーブT細胞を刺激し免疫反応を惹起させる。しかし、*plt*マウスはT細胞が二次リンパ組織へ遊走する際に必須なケモカイン、CCL21とCCL19の発現欠損があり、その結果リンパ節にT細胞がほとんど存在せず、また、脾臓ではT細胞が赤脾髄のみに存在し白脾髄に存在しない。さらに、活性化DCの二次リンパ組織への遊走も阻止されるため、当初*plt*マウスのT細胞による免疫反応は正常マウスと比べ極めて弱いと考えられた。事実、マウス肝炎ウイルス(MHV)に対する抵抗性は、野生型マウスに比べてずっと低かった。しかし予想に反し、卵白アルブミン(OVA)で免疫した場合、*plt*マウスでは野生型マウスに比べてOVA特異的ヘルパーT細胞(Th)の反応の増強がみられた。CCL21/19発現欠損マウスになぜ抗原特異的Thの反応増強がみられるのか、またその免疫反応の増強がMHVに対する抵抗性という生体反応になぜ反映しないのかという謎はまだ解決されていない。私はこの話に興味を持っていたが、私の専門の細胞傷害性T細胞(CTL)についてはほとんど調べられていなかったため、*plt*マウスのCTL反応について研究させて頂くことになった。CTLは、さまざまなウイルス感染症においてウイルス除去に中心的役割を担うT細胞であり、その誘導にケモカインが重要な役割を演じている。我々はまず予備実験で、致死量前後の組み換えvaccinia virus(VV)を接種し、*plt*マウスと同じ遺伝的バックグラウンドを持つBALB/cマウスと

*埼玉医科大学微生物学教室

の比較でそのウイルスに対する抵抗性を検討した。野生型のVV(VV-wt)を接種した場合、MHVと同様、*plt*マウスはBALB/cより低濃度のウイルス接種で死んでしまった。しかし、C型肝炎ウイルス(HCV) core蛋白をコードする遺伝子を組み込んだVV(VV-core)を接種すると、*plt*マウスはBALB/cより高い抵抗性を示し高濃度でも生き延びた。この予備実験の結果より、HCV core蛋白とCCL21/19の発現欠損とのなんらかの関係で、ウイルス特異的CTLが強力に誘導されてウイルスがクリアーされ、*plt*マウスがrVVに対して抵抗性をもつようになったと考えられた。しかしながら、その後、VV-core接種による、*plt*マウスの抵抗性を再現できなくなった。いまだにその理由はよくわからないが、VV-coreが変異したのかもしれない。そのため、はじめの実験計画を変更することになった。前述のごとく、CCL21/19発現が欠損している*plt*マウスについて、ウイルス感染防御において最も重要なCTLについてはほとんど調べられていないため、VV-wt感染におけるVV特異的CTLについて詳細に検討することにした。

【材料と方法】1) マウス：上述の*plt*マウスと、正常コントロールとして、*plt*マウスと遺伝的バックグラウンドが同じBALB/cマウスを使用した。2) ウイルス：野生型vaccinia virusを使用。3) マウス生存率の測定：致死量前後のさまざまなウイルス量のVVを、一群8匹ずつのマウスに腹腔注射して、それぞれのマウスの生存率を測定し、survival curveを描いた。4) マウス体重の測定：致死量未満のウイルス量のVVを、一群8匹ずつのマウスに腹腔注射して、それぞれのマウス体重を毎日測定した。5) マウス臓器のウイルスタイトルの測定：致死量未満のVVをマウスに接種し、3日、7日、14日後に、さまざまな臓器(卵巣、脾臓、肝臓、腎臓)のウイルスタイトルをBSC-1細胞を用いて測定した。6) CTL活性：VVを接種して2週間後にマウスから脾臓をとり、脾細胞を調整して、VVを感染し⁵¹Crでラ

ベルしたP815細胞株を標的細胞として、 ^{51}Cr 遊離試験を行い、VV特異的CTL活性を測定する。7) フローサイトメトリー：VVを接種したマウスから脾細胞またはリンパ節細胞を調整し、VVを感染したA20細胞で brefeldin Aを加えた培地中で5時間刺激する。その後、FITC-anti-CD8抗体またはFITC-anti-CD4抗体とPE-anti-IFN- γ 抗体で二重染色し、フローサイトメーターで、CD8(+)/IFN- γ (+)またはCD4(+)/IFN- γ (+)細胞の数を測定し、それぞれのマウスで比較する。

【結果と考察】致死量のVVを投与すると、*plt*マウスはBALB/cマウスより少し生存率が低く、致死量未満のVVを投与すると、*plt*マウスはBALB/cマウスより体重減少が激しかった。また、感染後のさまざまな臓器(卵巣、脾臓、肝臓、腎臓)のウイルスタイトルは、*plt*マウスの方がBALB/cマウスより少し高かった。以上の結果から、VVの感染において、*plt*マウスはBALB/cマウスと比べ感受性が高いことがわかったが、その感受性差の程度はMHVの場合に比べて、ずっと少ない。したがって、CCL21とCCL19の発現欠損によるウイルス感受性への影響は、ウイルスの種類によって異なる。しかし、感染直後から4週までの、VV特異的CTL活性にはまったく差がみられなかった。したがって、ウイルス感受性の差はCTLの質的な差ではない。次に、VVを接種後、3日から5週までの脾臓におけるCD8(+)/IFN- γ (+)細胞数を測定した。BALB/cマウスではウイルス抗原により活性化したCD8(+)/IFN- γ (+)細胞数が、感染後7日をピークに劇的に増加し、その後徐々に減少した。一方、*plt*

マウスではCD8(+)/IFN- γ (+)細胞数はほとんど増加しない。CCL21/CCL19の発現欠損のため、活性化DCなどの抗原提示細胞の脾臓への遊走が阻止されるため、効果的にCD8(+)/CTLが活性化されず、CD8(+)/IFN- γ (+)細胞数の増加がみられず、ウイルスに対する抵抗性が減少すると思われる。しかし、T細胞の遊走が阻止されているため、もともとの脾細胞の数が*plt*マウスの方がBALB/cマウスより数倍多いことにより、トータルのCD8(+)/IFN- γ (+)細胞数はほとんど変わらない。そのため、ウイルスに対する抵抗性の差に、MHVのような際立った違いが見られないと思われる。これは、CD8(+)/IL-2(+)細胞、CD8(+)/TNF- α (+)細胞また、CD4(+)/IFN- γ (+)細胞においても同じ傾向を示した。このように、OVAの免疫後にみられた、CD4(+)/ヘルパーT細胞数の劇的な増加はみられなかった。一方、リンパ節においては、*plt*マウスではT細胞がほとんど存在しない。したがって、BALB/cマウスリンパ節では、感染後3日をピークにCD8(+)/IFN- γ (+)細胞が急激に増加するが、*plt*マウスリンパ節では、感染後2週間くらいまでCD8(+)/IFN- γ (+)細胞が存在しない。しかし、興味深いことに3週間くらいから*plt*マウスリンパ節に、CD8(+)/IFN- γ (+)細胞が出現する。

【結論】*plt*マウスはBALB/cマウスより、vaccinia virusに対する感受性が高い。このことは、活性化されたvaccinia virus特異的CTLの質的な差ではなく、CCL21とCCL19の発現欠損によってもたらされるCTLの量的な差に起因すると思われる。