

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 $\beta 2$ -マイクログロブリンおよび transforming growth factor- $\beta 1$ ダブルノックアウトマウスの表現型解析

氏名 小林 茂俊

transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) は免疫系のみならず、細胞の分化増殖、細胞外基質など多方面に作用する多機能なサイトカインである。免疫系においては、主に免疫反応を抑制する方向に作用する。炎症細胞の動員、リンパ球の活性化、マクロファージの機能の調節、内皮細胞、単球、リンパ球による接着分子の発現などに関与し、自己免疫や炎症の進行、終結に際し重要な役割をになっていると考えられている。

TGF- $\beta 1$ の機能を解明するため、1992-3年に相次いでジーンターゲット法によって TGF- $\beta 1$ のノックアウトマウス (TGF- $\beta 1^{-/-}$ マウス) が作製された。このマウスはきわめて複雑な病像を示し、最終的には死に至る。TGF- $\beta 1^{-/-}$ マウスの 50%以上は子宮内

死亡するが、死亡せずに出生した場合は、生後 7 日ごろより、MHC クラス I およびクラス II 分子の発現の増大、白血球の血管内皮への接着能の亢進とともに全身の炎症が出現し、特に心、肺、唾液腺、脳への炎症細胞の浸潤をみる。また、血清中の抗核抗体などの自己抗体の増加、腎臓への免疫複合体の沈着などの自己免疫が出現する。さらに、末梢血中の顆粒球や単球が増加し、髄外造血を認めるなど、骨髄球系の造血が亢進する。このマウスにみられる症状が自己免疫疾患にみられる症状と類似していることから、自己免疫疾患の動物モデルとしても有用であると考えられている。

このマウスが呈する複雑な病態にアプローチするために、私は $TGF-\beta 1^{-/-}$ マウスの表現型に關与する因子の中でも、特に MHC クラス I 分子に注目した。前述のように $TGF-\beta 1^{-/-}$ マウスでは MHC クラス I およびクラス II 分子の発現が増大している。この発現量の増加は炎症が始まる前より観察され、 $TGF-\beta 1^{-/-}$ マウスにおける自己免疫と炎症の進展において何らかの役割を果たしていると思われていた。 $TGF-\beta 1$ と MHC クラス II 分子の關係については、 $TGF-\beta 1$ と MHC クラス II 分子のダブルノックアウトマウスにおいて検討され、炎症細胞の浸潤、自己抗体、腎糸球体への免疫複合体の沈着が認められないこと、一方で、進行性の髄外造血、骨髄系細胞の過形成が炎症の欠如にも関わらず認められることが報告されている。今回、私は MHC クラス I 分子の $TGF-\beta 1^{-/-}$ マウスの病態に対する關与を検討するため、MHC クラス I 抗原の発現を欠く $\beta 2$ -マイクログロブリン ($\beta 2M$) のノックアウトマウスと $TGF-\beta 1^{+/-}$ マウス (ヘテロマウス) を交配し、MHC ク

ラス I 分子の発現を欠いた $TGF-\beta 1^{-/-};\beta 2M^{-/-}$ マウス ($TGF-\beta 1^{-/-};\beta 2M^{-/-}$ マウス) を作製した。

本研究では、このダブルノックアウトマウスの生存期間や体重変化の検討、病理学的検討、MHC クラス II mRNA 発現のノーザンブロット法による解析、フローサイトメトリーによるポピュレーションの解析、ELISA 法による血清中の自己抗体の測定、免疫組織染色による腎臓の免疫複合体沈着の検討などを行った。さらに、MHC クラス I 抗原は $CD8^{+}T$ 細胞の正常発生に必要であるためこのマウスでは $CD8^{+}T$ 細胞が欠如しているが、 $CD8^{+}T$ 細胞の $TGF-\beta 1^{-/-}$ マウスの表現型に対する影響を検討するため、抗 $CD8$ 抗体を用いて $TGF-\beta 1^{-/-}$ マウスから $CD8^{+}T$ 細胞を除去し、予後におよぼす影響について検討した。

$TGF-\beta 1^{-/-};\beta 2M^{-/-}$ マウスでは、 $TGF-\beta 1^{-/-}$ マウスに比し症状が軽減し、生存期間が延長した。 $TGF-\beta 1^{-/-}$ マウスは 4 週までに全例が死亡するが、 $TGF-\beta 1^{-/-};\beta 2M^{-/-}$ マウスは 4 週目も多くが生存し、最高 18 週まで生存した。 $TGF-\beta 1^{-/-};\beta 2M^{-/-}$ マウスの各組織での炎症の程度は $TGF-\beta 1^{-/-}$ マウスに比し著明に減弱していたが、この傾向は特に心で強く、Mac-2 抗原陽性のマクロファージの浸潤が著明に減少していた。 $TGF-\beta 1^{-/-};\beta 2M^{-/-}$ マウスでは MHC クラス II 分子の発現も低下しており、全身の炎症反応の低下をさらに裏付ける結果となった。血清中の自己抗体の検出頻度は $TGF-\beta 1^{-/-}$ マウスに比し低く、腎糸球体への免疫複合体沈着の頻度は低下しており、自己免疫反応の減弱もダブルノックアウトマウスの予後が改善される一因であることが示唆された。炎症の軽減にもかかわらず、骨髄系細胞の造血亢進、胸腺での $CD8^{+}T$ 細胞の減少が認められたが、これらは $TGF-\beta 1^{-/-}$ マウ

スにも認められる現象であることから、TGF- β 1 の欠如によるプライマリーな表現型であると思われた。さらに、CD8⁺T 細胞を選択的に除去した TGF- β 1^{-/-}マウスでは臨床症状が軽減し、平均生存期間の延長が認められた。

以上の結果と文献的考察から、MHC クラス I 分子、CD8⁺T 細胞、そして MHC クラス I 分子-CD8⁺T 細胞相互作用が、TGF- β 1^{-/-}マウスにおける主病態である炎症、自己免疫の進展に深く関与していることが示唆された。今後、TGF- β 1 というサイトカインが、特に MHC 分子と関連して自己免疫疾患にいかに関与するかを解析する上で、TGF- β 1^{-/-}; β 2M^{-/-}マウスは貴重なモデルになりえると思われた。