論文の内容の要旨

応用動物科学専攻
平成 26 年度　博士課程進学
氏名　　大間知 聡子
指導教員名　　松本　芳嗣

論文題目

Involvement of BAFF in development of splenomegaly
during visceral leishmaniasis
（内臓型リーシュマニア症における脾腫形成機序への BAFF の関与）

背景と目的：内臓型リーシュマニア症（VL）はリーシュマニア症の病型の一つで、*Leishmania donovani* や *L. infantum* によって引き起こされる原虫感染症である。VL の主な症状の一つに脾腫が挙げられる。脾腫は免疫応答の異常を示唆する他、膨満感や腹痛の原因にもなりうる症状であるが、VL における脾腫の形成機序は不明である。脾臓は免疫応答を担う細胞が多数存在する組織であるとともに、VL においてはリーシュマニア原虫の増殖の主要な場である。既存の研究から、原虫に対する宿主の免疫応答が原虫感染に対する抵抗性や感受性に関与することが明らかになってきている。宿主の免疫による原虫数の変化の結果として症状の改善・悪化にも影響が出ることはこれまでも報告されてきたが、宿主免疫と症状の直接的な関係についてはあまり研究されてこなかった。VL は慢性感染症であり、T 細胞や B 細胞といった獲得免疫系の細胞が免疫応答に関与すると考えられる。本研究では B 細胞に焦点を当て、脾腫への B 細胞の関与について明らかにすることにした。第 1 章では、血中免疫グロブリン濃度を指標として、VL 患者において B 細胞や抗体を産生する形質細胞（この 2 つを合わせて、以降、B 細胞系列の細胞と表現する）の強い活性化が起きていることを示す。第 2 章では、*L. donovani* 感染マウスにおいて B 細胞系列の細胞の増加が脾腫の主要な原因の一つであることを示す。第 3 章では、宿主に発現が見られる分子である BAFF（B-cell activating factor belonging to the TNF family）に着目する。BAFF は B 細胞の成熟や分化に関わる重要な因子として知られる一方で、B 細胞の活性化の異常に起因する疾患との関連が示唆されている分子である。まず、VL 患者血清中における BAFF 濃度を指

標として、VL における BAFF の関与を示し、さらに、BAFF の欠損が原虫感染に伴う脾腫に与える影響をマウスを用いて解析し、*L. donovani* 感染時の B 細胞系列の細胞の増加を伴う脾腫における BAFF の関与を示す。

第 1 章 : 免疫グロブリンは B 細胞が分化した形質細胞によって主に産生されることから、免疫グロブリン濃度の増加が B 細胞系列の細胞の活性化の指標となりうるが、VL における免疫グロブリンの定量的な解析の報告はほとんどない。本章では、VL 患者における血中免疫グロブリン濃度をクラス別に解析した。方法は、バングラデシュの VL 患者および健常人の血漿、ブラジルの VL 患者、シャーガス病患者および健常人の血清を用いて、IgG、IgM、IgA の濃度を ELISA 法によって測定した。両地域で VL 患者において IgG 濃度が健常人に比べて有意に高く、バングラデシュで 91%、ブラジルで 75%の患者が健常人の平均+3SD 以上の高い値を示した。IgM 濃度については、両地域とも患者と健常人で有意差がなく、IgA 濃度については、両地域とも患者より健常人の方が有意に高かった。また、免疫グロブリン濃度の顕著な増加はシャーガス病患者においては見られなかった。シャーガス病は VL と同じく原虫感染症であり、原虫抗原特異的な抗体の産生は見られることが過去に報告されているが、患者で免疫グロブリン濃度の有意な増加は見られなかった。一方で、VL 患者においては血中免疫グロブリン濃度の異常な高値が示されたことから、VL において B 細胞系列の細胞が強く活性化されることが示唆された。VL 患者における免疫グロブリンの産生は特に IgG の増加が顕著であることから、IgG へのクラススイッチを特に促進するようなシグナルの関与が考えられた。

第 2 章 : VL において脾腫は頻発の症状である。脾臓は最も大きい二次リンパ器官であり、VL においては原虫増殖の場でもある。脾腫の一因としては、脾臓を構成する細胞数の増加が考えられる。第 1 章の結果から、VL における B 細胞系列の細胞の強い活性化が示唆されたことから、脾臓におけるそれらの細胞の動態に着目した。本章では、*L. donovani* 感染マウスにおいて B 細胞系列の細胞の数の増加が脾腫に寄与することを示すことを目的とした。VL を引き起こす原虫種である *L. donovani* を感受性の BALB/cA マウスに 1×10^7 ずつ尾静脈より接種し、感染 12 週後と 24 週後に剖検した。血清中の IgM、IgG、IgA の濃度の ELISA 法による測定、脾臓重量の測定、切片の HE 染色・免疫染色、脾細胞のフローサイトメトリーによる解析を行った。免疫グロブリン濃度は、測定した全てのクラスで増加したが、増加率、増加量、濃度の値ともに IgG が最も顕著であり、VL 患者で見られた IgG を主成分とする高免疫グロブリン血症がマウスにおいても見られた。感染後、脾臓重量は顕著に増加した。脾臓切片の HE 染色像から、白脾髄領域・赤脾髄領域ともに顕著な拡大が観察された。白脾髄においてはリンパ球様の細胞の増加が見られ、赤脾髄においては原虫貪食マクロファージの増加が見られた。また、脾臓切片における免疫染色により IgG 産生形質細胞を検出したところ、非感染時にはほとんど見られないのに対し、感染時には T 細胞領域に隣接した赤脾髄領域にそれらの細胞の領域が観察された。さらに、フローサイ

トメトリーによる解析から、感染後に総脾細胞数が増加し、また、CD19（B 細胞マーカー）陽性細胞数が顕著に増加した。以上の結果から、*L. donovani* 感染マウスにおいて B 細胞系列の細胞の増加が脾腫に寄与することが明らかとなった。

第 3 章：BAFF は B 細胞の活性化の異常に起因する疾患との関連が示唆されているが、VL への関与については報告が無い。第 1 章、第 2 章から、VL における B 細胞系列の細胞の強い活性化と、*L. donovani* 感染マウスにおける B 細胞系列の細胞の増加を伴う脾腫が明らかになったことから、本章では BAFF がその機序に関与することを示すことを目的とした。まず、バングラデシュとブラジルの VL 患者と健常人における血清あるいは血漿中の BAFF 濃度を ELISA 法により測定したところ、両地域とも VL 患者において健常人と比べて有意に高い値を示したことから、VL への BAFF の関与が示唆された。次に、第 2 章に示した方法でマウスに感染実験を行い、血清 BAFF 濃度を測定したところ、血清 BAFF 濃度は感染後に顕著に増加した。そこで、BAFF の脾腫への影響を調べるため、BAFF ノックアウトマウス（KO マウス）を作製し、感染実験を行った。感染 24 週後の脾臓重量は野生型マウスに比べて KO マウスで有意に低かった。また、フローサイトメトリーによる解析から、野生型マウスで見られる脾細胞における CD19 陽性細胞数の増加が KO マウスでは見られなかった。また、脾臓切片の免疫染色像からも、B220（B 細胞マーカー）陽性細胞や CD138（形質細胞マーカー）陽性細胞の増加は KO マウスでは見られなかった。IgG 濃度の顕著な増加も KO マウスでは見られなかった。一方、原虫の主要な増殖の場である脾臓と肝臓について押捺標本における原虫数の測定を行ったところ、KO マウスでは野生型マウスと比べて脾臓では同程度、肝臓では有意に多い原虫数を示した。以上の結果から、BAFF が VL の脾腫形成における B 細胞系列の細胞の増加を引き起こす主要な因子であることが明らかになった。

考察：本研究により、*L. donovani* 感染マウスにおける脾腫において、B 細胞系列の細胞の増加が主要な原因であること、また、BAFF がその増加を引き起こす主要な因子であることが明らかになった。BAFF は原虫数の増加を介してではなく、脾腫を促進させていると考えられる。ヒトの VL においても BAFF が関与していることが示されたこと、また、B 細胞系列の細胞の強い活性化が示されたことから、同様の機序が VL 患者の脾腫形成においても起きている可能性がある。マウスを用いた実験では *L. donovani* を用いたが、VL 患者における血中 BAFF 濃度の増加や IgG 濃度の増加は *L. donovani* が主要な原虫種であるバングラデシュだけでなく *L. infantum* が主要な原虫種であるブラジルにおいても見られたことから、*L. infantum* の感染においても脾腫形成において同様の機序があることが示唆される。さらに、本研究の成果から、宿主免疫系の分子を標的にして症状を緩和することが可能であることが示唆された。