

論文の内容の要旨

論文題目 リンパ球移入による全身性自己免疫疾患動物モデルの樹立と抗核抗体産生機序の解明

指導教員 山本 一彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

神崎 健仁

背景

全身性エリテマトーデスをはじめとする膠原病は、遺伝的素因に環境因子が加わることで自己へのトレランスが破綻して発症すると推測され、抗核抗体出現は膠原病における特徴的現象となっている。また抗核抗体は腎炎など病態形成への関与も指摘されているが、その出現機序には不明な点が多い。

この解析に当たり、MRL/lpr マウスや BWF1 マウス、BXSB マウスなど特殊な遺伝的背景をもつ自然発症ループスマウスモデルが用いられてきたが、発病まで長期間かかること、遺伝的背景を維持する必要があることなど、種々の介入を行うには時間やコストの点で制約があった。非自己物質であるプリスタンの投与で誘導する系もあるが、やはり発病まで時間がかかり、またこの系が模している生理的な現象についても不明である。そのため、早期に高率に高抗体価の IgG タイプの抗核抗体が誘導でき、かつ種々の条件を加えて検討可能な系の確立が望まれる。

近年の研究から、自己免疫性疾患発症に関わる遺伝外因子の一つとして、**homeostatic proliferation** が示唆されている。この現象は、末梢リンパ球減少下で末梢 T 細胞が分裂増殖して減少分を回復しようとする現象で、胸腺機能の低下、ウイルス感染後などのリンパ球減少状態で生理的に作動していると考えられている。自己免疫との関連については、糖尿病モデルマウスである **NOD** マウスや、制御性 T 細胞を除いた **CD4⁺T** 細胞をヌードマウスに移入すると腸炎や甲状腺炎などの種々の臓器特異的自己免疫疾患が生じることなどから明らかにされてきた。

しかし、**homeostatic proliferation** に基づく全身性自己免疫応答についての報告は極めて少ない。**Treg** を除いた **CD4⁺T** 細胞をヌードマウスに移入する系では、一論文の中で抗核抗体の産生について触れられているがその詳細は検討されていない。これとは別に、**TCR β δ** ノックアウトによる T 細胞欠損マウスに T 細胞を移入する系において一過性の弱い抗核抗体産生が報告されているが、移入細胞として B 細胞除去後の脾細胞を用いており、移入 T 細胞のサブセットによる変化は検討していない。これらのことから、移入細胞の条件等を調整することで、高率に早期に長期間持続する高抗体価の **IgG** タイプの抗核抗体を産生するマウスモデルを作成することができると考えた。

目的

リンパ球移入による抗核抗体産生マウスモデルを新たに作製して抗核抗体産生機序を解明することにより、全身性自己免疫性疾患の発症機序につながる知見を得る。

方法

BALB/c マウスの脾臓より **CD4⁺T** 細胞サブセットを分離し、7 週齢の **BALB/c** ヌードマウスに移入した。その後、経時的に採血して抗核抗体価を種々の方法で測定した。また、T 細胞移入 5 日後に脾臓を採取し、**Flow cytometry** や免疫蛍光染色法により発現細胞を評価した。また脾臓の **CD4⁺T** 細胞を表面分子 **PD-1** の発現により分けた後、**PCR** または B 細胞との共培養によりそれぞれの機能解析を行った。

移入細胞変更やレシピエント変更、または各種阻害抗体やオリゴヌクレオチドの投与により種々の条件を設定し、抗核抗体産生に必要な諸因子を同定した。

結果および考察

まず BALB/c マウスの脾臓より CD4⁺CD25⁻T 細胞 (Tc)、CD4⁺CD25⁺ T 細胞 (Treg) を採取し、一方または両者を BALB/c ノードマウスに移入し、その後の経過で採取した血清を用いて抗核抗体産生を蛍光抗体法、免疫沈降法、ELISA 法により評価した。結果、Tc 移入群において移入後 2-3 週間から、全てのマウスに高抗体価の IgG タイプの抗核抗体が産生され、これは 8 週間を超えて長期に維持された。Treg を含む移入群では、その抗体価が明らかに低かった。以上よりノードマウスに Tc を移入する系は、全例に早期より長期間持続する高抗体価の IgG タイプの抗核抗体産生を誘導できるモデルで、誘導時の条件を変更することで抗核抗体産生機序を検討するのに適した系であると考えられた。

次に CD4⁺T 細胞サブセット移入後の脾臓における B 細胞や T 細胞のフェノタイプや局在、その他の細胞の相違を移入後 5 日の早期に検討した。B 細胞については、IgG タイプの抗核抗体が産生されることから germinal center(GC)の形成について検討した。Flow cytometry により特に Tc 群で GL-7⁺Fas⁺CD19⁺ GC B 細胞の増加を認め、組織においても Tc 群において IgD で染色される B 細胞濾胞内に PNA(peanut agglutinin)で標識される GC の形成が認められた。そして GC 内に多数の CD4⁺細胞が、T 細胞領域に多数の形質細胞様樹状細胞(pDC)が存在することが確認された。

GC 形成に関わる T 細胞サブセットとして follicular helper T 細胞(Tfh)が知られており、flow cytometry では CXCR5⁺CXCR4⁺ICOS⁺PD-1⁺CD4⁺T 細胞として同定し得る。今回、GC 形成が顕著であった Tc 移入群で、Tfh の存在について flow cytometry で解析すると、CXCR5⁺CXCR4⁺ICOS⁺PD-1⁺CD4⁺細胞の存在が判明した。同細胞は CXCR5 の発現以外は Tfh と同様のフェノタイプであった。また組織の免疫蛍光染色において PD-1⁺ CD4⁺細胞は GC に存在することが確認された。さらに CXCR5⁺CXCR4⁺ICOS⁺PD-1⁺CD4⁺細胞は、IL-21 を産生することが PCR で判明し、また B 細胞との共培養で、他のサブセットより B 細胞の IgG 産生ヘルパー能が強いことが判明した。以上より、homeostatic proliferation を経た Tc は一部が CXCR5⁺CXCR4⁺ICOS⁺PD-1⁺CD4⁺T 細胞に分化し、GC 内に局在して B 細胞の IgG 産生ヘルパー能を有していることから Tfh と考えられた。

また、Tc 移入後 4 週においても GC B 細胞と Tfh は保たれており、これらの変化が移入早期の一過性の変化でないことが確認された。

次に、本系の抗核抗体産生において重要な諸因子を同定すべく検討を行った。

胸腺由来 T 細胞が存在しないノードマウスの B 細胞と胸腺非依存性 T 細胞に原因がある可能性を否定するため、これらの存在しない RAG2 欠損マウスをレシピエントとして用い、

まず野生型マウス由来 marginal zone B 細胞もしくは follicular B 細胞を移入し、1 週間後に Tc を移入し、さらに 4 週間してから抗核抗体価の測定と脾細胞表面マーカーを解析した。その結果、Tc 移入 1 ヶ月後でも移入 B 細胞サブセットのパターンは保持され、同時に GL-7⁺Fas⁺CD19⁺ GC 細胞や ICOS⁺PD-1⁺CD4⁺細胞が存在し、IgG タイプの抗核抗体が産生されることが判明した。以上より、抗核抗体産生は野生型マウスの脾臓に存在するリンパ球により十分誘導されることが判明した。

次に homeostatic proliferation に由来する抗核抗体産生に CD4⁺ Tc 細胞が必須であるかを、homeostatic proliferation を起こすことが知られている CD8⁺ T 細胞を移入し、検討した。その結果、GC B 細胞の誘導も抗核抗体の産生も Tc のようには促進されないことが明らかとなり、CD4⁺ Tc 細胞の必要性が確認された。

また、homeostatic proliferation では自己親和性の高い T 細胞が増殖反応をきたして自己免疫性疾患を誘導する可能性が指摘されているため、T 細胞の抗原特異性の関与を検討した。非自己抗原であるニワトリ卵白アルブミンに特異的な T 細胞受容体 (TCR) のみを発現する RAG2 欠損 DO11.10 マウス (RagDO マウス) の CD4⁺ T 細胞を移入して抗核抗体の産生を検討した結果、高抗体価の IgG タイプの抗核抗体産生を認めたため、本系では CD4⁺ T 細胞の TCR 特異性は抗核抗体産生に関係しないと考えた。また Tc を移入する本系は移入後 2 ヶ月で腸炎などの臓器特異的自己免疫疾患を発症するが、RagDO マウスの CD4⁺ T 細胞を移入した群では腸炎を発症しなかったため、全身性自己免疫応答である抗核抗体の産生と臓器特異的自己免疫疾患の発症において TCR 特異性の関与が異なると考えた。

次に、ループスモデルマウスにおける抗核抗体産生への TLR7、TLR9 の関与が報告されているため、本系の抗核抗体産生に TLR7 および TLR9 が及ぼす影響を検討した。ヌードマウスへの Tc 移入とともに、TLR 阻害 Phosphorothioate 化オリゴヌクレオチドを投与し、その後の抗核抗体価を測定すると、TLR9 阻害により有意な抗核抗体の産生低下を認めた。TLR7 阻害でも、有意差は認めなかったが同様の低下傾向を認めた。よって、本系でも TLR が抗核抗体産生に対して促進的に関与することが確認された。

ここまでで Tc を移入した本系で Treg の存在と TLR9 の阻害により抗核抗体の産生低下が確認され、また Tc 移入群での pDC の増加も確認された。pDC は TLR7、TLR9 を豊富に発現し、全身性エリテマトーデスにおいて病態に対する深い関与が示唆されていることもふまえて、Tc 移入に対して Treg の存在、TLR9 の阻害、pDC の除去が及ぼす影響を移入後 5 日の脾臓を用いて検討した。その結果、Treg の存在する群、TLR9 阻害群、pDC 除去群い

ずれにおいても GL-7⁺Fas⁺B220⁺細胞の割合が減少したことから、Tc 移入による GC 形成には TLR9 刺激や pDC が関与し、Treg によりこの過程が抑制されると考えられた。また Tc 移入群における Tfh の出現は、Treg の存在と pDC 除去においては明らかな減少を認めた。しかし TLR9 阻害では有意な変化を認めず、Tfh の出現に TLR9 以外の TLR7/8 などが関与している可能性、オリゴヌクレオチドでは完全に阻害できなかった可能性、TLR 刺激が GC 形成には重要だが Tfh 様細胞分化には重要ではない可能性などが考えられた。

免疫蛍光染色でも同様で、Tc 移入によるリンパ濾胞構造の拡大、B 細胞濾胞内への PD-1⁺CD4⁺T 細胞領域の形成拡大、T 細胞領域での pDC の増加といった変化が、Treg の存在、TLR9 阻害、pDC 除去により抑制された。そしてその中で PD-1⁺細胞の減少に関して TLR9 の阻害は効果が弱かった。以上より、GC 形成や Tfh 分化に pDC が大きく関与し、Treg がこの過程を抑制していることが確認できた。

結語

本研究により、Treg を除いた CD4⁺T 細胞の homeostatic proliferation は、全例に移入後 2 週の早期から長期間、高抗体価の IgG タイプの抗核抗体を誘導し、全身性自己免疫寛容破綻の機序を検討するのに適した系であることが判明した。この homeostatic proliferation は germinal center 形成とその内部に局在する CXCR5⁻CXCR4⁺ICOS⁺PD-1⁺Tfh の分化を誘導し、この過程は TLR シグナルの阻害や pDC の除去により抑制されることが判明した。すなわち、生理的に重要な CD4⁺T 細胞の homeostatic proliferation は、Tc による Tfh 様細胞の分化誘導と germinal center 形成とともに抗核抗体誘導という危険を内在しているが、そのリスクを Treg が抑制し、リンパ球系の再構築という生理的機能を果たしていることが本研究により明らかになった。

今後も本系を用いて抗核抗体の産生機序を詳細に検討し、全身性自己免疫疾患発症に関連した遺伝外因子の詳細を解明することにより、新たな治療介入の道が開かれることが期待される。