

博士論文

論文題目 全身性自己免疫マウスモデルにおける自己抗体産生
に対するT細胞の役割と腸内細菌の関与

氏名 江里 俊樹

目次

	頁
要旨	1
序文	2
方法	7
第 1 章 リンパ球移入による全身性自己免疫モデルマウスを用いた抗核抗体産生機序の解析	
結果	17
考察	25
第 2 章 Lymphopenia-induced Autoimmunity における自己抗体産生に対する腸内細菌の果たす重要な役割	
結果	27
考察	31
第 3 章 総括と展望	35
謝辞	37
参考文献	38
図・表	46

要旨

膠原病などの全身性自己免疫疾患においては、抗核抗体を始めとする自己抗体産生が病態に深く関わっている。リンパ球減少下における末梢 T リンパ球の生理的増殖反応である Lymphopenia-induced proliferation (LIP) と自己免疫疾患の関与が知られている。本研究においては、ヌードマウスへ $CD4^+CD25^-$ T 細胞を移入する系の自己抗体産生モデルとしての有用性を示し、この系における LIP を介した T_{FH} 細胞の誘導、LIP- T_{FH} による GC 形成と自己抗体産生誘導、制御性 T 細胞による制御機構を明らかにし、さらに抗生剤を用いて腸内細菌を滅菌することによりこの経路における腸内細菌の重要性を示した。さらに古典的ループスモデルマウスにおいても腸内細菌の除去が疾患を抑制することを明らかにした。

序文

全身性エリテマトーデス (SLE) を始めとするさまざまな全身性自己免疫疾患において、抗核抗体を含む自己抗体が観察されることは広く知られている[1]。抗核抗体そのものが病原性を持っているのか、または単に自己免疫疾患発症の結果として産生されているのかは明らかではないが、全身性自己免疫疾患の診断には非常に有用であり、幾つもの疾患の分類基準にも抗核抗体所見は採用されている。また、自己免疫疾患の発症以前から自己抗体が出現し、発症前に更に抗体価が上昇する例[2]や、他の自己抗体に進展する例があることが知られており、これらのことから自己抗体が少なくとも病因に密接に関わっていることは間違いない。一方、臓器特異的自己免疫疾患では、重症筋無力症や自己免疫性溶血性貧血、特発性血小板減少性紫斑病、Basedow 病など多くの疾患で、自己抗体が直接、病態形成に関わっていることが明らかとなっている。従って、自己抗体産生機序を解明することは、さまざまな自己免疫疾患の病態解明に重要であり、新たな治療法開発にも通ずるものと考えられる。

従来、全身性自己免疫を研究するためのマウスモデルは、自然発症ループスモデルマウスと非生体物質の投与による誘導モデルの二つに大別されてきた。しかし、自然発症ループスモデルマウスとして知られている MRL/lpr マウスや NZB/WF1 マウス、BXSb マウスは[3]、いずれも発症まで 3-6 か月かかることや

特殊な遺伝的背景を維持する必要があることが問題であり、また誘導モデルとして用いられる pristane[4]や水銀投与の系も、発症に時間がかかる点、非生体物質の投与の生理的意義などに問題点があった。自己抗体産生の機序解明のためには、早期に効率的に抗核抗体を産生し、種々の条件下で全身性自己免疫を検討できる誘導マウスモデルの確立が望まれてきた。

ところで、生体におけるリンパ球減少は生理的にはウイルス感染や胸腺機能低下によって生ずるが、SLE やシェーグレン症候群、混合性結合組織病などの膠原病で認められる所見の一つでもある。リンパ球減少時には、末梢の T 細胞が生理的に分裂増殖し恒常性を保つ homeostatic proliferation という現象が生ずる [5, 6]。自己免疫の遺伝的バックグラウンドを持った個体において、この lymphopenia-induced proliferation (LIP) を繰り返すことで自己に高い親和性を持った T 細胞が末梢で増殖、活性化することが、自己免疫疾患発症の引き金となる可能性が提唱されている [7]。LIP と自己免疫疾患発症との関連は、ヒトでは SLE [8] のほか、関節リウマチ [9]、多発性硬化症 [10]、マウスでは 1 型糖尿病モデルである NOD マウス [11] において報告されている。関節リウマチでは早期に胸腺機能が低下し新たな T 細胞の産生が減少していくことから、常に homeostatic proliferation の圧力が生じていると考えられている [9]。また、リンパ球減少もしくは欠損マウスに T 細胞を移入し自己免疫を誘導する lymphopenic mouse transfer

model の一つとして、胸腺を欠いたヌードマウスに制御性 T 細胞 (regulatory T cell; Treg) を欠く $CD4^+CD25^-$ 細胞を移入する系は、胃炎や甲状腺炎、唾液腺炎、関節炎、腎炎などを発症することが報告されている[12]。本研究は、従来から臓器特異的自己免疫モデルとして知られていた lymphopenic mouse transfer model に着目し、全身性自己免疫モデルとしても優れていることを確認したうえで、自己抗体産生機序を検討した。

$CD4^+$ T 細胞の LIP は、分裂が遅く IL-7 依存性の、狭義の”homeostatic proliferation”と、分裂が速くエフェクター細胞に分化しうる IL-7 非依存性の”rapid spontaneous proliferation”に分けられる[13, 14]。特に後者は腸内細菌との関連が示唆されており、樹状細胞が腸内細菌からのシグナルを受け、IL-6 存在下に $CD4^+$ T 細胞の LIP を誘導することが報告されている[15, 16]。本研究でも lymphopenic mouse transfer model で”rapid spontaneous proliferation”が重要な役割を担っていることを確認したことから、腸内細菌の移入 T 細胞への影響および自己抗体との関連を明らかにすることを試みた。

これまでも、腸内細菌と自己免疫疾患との関連は、主にマウスモデルを用いて幾つかの例で示されてきた[17]。例えば、自己免疫疾患モデルマウスを germ-free (GF) 下で生育しその影響を検討した報告では、炎症性腸疾患モデル [18-20]や関節炎モデル (K/BxN) マウス[21]で、疾患活動性の改善が認められて

いる。一方、1型糖尿病モデルである NOD マウスでは疾患活動性が悪化することから[22]、腸内細菌には疾患に対し促進的に働くものと抑制的に働くものがあることが示されている。これまで MRL/lpr マウスでは GF でも疾患活動性は変化しないため腸内細菌の関与は考えにくいと報告されているが[23]、疾患促進的細菌、抑制的細菌の存在、または両者のバランスという観点から、従来の報告では腸内細菌が全身性自己免疫発症に関与していることは否定できない。従って、本実験では、上記のマウスモデルにおいて GF ではなく抗生剤による腸管滅菌を行うことによって腸内細菌の影響を検討した。

生体がどのように腸内細菌を認識するかという点については、toll-like receptor (TLR) を介した細菌抗原の認識が重要であることが、複数の研究で報告されている[24]。また TLR が全身性自己免疫疾患において病態と深く関わっていることも確認されている[25]。従って、本研究においても TLR 欠損マウスを用いて、腸内細菌が自己免疫を誘導する経路における TLR の果たす役割についても検討した。

さらに、MRL/lpr、BXSB、NZB/WF1 マウス等の他の自然発症ループスモデルマウスでも、リンパ球減少を呈することが知られていることから[3]、本系で示された腸内細菌と関連する自己抗体産生経路とオーバーラップした経路が存在している可能性を考え、同様の腸管滅菌を行って自己抗体産生への影響を検討

した。

本研究は、lymphopenic mouse transfer model の解析を通して、 $CD4^+$ T 細胞はリンパ球減少下に腸内細菌からのシグナルを受け、rapid spontaneous proliferation を行うとともに濾胞ヘルパーT細胞 (follicular helper T cells; T_{FH}) に分化し自己抗体産生を促すことを見出した。また、rapid spontaneous proliferation に重要な関連分子の役割についても明らかにした。さらに、他のループスモデルマウスでも自己免疫の惹起に本系と共通する経路がある可能性を考え、同様に腸内細菌の関与を検討した。

方法

マウス

6-7週齢のメスのBALB/cマウスと6-7週齢のメスのBALB/cヌードマウス、6週齢のメスMRL-lpr/lprマウス、6週齢のメスのNZBW/F1マウス、7週齢のオスのBXSbマウスを日本SLC社より購入した。Rag-2欠損BALB/cマウスはTaconic Farms社 (Germantown, NY) より購入した。TCR α 鎖欠損BALB/cマウスとDO11.10トランスジェニックBALB/cマウスは九州大学生体防御医学研究所の渡辺武教授より提供を受けた。Scurfy C57BL/6マウスとThy1.1 BALB/cマウスはThe Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine) より購入した。Scurfy BALB/cマウスはScurfy C57BL/6マウスとBALB/Cマウスを6世代以上交配させて作製した。TLR 7欠損およびTLR9欠損BALB/cマウスはオリエンタルバイオサービス社より購入し、TCR α 鎖欠損BALB/cマウスと交配してTCR α 鎖欠損TLR7欠損BALB/cマウスおよびTCR α 鎖欠損TLR9欠損BALB/cマウスを作製した。

Ld-nOVAトランスジェニックマウスは、Ld class Iプロモーター、ヒトE μ エンハンサー下に核移行シグナルを付加したニワトリ卵白アルブミン(OVA)を組み込んだベクターを用いて、当研究室にて作成された[26]。Ld-nOVA BALB/cマウスは、Ld-nOVA C57BL/6マウスとBALB/cマウスを8世代以上交配して作製した。

すべてのマウスはSpecific Pathogen Free環境で飼育され、7-8週の週齢で実験に

使用した。すべての実験は東京大学第二種使用等拡散防止措置（部局承認番号 76-2）および動物実験計画（承認番号 医-P10-120）において承認を受け、東京大学のガイドラインに基づいて行った。

T細胞の分離

移入のための T 細胞は、Miltenyi Biotec 社の MACS システムを用いて分離した。マウスの脾臓を採取し、70 μm セルストレイナー (BD Bioscience, San Jose, CA) を用いて単細胞にしたのち、ACK バッファーまたは赤血球溶解バッファー (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO) により溶血し、single cell suspension とした。

野生型マウスからの CD4^+ T 細胞の分離では、この細胞をビオチン結合の抗 CD19 (6D5)、抗 CD8a (53-6.7)、抗 CD11b (M1/70)、抗 CD49b (DX5)、抗 $\text{I-A}^{\text{b/d}}$ (25-9-17)、抗 Ly-6G/Ly-6C (Gr-1: RB6-8C5) の各抗体と反応させ、洗浄後に streptavidin-conjugated microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を結合させたのち、これを MACS システム (Miltenyi Biotec) の LD カラムを用いてネガティブセレクションを行い分離した。最初の抗体反応時のビオチン結合抗 CD25 抗体 (7D4) の有無により、 $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ T 細胞または CD4^+ T 細胞を選択した。 $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ T 細胞は、上述の方法で CD4^+ T 細胞を回収したのち、PE 結合抗 CD25 抗体と反応させ、anti-PE microbeads と反応後に MS カラムを用いて

ポジティブセレクションを行い分離した。

Rag2 欠損 DO11.10 マウスからの CD4⁺ T 細胞の分離は、脾臓の single cell suspension をビオチン結合抗 CD4 抗体 (GK1.5) と反応させ、洗浄後に streptavidin-conjugated microbeads と結合させたのち、MACS システムの LS カラムを用いてポジティブセレクションを行った。

T 細胞の移入

前述の方法により分離した CD4⁺ T 細胞を $2.5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 個/匹、ヌードマウスまたは TCR α 鎖欠損マウスに腹腔内注射にて移入した。いくつかの実験では CD4⁺CD25⁻ T 細胞に対し移入前に carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) でラベルした[13]。CFSE 染色は、細胞を 5 μ M CFSE 1ml と 37°C で 10 分間反応させたのち、4°C PBS で反応停止した。

蛍光抗体法による抗核抗体の検出

抗核抗体の検出には、フルオロ HEPANA Test Kit (Medical and Biological Laboratories, Nagoya, Japan) 内の HEp-2 細胞基質スライドを用いた。PBS を用いてマウス血清を 40、80、160、320、640、1280、2560、5120 倍に段階希釈し、基質スライドの各 well に 40 μ l ずつ 30 分間反応させた。その後 PBS で洗浄し、

二次抗体として 2 $\mu\text{g/ml}$ に希釈した抗 mouse IgG-Alexa 488 抗体 (Jackson immunoResearch) を 40 μl ずつ遮光下で 30 分間反応させた。反応後に PBS で洗浄し、蛍光顕微鏡で観察した。

IgG、IgMと各種特異抗体のELISAによる測定

マウス血清のIgG、IgMの測定はmouse-IgG and IgM ELISA quantitation kit (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX) を、抗Sm抗体と、抗U1A抗体、抗68K抗体の測定にはScipac社の抗原蛋白を用いた。0.03 M carbonate buffer (pH 9.6)で100倍に希釈したgoat anti-mouse IgG/IgM Fc affinity purified antibody、または0.03M carbonate buffer (pH 9.6)で4 $\mu\text{g/ml}$ に希釈した各種抗原蛋白を50 μl ずつ96-well plates (Immulon4; Dynatech, Chantilly, VA) に分注し、4°Cで一晩静置して固相化した。洗浄後に1% BSA-0.05% Tween20-PBSで2時間ブロッキングし、50倍に希釈したマウス血清50 $\mu\text{l/well}$ を常温で1時間反応させた。二次抗体として3000倍に希釈したHRP結合抗mouse IgG 抗体 (Zymed Laboratories, San Francisco, CA) を用い、3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (Kirkegaard& Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) で発色させ、リン酸で発色を止めた後、波長450 nmで吸光度を測定した。標準血清として、各種抗核抗体が高値を示した特定のマウス血清を用いて arbitrary unitを設定した。

その他の特異抗体の検出には、抗nucleosome 抗体、抗ds-DNA抗体、抗histone 抗体、抗胃壁抗体のそれぞれのAg-specific ELISA Kit (Orgentec, Mainz, Germany, respectively) およびANA combi-kit (Orgentec) を用いた。100倍に希釈したマウス血清100 μ l/wellを常温で1時間反応させ、二次抗体以降は上記の方法と同様に実験を行った。抗ds-DNA抗体出現率の比較においては、OD値0.4以上または arbitrary unitを用いた抗体価3000 U以上を陽性と判定した。

KLH免疫

古典的follicular helper T細胞 (T_{FH}) を誘導するため、Keyhole limper hemocyanin (KLH, 500 μ g/ml) を含むCFA乳化液200 μ lずつを、BALB/cマウスの尾根部および足底に注射して免疫した。免疫後7日目で解析に用いた。

Flow cytometry

表面分子の染色は、細胞を4°Cに保ちつつ染色を行った。反応時のバッファーは3% bovine serum albumin, 0.05%NaN₃-PBSを用いた。抗体添加後30分で洗浄し測定した。細胞内染色は表面分子染色後、4°Cに維持し、PE Anti-Mouse Foxp3 staining set (eBioscience) のプロトコルに従い、Fixation/Permeabilization working solution (eBioscience) に暗所にて45分間反応させた後、10倍希釈した

Permeabilization Buffer (eBioscience) で洗浄し、その後Foxp3などの転写因子に対する各抗体で染色を行った。サイトカイン染色は、PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate)、ionomycin、BDGolgiPlug™ containing brefeldin Aからなるleukocyte activation cocktail (BD Biosciences) で、分離した細胞を4時間以上刺激培養した後、表面分子染色後に室温にてIntracellular Fixation Buffer (eBioscience) で20分反応させ、その後10倍希釈のPermeabilization Bufferで洗浄し、各サイトカインに対する抗体で染色を行った。使用した抗体は以下の通りである(括弧内はクローン)。

FITC 標識抗マウス抗体 : BD Biosciences: B220 (RA3-6B2), CD4 (GK1.5, L3T4), CD8a (53-6.7), CXCR5 (2G8) 、 BioLegend: CD90.1 (Thy1.1) (OX-7)

Alexa Fluor 488 標識抗マウス抗体 : eBioscience: GL7 (T and B cell activation marker) (GL-7), Foxp3 (FJK-16s)、 AbD Serotec : PD1 (RMP1-30)

PE 標識抗マウス抗体 : BD Biosciences: CXCR5 (2G8)、 BioLegend: ICOS (15F9), PD-1 (29F.1A12), CD200 (OX-90)、 eBioscience: IL21 (mhalx21)

TC (PE/Cy5)標識抗マウス抗体 : BioLegend: CD45R/B220 (RA3-6B2), CD90.2 (30-H12)、 eBioscience: CD4 (GF1.5)

PerCP/Cy5.5 標識抗マウス抗体 : BioLegend: CD90.1 (OX-7)

Biotin 化抗マウス抗体 : BD Biosciences: CD8a (53-6.7), CD 19 (1D3), Fas (Jo2)、 BioLegend: CD4 (RM4-5), CD25 (PC61), CD 200 (OX-90)

組織の蛍光免疫染色

マウスの脾臓をOCTコンパウンド（サクラファインテック、日本）に包埋したのち、液体窒素で急速に凍結した。これを薄切しアセトンで固定した。Protein Block serum-free (Dako, Real carpinteria, CA) と10分ほど反応させた後、一次抗体をAntibody Diluent with Background Reducing Components (Dako) で5 μ g/mlに希釈し室温で1時間反応させた。PBSで洗浄後、Dylight488またはDylight594標識2次抗体 (Jackson laboratories, Baltimore, PA) を250倍に希釈し反応させた。二重染色では二次抗体の蛍光色を変えて同様の過程をもう一度行った。その後、Vectashield (Vector laboratories, Burlingame, CA) を用いて封入し、蛍光顕微鏡で観察した。

Thy1.1の染色には、一次抗体としてビオチン化抗Thy1.1 (OX-7) 抗体 (AbD Serotec) を、二次抗体としてStreptavidin Alexa 488 (Life Technologies, Carlsbad, CA) を用いた。その他の抗体は、抗CD4 (GK1.5) 抗体、抗Ig-D (11-26c.2a) 抗体、抗PD-1 (RMP1-30) 抗体、Rhodamine labeled PNA (Vector laboratories) を使用した。

RT-PCR

リンパ球サブセットを分離した後、RNeasy mini kit (QIAGEN, Valencia, CA) を用いてRNAを精製し、SuperScriptTM III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いてプロトコルに従ってcDNAを作成した。PCRではPrimerとして

GAPDH-forward, 5'-GAAGGTCGGTGTGAACGGA-3'

GAPDH-reverse, 5'-GTTAGTGGGGTCTCGCTCCT-3'

Bcl6-forward, 5'-GCCCCACTGACCCGAAAGCC-3'

Bcl6-reverse, 5'-GCCTGCCAGGGACCTGTTTAC-3'

IL-21-forward, 5'-ATCCTGAACTTCTATCAGCTCCAC-3'

IL-21-reverse, 5'-GCATTTAGCTATGTGCTTCTGTTTC-3' [36]

を用い、denature : 94°C30秒、annealing : 61°C30秒、elongation : 72°C45秒を1 cycle
としたPCRを行った。

共培養

Tc移入ヌードマウスの脾細胞からFITC結合抗CD4抗体とAnti-FITC MultiSort Kit (Miltenyi Biotec) を用いてCD4⁺細胞をポジティブセレクションし、このCD4⁺細胞からMicrobeadsを切り離したのち、抗PD1抗体とMACSシステムポジティブセレクションカラムを用いてCD4⁺PD1⁺T細胞とCD4⁺PD1⁻T細胞を分離した。抗CD19 (1D3) 抗体を用いてMACSシステムでB細胞を分離し、96well-round bottomプレートに10%FCS-RPMIを培養液として用いて、各wellにB細胞2×10⁵個、T細胞2×10⁴個を混合して培養した。T細胞の刺激は、プレートに10 µg/mlに希釈した抗CD3抗体を4°Cで一晩定着させた後、培養液中に5 µg/mlの抗CD28抗体を加えた。

5 µg/mlの抗ICOS抗体 (7E.17G9; BioLegend, San Diego, CA)、10 µg/mlの抗IL-21抗体 (R&D systems, Minneapolis, MN) で抑制を行い、培養96時間後に上清を回収し、IgGの測定を行った。

Pristane投与マウスの作成

6週齢で日本SLC社から購入したBALB/c 野生型マウスに対し、7週齢の時点で、pristane 500µl/匹を腹腔内注射にて投与した。

マウスの腸管滅菌

以下の5種の広域抗生剤の組み合わせをマウスの飲み水に溶解して投与し、腸管滅菌を行った。Ciprofloxacin (CPFX, Sigma社)、Imipenem (IPM, MSD社)、Metronidazole (MTZ, Sigma社)、Vancomycin (VCM, Sigma社) ; 各250 mg/L、Amphotericin B (AMB, ブリストルマイヤーズ社) ; 5 mg/L。抗生剤の選択は過去のマウスの腸管滅菌を行った報告を参考にした[27, 28]。いずれのマウスも搬入時より抗生剤投与を開始し、生存中は投与を継続した。ヌードマウスに対するT細胞移入、野生型マウスに対するPristane投与は、抗生剤投与開始から10日後に行った。

腸炎の検討

T細胞移入ヌードマウスの体重測定を行った。また移入後8週の時点での大腸を摘出し、10%中性ホルマリン固定を行ったうえで、バイオ病理研究所にHE染色のスライド作製を依頼した。

統計的解析

抗体価の2群間の有意差はStudent's t-testを使用して検定を行った。自己抗体出現率の2群間の有意差はFisher's exact testを使用して検定を行った。全ての分析で p 値 <0.05 を有意差ありと判定した。

第1章 リンパ球移入による全身性自己免疫モデルマウスを用いた抗核抗体産生機序の解析

ヌードマウスに野生型マウス由来の $CD4^+$ T 細胞を移入することでリンパ球減少下の *homeostatic proliferation* を起こさせるモデルは、さまざまな臓器特異的自己免疫疾患を発症する。このモデルにおける抗核抗体産生に着目し、*germinal center* 形成、 T_{FH} の分化、TCR 特異性といった観点から、抗体産生機序における T 細胞の役割について解析した。

結果

$CD4^+CD25^-$ T 細胞移入ヌードマウスによる臓器障害と抗核抗体の産生

BALB/c 野生型マウスの脾細胞より、 $CD4^+CD25^-$ T 細胞 (Tc: conventional T 細胞)、 $CD4^+CD25^+$ T 細胞 (Treg: regulatory T 細胞)、 $CD4^+$ T 細胞 (Tc+Treg) を分離してそれぞれ 7 週齢の BALB/c ヌードマウスへ移入した。 $CD4^+CD25^+$ T 細胞における *Foxp3* の陽性率は 96% であった。

Tc 移入群では移入後 2 か月で胃炎、腸炎、唾液腺炎などの発症が見られた。次にレシピエントの血清の解析を行った。Tc 移入群では Treg もしくは Tc+Treg を移入した群に比べ、ELISA にて総 IgM と総 IgG の産生増加が 4 週目までに見

られた (図 1A)。特に IgG の上昇が顕著で、クラススイッチの亢進を認めた。蛍光抗体法による抗核抗体の評価では、多様な型の IgG 型抗核抗体産生を移入後 2 週から認めたが、その中で特に homogenous pattern が 90% 以上を占めており、次に homogenous & speckled pattern が多く見られた (図 1B)。抗核抗体の陽性率は、Tc 移入群では移入後 2 週以降において 100% であった。いずれの群でも抗核抗体産生は見られたが、移入後 3 週における homogenous pattern の抗核抗体価は、Tc 移入群で有意に高値であった (図 1C)。また ELISA にて、抗 ds-DNA、抗 nucleosome、抗 Sm、抗 U1-68K 抗体などのヒトの自己免疫疾患で見られる特異抗体の上昇が、Tc 移入群では 4 週以内に見られた (図 1D)。この LIP の系は早期に高率に高抗体価の IgG 型の抗核抗体が産生されることから、全身性自己免疫マウスモデルとして有用であること、および Treg により LIP における異常な B 細胞応答が抑制されていることが示された。

Tc 移入ヌードマウスにおける germinal center の形成と GC 内への CD4⁺細胞の局在

Tc 移入レシピエントマウスではクラススイッチが促進されていることから、germinal center (GC) の形成が予想された。Tc 移入 5 日目の脾臓の組織学的検討を行ったところ、IgD 陽性濾胞 B 細胞に囲まれて、peanut agglutinin (PNA) で染

まる GC の形成が見られた (図 2A)。さらに GC 内に CD4⁺細胞の侵入が認められたことから、移入した Tc がレシピエントにおける GC 形成を誘導する follicular helper T (T_{FH}) 細胞に分化した可能性を考え、T_{FH} の表面マーカーの一つとして知られる PD-1[29]の発現を免疫染色によって確認した。その結果、CD4⁺細胞の一部はPD-1を発現しており、その細胞はGC内に局在することがわかった(図2A)。この結果から、本系では移入された Tc が LIP を経て T_{FH} に分化し、GC が形成される可能性が示唆された。

移入された Tc 細胞の LIP と CXCR5^{low}ICOS⁺PD-1⁺CD200⁺CD4⁺ T 細胞への分化

さらに移入 T 細胞の T_{FH} 表面マーカーの発現およびレシピエントにおける GC-B 細胞の出現を検討するため、T 細胞移入から 5 日目のレシピエントマウスの脾臓における T 細胞と B 細胞の phenotype を flow cytometry により検討した。一般に T_{FH} は PD-1[29]、ICOS[30]、CD200[31]、CXCR5[32, 33]等を表面マーカーとして持つこと、また GC-B 細胞は GL7⁺Fas⁺B220⁺細胞として認識されることが知られている[34, 35]。Tc の移入では、Tc+Treg を移入した群に比べ、PD-1⁺ICOS⁺CD200⁺CD4⁺細胞が多く見られ (図 2B、2D)、また GL7⁺Fas⁺B220⁺細胞も Tc+Treg 移入群に比して Tc 移入群で多く見られた (図 2C)。すなわち、Treg の非存在下では Tc 移入により PD-1⁺ICOS⁺ CD200⁺CD4⁺細胞および GC-B 細胞が多く産生さ

れることが示された。

さらに移入された Tc が homeostatic proliferation を経て分化することを確認するため、移入前の Tc に対し CFSE 染色を行い、移入後 5 日目のレシピエント脾臓における CD4⁺細胞の細胞分裂を解析したところ、早期に分裂して CFSE が低下した細胞群が PD-1 を発現していることが分かった (図 3A)。

一方、ヌードマウスにおいては胸腺由来の T 細胞は欠損しているが、胸腺外発育 CD4⁺T 細胞は存在することが知られている[36]ことから、この PD-1⁺ICOS⁺CD200⁺CD4⁺細胞群がレシピエントの胸腺外発育 T 細胞由来ではなく、移入 Tc 由来であることを示すために、Thy1.1⁺BALB/c 野生型マウス由来の Tc を Thy1.2⁺ヌードマウスに移入する実験を行った。移入後 5 日目の脾臓の flow cytometry では移入された Thy1.1⁺CD4⁺細胞が ICOS を発現していること、組織の蛍光染色では、Thy1.1⁺細胞が GC 内に局在していることが示された (図 3B、3C)。一方、古典的な T_{FH} の表面マーカーである CXCR5 については、移入された Thy1.1⁺CD4⁺細胞では KLH 免疫マウスにおいて産生される T_{FH} と比較して、高い発現が見られなかった (図 3B)。

以上より、移入された Tc 細胞は急速な LIP を経て、CXCR5^{low}ICOS⁺PD-1⁺CD200⁺CD4⁺T 細胞に分化することが示された。

CXCR5^{low}ICOS⁺PD-1⁺CD200⁺CD4⁺T 細胞の機能解析

Tc 移入ヌードマウスにおける CXCR5^{low}ICOS⁺PD-1⁺CD200⁺CD4⁺T 細胞が、実際に T_{FH} としての機能を持つかどうかの解析を行った。T_{FH} 機能は GC 形成とクラススイッチを起こした IgG の産生を誘導すること、転写因子として Bcl-6 を発現すること[37-39]、B 細胞の affinity maturation に寄与するサイトカインである IL-21 を産生すること[40, 41]、によって特徴づけられる。RT-PCR では Tc 移入レシピエントの PD-1⁺CD4⁺細胞による Bcl-6 と IL-21 の mRNA 発現が認められた (図 4A)。PD-1⁺ICOS⁺CD4⁺細胞における IL-21 の発現は、flow cytometry でも認められた (図 4B)。この PD-1⁺CD4⁺細胞を抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で刺激し B 細胞と共培養を行ったところ、PD-1⁻CD4⁺細胞で同様の実験を行った場合に比べて、B 細胞に対する高い IgG 産生誘導作用が認められた (図 4C)。ICOS または IL-21 に対する阻害抗体によりいずれかを阻害すると IgG 産生誘導能は低下し、両者を阻害するとさらに相加的な低下が見られたが、完全には阻害されなかった (図 4D)。

以上より、LIP で誘導される CXCR5^{low}ICOS⁺PD-1⁺CD200⁺CD4⁺T 細胞は、転写因子、機能において T_{FH} としての特徴を有しており、B 細胞に対する IgG 産生誘導能には ICOS および IL-21 が部分的に関与していることが判明した。以下これらの細胞を LIP-T_{FH} と名付ける。

TCR 特異性の抗核抗体産生と臓器特異的自己免疫疾患発症への寄与の検討

LIP-T_{FH} の産生機序をさらに明らかにするために、移入される CD4⁺ T 細胞の TCR 特異性が LIP-T_{FH} への分化に及ぼす影響について検討した。Rag2 欠損 DO11.10 マウス (RagDO) は全ての CD4⁺ T 細胞がニワトリ卵白アルブミン(OVA) 反応性の単一 TCR を有するマウスであり、内在性制御性 T 細胞 (naturally occurring regulatory T cell; nTreg) を有しないことが以前当教室より報告されている[42]。RagDO マウスから CD4⁺細胞を分離しヌードマウスに移入したところ、急速な細胞分裂と PD-1⁺ T_{FH} 細胞への分化 (図 5A)、移入細胞の GC 内への局在が観察され (図 5B)、野生型マウス由来 Tc 移入群と同等に高力価の抗核抗体産生が見られた (図 6A)。すなわち、LIP-T_{FH} への分化および抗核抗体産生に対しては、TCR 特異性は寄与しないと考えられた。一方、もともとヌードマウスへ Tc を移入する本系では移入後 2 か月程度で胃炎や腸炎などの臓器特異的自己免疫が生じることが知られている[12]が、Tc 移入群で移入後 8 週目までに見られた下痢や有意な体重減少は、RagDO CD4⁺ T 移入群では見られなかった (図 6B)。腸管の組織学的検討では、Tc 移入群では炎症細胞浸潤、腸管粘膜の肥厚、杯細胞の減少、陰窩の過形成、粘膜上皮の剥離などの典型的な腸炎の所見が見られたのに対し、RagDOCD4⁺ T 移入群では軽度の細胞浸潤を認めるものの腸管粘膜構造の破壊や変化は明らかではなかった (図 7A)。Tc+Treg 移入群では腸管粘膜

は正常に保たれていた。胃の組織学的検討でも、Tc 移入群では胃粘膜の炎症細胞浸潤、胃底腺の萎縮、上皮の過形成などの萎縮性胃炎の像を呈しているのに対し、RagDO CD4⁺T 移入群では軽度の細胞浸潤を認めるもの胃底腺や粘膜構造の変化は認めず、Tc+Treg 移入群では胃粘膜は正常であった (図 7B)。

ELISA での自己抗体の解析では、Tc 移入群で 4 週目から見られた抗胃壁抗体および抗 histone 抗体の上昇は RagDO 移入群および Tc+Treg 移入群では見られなかった (図 6C)。一方、4 週時点で RagDO 移入群では抗 ds-DNA 抗体の上昇は見られていた。さらにその他の特異抗体について、ANA combi ELISA キットを用いて測定したところ、Tc 移入群では、抗 Scl-70、RNP/Sm、RNP-70、SS-A、SS-B 抗体などの多彩な自己抗体が多くのマウスで見られたのに対し、RagDO 移入群では一部に観察されたのみであった (図 6D)。

以上より、TCR 特異性は抗核抗体産生に対しては寄与しないが、腸炎や胃炎などの臓器特異的自己免疫の発症に対しては TCR 特異性が寄与していると考えられた。種々の自己抗体については、TCR 特異性が関与するものとそうでないものが存在することが判明した。

RagDO マウスから Ln-OVA-TCR α ^{-/-}マウスへの T 細胞移入

次に cognate な抗原刺激によって CXCR5^{low}PD-1⁺ LIP-T_{FH} の産生が誘導される

のかどうかを検討した。RagDO マウス由来 CD4⁺細胞を TCR α 鎖ノックアウトマウス (TCR α ^{-/-}) に移入すると同様の PD-1⁺ T_{FH} 細胞と GC 形成が観察された (図 8A、B)。一方すべての核に OVA を発現した Ln-OVA-TCR α ^{-/-}マウスに RagDO 由来 CD4⁺細胞を移入したところ、TCR α ^{-/-}マウスに移入した場合に比べて PD-1⁺ T_{FH} 細胞と GC-B 細胞の産生される割合は低下していた (図 8A)。これは LIP-T_{FH} の分化には TCR に対する cognate な自己抗原刺激を必要としないこと、さらに TCR が cognate な自己抗原に対する反応性を持つ場合にはむしろ免疫寛容が誘導されることを示している。

RagDOsf マウスからヌードマウスへの T 細胞移入

Foxp3⁺CD4⁺ Treg から CXCR5⁺ T_{FH} に分化した、follicular regulatory T 細胞 (Tfr) と呼ばれる細胞群が知られている[43]。本系における LIP-T_{FH} が Treg から分化したのかどうかの検討を行った。RagDO マウスに機能的 Foxp3 を欠いた RagDO scurfy マウス (RagDOsf) および単なる RagDO マウスから採取した CD4⁺ T 細胞をそれぞれ TCR α ^{-/-}マウスに移入し、flow cytometry と組織学的検討を行ったところ、いずれの群においても同等の PD-1⁺CD200⁺ LIP-T_{FH} 細胞と GL7⁺Fas⁺B220⁺ GC-B 細胞の産生、GC 形成と GC 内の PD-1⁺CD4⁺ T 細胞の局在が観察された (図 8A、B)。これより、LIP によって生じる T_{FH} は Treg から分化する Tfr ではない

ことが示された。

第1章の考察

本研究における、ヌードマウスに野生型マウス由来の $CD4^+CD25^-$ 細胞を移入する系は、早期に高率に高抗体価の IgG タイプの自己抗体を産生する誘導型モデルであることが示され、自己免疫研究に適している系と考えられた。本系では抗核抗体を含む全身性自己抗体および臓器特異的自己抗体が産生され、Treg によって異常な B 細胞応答が制御されていることが示された。

本系において、移入された Tc 細胞は表面マーカー、組織学的局在、B 細胞ヘルプ機能の検討から、LIP を経て T_{FH} に分化していると考えられた。従来の T_{FH} と大きく異なる点は CXCR5 を強く発現していない点であるが、過去の CXCR5 欠損マウスにおける T_{FH} の研究から必ずしも CXCR5 は T_{FH} の出現、局在、germinal center 形成に必須ではないことが示されており[44-46]、本系において産生される細胞は $CXCR5^{low}$ という特徴を持った T_{FH} であると考えられる。外来抗原に対する防御ではなく自己抗体を誘導することや、CXCR5 が低い点など従来の T_{FH} とは異なる特徴を有していることから、この LIP- T_{FH} は新たな T_{FH} サブセットである可能性が考えられる。

LIP と T_{FH} への分化に関わる移入細胞の TCR の抗原特異性については、OVA 特異的反応性 TCR を持つ、すなわちレシピエント内に対応抗原を持たない RagDO 由来 $CD4^+$ T 細胞の移入でも、polyclonal な Tc 細胞を移入した場合と同様に rapid proliferation と T_{FH} への分化、GC 形成が見られたことから、LIP- T_{FH} の出現においては TCR に対する cognate な抗原刺激は必須ではないことが示された。逆に全身の核内に対応抗原を強制発現したマウスでは、自己に強く反応する TCR を持った $CD4^+$ T 細胞を移入すると T_{FH} 分化や GC-B 細胞の産生が抑制されており、むしろ tolerance が誘導されたと考えられる。

自己抗体産生や疾患発症に関わる TCR の抗原特異性の関与については、臓器特異的自己免疫、すなわち腸炎や胃炎の発症、抗胃壁抗体の産生には TCR 特異性が重要、つまり polyclonal な TCR を持った T_{FH} 細胞が必要であった。一方、抗核抗体、抗 ds-DNA 抗体など全身性の自己抗体については、TCR 特異性は必要でないことが示された。ただし抗核抗体の中には、抗 histone 抗体など TCR 特異性を必要とするものも存在する。抗 ds-DNA 抗体は RagDO マウス由来 $CD4^+$ T 細胞の移入で特に抗体価が高くなっているように見えるが、一部の高力価陽性マウスのデータを反映しているためと考えられ、発症率についての検討は次章にて述べる。

第2章 Lymphopenia-induced Autoimmunity における自己抗体産生に対する腸内細菌の果たす重要な役割

リンパ球の homeostatic proliferation には腸内細菌抗原の認識が重要であることが知られている。第 1 章で用いた系において、抗生剤を用いてレシピエントマウスの腸管滅菌を行うことで、LIP、LIP-T_{FH} の分化、および自己抗体産生における腸内細菌の果たす役割について解析した。また TLR による細菌抗原認識経路について検討した。さらに、古典的ループスモデルマウスでも発症機序に腸内細菌が関わっている可能性を検討するために、抗生剤投与による治療実験を行った。

結果

腸内細菌の LIP と LIP-T_{FH} 分化への関与

Germ free マウスの研究により、homeostatic proliferation のうち特に IL-7 非依存性で急速な分裂を特徴とする“spontaneous proliferation”には、腸内細菌に対する抗原認識が必要であることが報告されている[47]。そこで、本系における LIP-T_{FH} の分化および自己免疫疾患の発症に対する、腸内細菌の役割について検討した。過去のマウス腸管滅菌の報告[27, 28]を参考に、ヌードマウスに 5 種の

広域抗生剤 (Ciprofloxacin (CPFX), Imipenem (IPM), Metronidazole (MTZ), Vancomycin (VCM), Amphotericin B (AMB))を飲み水に溶解して投与し、腸管滅菌を行った。抗生剤投与開始から 10 日後に CFSE ラベルした Thy1.1⁺ Tc 細胞を移入し、5 日目の脾臓を flow cytometry で解析したところ (図 9A)、移入細胞の分裂は抗生剤投与群ではほとんど消失しており、PD-1⁺ 細胞への分化もほとんど見られなかった (図 9B)。組織学的検討では Tc 細胞移入で見られた GC 形成が、抗生剤投与により消失していた (図 9C)。以上より本系における移入細胞の LIP および LIP-T_{FH} への分化には、腸内細菌の存在が必須であることが示された。

腸内細菌の自己抗体産生への影響

上記の実験と同様に腸管滅菌を行ったうえで、Tc 細胞または Tc+Treg 細胞を移入して 14 週後の抗 ds-DNA 抗体および抗胃壁抗体を ELISA にて測定した。Tc 細胞移入によって見られた抗 ds-DNA 抗体と抗胃壁抗体の上昇は、抗生剤投与によって 14 週間にわたって抑制されていた (図 10A)。本実験において非移入群のヌードマウスでも長期間経つと、早期には見られなかった抗 ds-DNA 抗体の上昇が認められることが判明したが、それも抗生剤投与により抑制されていた。Tc+Treg 移入群では抗生剤投与の有無にかかわらず抗 ds-DNA 抗体価の上昇は抑制されていた。抗体価だけでなく、抗 ds-DNA 抗体の発生率においても、抗生剤

投与群では抗生剤非投与群と比較し、抑制効果が見られていた（図 10B）。以上より腸内細菌の存在は、LIP-T_{FH} を介した自己抗体産生においても重要な役割を果たしていることが示された。また、Tc を移入しないヌードマウスでも長期間の観察では抗核抗体が上昇することから、LIP-T_{FH} はリンパ球減少マウスにおける自己抗体産生において抗胃壁抗体のように必須である場合と、抗 ds-DNA 抗体のように単に促進的に働く場合があることが示された。

抗生剤の組み合わせの検討

上記の 5 種の抗生剤のうち、どの組み合わせが最も効果的であるかを検討するため、CPFX、IPM、AMB をそれぞれ除いた 4 剤の組み合わせを作成して Tc 移入ヌードマウスに投与し、14 週時点での抗 ds-DNA 抗体価を 5 剤投与群および非投与群と比較した。いずれの 4 剤の組み合わせにおいても非投与群と比較し抗体産生抑制効果が見られたが、5 剤投与群と比較し CPFX を除いたものでは抑制効果が劣り、IPM もしくは AMB を除いたものでは 5 剤投与群と差が見られなかった（図 10C）。この結果より、CPFX の必要性および MTZ と VCM の 2 剤もしくはどちらかの重要性が示唆された。

TLR7 および TLR9 の抗核抗体産生への関与

TCR α 鎖および TLR7 または TLR9 を欠いた、TCR $\alpha^{-/-}$ TLR7 $^{-/-}$ マウスと TCR $\alpha^{-/-}$ TLR9 $^{-/-}$ マウスを作成し、ナイーブな状態での血清の抗核抗体を観察した (図 12)。TCR $\alpha^{-/-}$ マウスでも、ヌードマウスと同様に、長期間の観察により抗核抗体が自然発生することを観察したが (平均抗体価 80 倍)、TCR $\alpha^{-/-}$ TLR9 $^{-/-}$ では抗核抗体産生が全く見られなかった(n=5)。一方 TCR $\alpha^{-/-}$ TLR7 $^{-/-}$ マウスでは TCR $\alpha^{-/-}$ マウスと同程度の抗核抗体産生が見られた (平均抗体価 80 倍、n=3) (図 11)。この結果により、抗核抗体産生誘導の経路において、TLR9 が重要な役割を果たしていることが示された。

古典的ループスモデルマウスへの抗生剤投与による治療効果

MRL/lpr マウス、NZB/WF1 マウス、BXSB マウスを 6-7 週の時点で購入した。また同時に 6 週齢の BALB/c 野生型マウスの腹腔内に pristane 500 μ l を注射した。それぞれのマウスを上記の抗生剤セット投与群と非投与群に分け、長期間での抗核抗体価および尿蛋白半定量試験を比較した。いずれのマウスでも抗生剤非投与群で 17 週時点までに抗核抗体価の上昇が見られたが、抗生剤投与群ではいずれのマウスも抗体価の上昇が抑制されていた (図 12A)。特に pristane 投与マウスでは抗生剤投与群で抗核抗体の上昇が観察されなかった。尿蛋白について

も、いずれのマウスでも抗生剤投与により 17 週時点での尿蛋白増加の抑制が見られた (図 12B)。これらの結果より古典的なループモデルマウスの自然発症型、誘導型のいずれにおいても、腸内細菌の存在が自己抗体産生および腎炎発症に大きく影響を及ぼしていることが示唆された。

第 2 章の考察

Lymphopenia-induced autoimmunity の系において、腸内細菌を除去すると LIP および LIP-T_{FH} への分化が消失したことから、腸内細菌の存在は LIP-T_{FH} の出現に必須であることが示された。これまでの報告では、rapid spontaneous proliferation では細菌抗原から TLR を介した刺激が樹状細胞に伝わり IL-6 とともに T 細胞分裂を促していることが判明しており [15, 16]、本系でもその経路が働いている可能性がある。今後、TLR 欠損レシピエントマウスを用いた本系の検討や、抗 H-2 抗体による MHC 阻害を行うことにより、LIP-T_{FH} 出現過程がより明らかになるものと考えられる。

本系における自己抗体産生も、腸内細菌の除去により抑制効果が見られた。長期間の観察では、抗胃壁抗体は LIP-T_{FH} の存在が必須であるのに対し、抗 ds-DNA 抗体は胸腺由来 T 細胞を欠くヌードマウスでも自然に発生していたこと

から、LIP-T_{FH}が必須ではなく単に促進的に働く自己抗体が存在することも判明した。T細胞を欠いたマウスにおいてどのような機序でB細胞にクラススイッチが生じ抗核抗体が産生されるのか現時点では不明であるが、TLR9欠損TCR α 欠損マウスではTCR α 欠損マウスで見られる抗核抗体産生が消失することから、in vitro および in vivo の研究で示された two receptor paradigm と呼ばれる核酸によるTLRとB細胞受容体のクロスリンクがT細胞非依存性にクラススイッチを惹起し自己抗体を誘導しうるとする現象[48-50]が、生じている可能性がある。B細胞単独で産生される自己抗体においても、腸内細菌の除去で抗体産生が抑制されることは、腸内細菌はLIP-T_{FH}の産生のみでなくT細胞を必要としない自己抗体産生にも重要な役割を担っていることを示している。

TLRを介した細菌抗原の認識については、特にTLR9の存在が、上記のin vitroでのT細胞非依存性の自己反応性B細胞の活性化[48, 49]やループスモデルマウスにおける自己抗体産生[51]に重要な働きをしていることが報告されており、本研究におけるTLR9欠損TCR α 欠損マウスの結果は、これら過去の報告と一致するものである。ただしTLR9欠損ループスモデルマウスでは腎炎発症は抑えられないこと[51]、また系によっては悪化することからTLR9は疾患発症に抑制的な働きをしているとする報告があること[52, 53]、TLRは多くの免疫細胞で発現していることなどから、本系においてTLRシグナルがどこでどのように働いてい

るかについては、今後さらなる検討を要する。

また、腸内細菌による自己抗体産生促進経路は Treg により抑制されることも示された。近年、腸内細菌が腸管局所で Treg を誘導する[54, 55]、もしくは存在している Treg の作用を強化するなどの報告がある。これらのことから、従来知られていた生体での Treg の自己免疫抑制作用の一部に、腸内細菌が間接的に関与している可能性が考えられる。ヌードマウスにおいて自然発生する抗核抗体については、Treg がいないことにより抑制が働いていないことが原因となっている可能性も考えられる[7]。

抗生剤の組み合わせによるアウトカムの変化は、特定の病原微生物の同定に有用である。Metronidazole と Vancomycin の重要性は、この 2 剤がヒトの臨床においては偽膜性腸炎を起こす Clostridium difficile の治療薬として用いられることから、一般の抗生剤の有効でない Clostridium 族を含む嫌気性腸内細菌に対して作用していることが考えられる。Treg を誘導する腸内細菌として Clostridium 族が同定されていることから、これら薬剤を用いた上で便中の腸内細菌の解析を行うことで、本系における LIP-T_{FH} および自己免疫を誘導する細菌の同定につながることを期待される。

自然発症するループスモデルマウスおよび pristane による誘導モデルにおいても、腸内細菌の除去は抗核抗体産生および腎炎発症を抑制した。古典的ループ

スモデルマウスにおいてもリンパ球減少が観察されることが知られているが、それが疾患による症状なのか、lymphopenia-induced autoimmunity のように疾患発症の引き金または増悪因子となっているのかは明らかではなく、LIP-T_{FH} との関連も不明ではあるが、何らかの形で lymphopenia-induced autoimmunity の発症機序と共通した腸内細菌の関わる経路が存在している可能性が考えられ、さらなる機序解明が今後の自己免疫疾患治療につながると考えられる。

第3章：総括と展望

胸腺を欠いたヌードマウスに野生型の $CD4^+CD25^-$ T 細胞 (Tc) を移入する本実験系では、lymphopenia-induced proliferation (LIP) を通して Tc から LIP-T_{FH} が分化し、自己抗体産生を誘導または促進する。腸内細菌は、異常な B 細胞応答による自己抗体産生を直接刺激するとともに、Tc の LIP-T_{FH} への分化を誘導する。LIP-T_{FH} は全身性自己抗体の産生には促進的に作用するが、臓器特異的自己抗体産生および臓器特異的自己免疫疾患発症には、polyclonal な TCR 特異性をもった LIP-T_{FH} が必須である。B 細胞による自己抗体産生、LIP-T_{FH} の出現、LIP-T_{FH} による B 細胞ヘルプのいずれに対しても、制御性 T 細胞は抑制的に作用する。抗核抗体産生 B 細胞の出現には CpGDNA を抗原認識する TLR9 が何らかの形で重要な働きをしていると考えられる。Tc による腸内細菌の認識には、樹状細胞 (DC) や自然リンパ球 (ILC) が介在している可能性がある (図 13)。

今後、TLR 欠損レシピエントマウスおよび TLR 欠損ドナーマウスを用いた移入系の検討や、抗 H-2 抗体による MHC 阻害を行うことにより、LIP-T_{FH} 出現過程において Tc がどのように腸内細菌を認識しているのか、より明らかになるものと考えられる。

また、腸管内には細菌の他に真菌やウイルスも存在していることが知られている。それらと自己免疫疾患との直接的な関わりは現時点では不明であるが、

真菌やウイルスと全身性自己免疫疾患の関連を示した報告はあり[56, 57]、腸管内においても細菌だけでなく真菌やウイルスが自己免疫発生機序に重要な働きをしている可能性がある。また、ウイルス由来の RNA や DNA による TLR の活性化が、抗核抗体産生を始めとした自己免疫発生機序に深く関わっていることも推察される。これら細菌以外の常在微生物との関わりも、今後の検討を要する。

リンパ球減少モデルだけでなく、遺伝的背景をもとに自然発症するループスモデルマウスにおいても腸内細菌の除去が発症抑制に働いたことは、多因子疾患であるヒトの全身性自己免疫疾患においても腸内細菌が発症促進に働いている可能性を示唆している。実際にヒト自己免疫疾患では、発症において遺伝的背景も重要だが環境因子の関わる役割が大きいと考えられている。腸内細菌の役割として、特定の自己免疫原性細菌の存在や、腸内細菌叢バランスによる免疫変化など、様々な関与の可能性が現時点では想定される。

今後、疾患の有無による便中細菌の比較などを通じた、マウスおよびヒトでの特定の自己免疫原性腸内細菌の同定や、本実験系を利用した自己抗体産生機序のさらなる解明は、自己免疫疾患に対する従来免疫抑制とは異なる新規治療アプローチにつながる可能性がある。

謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なるご指導と温かなご助言を賜りました東京大学大学院医学系研究科アレルギー・リウマチ内科教授、山本一彦先生に深謝申し上げます。

本研究の機会を与えてくださり、研究の初歩から親身にご指導を賜りました、東京大学大学院医学系研究科アレルギー・リウマチ内科講師、川畑仁人先生に心より深く御礼申し上げます。

本研究をまとめるにあたり、貴重なご助言を賜りました千葉大学大学院医学研究院分子制御学教授、徳久剛史先生に心より深く御礼申し上げます。

本研究の実験手法等についてご指導いただいた、今村充先生、神崎健仁先生に心より深く御礼申し上げます。

最後になりますが、本研究を進めるにあたり惜しみないご協力をいただいた、所属研究室の赤平（綾部）理紗先生、道下和也先生、実験助手の山内径子さんに心より深く御礼申し上げます。

参考文献

1. Tan, E.M., Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol*, 1989. **44**: p. 93-151.
2. Rantapaa-Dahlqvist, S., et al., Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2003. **48**(10): p. 2741-9.
3. Santiago-Raber, M.L., et al., Genetic basis of murine lupus. *Autoimmun Rev*, 2004. **3**(1): p. 33-9.
4. Satoh, M. and W.H. Reeves, Induction of lupus-associated autoantibodies in BALB/c mice by intraperitoneal injection of pristane. *J Exp Med*, 1994. **180**(6): p. 2341-6.
5. Ernst, B., et al., The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. *Immunity*, 1999. **11**(2): p. 173-81.
6. Le Saout, C., et al., Memory-like CD8⁺ and CD4⁺ T cells cooperate to break peripheral tolerance under lymphopenic conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(49): p. 19414-9.
7. Baccala, R. and A.N. Theofilopoulos, The new paradigm of T-cell homeostatic

- proliferation-induced autoimmunity. *Trends Immunol*, 2005. **26**(1): p. 5-8.
8. Kurosaka, D., et al., Decreased numbers of signal-joint T cell receptor excision circle-containing CD4⁺ and CD8⁺ cells in systemic lupus erythematosus patients. *Mod Rheumatol*, 2007. **17**(4): p. 296-300.
 9. Fujii, H., et al., Telomerase insufficiency in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(11): p. 4360-5.
 10. Hug, A., et al., Thymic export function and T cell homeostasis in patients with relapsing remitting multiple sclerosis. *J Immunol*, 2003. **171**(1): p. 432-7.
 11. King, C., et al., Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity. *Cell*, 2004. **117**(2): p. 265-77.
 12. Sakaguchi, S., et al., Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
 13. Min, B., et al., Spontaneous and homeostatic proliferation of CD4 T cells are regulated by different mechanisms. *J Immunol*, 2005. **174**(10): p. 6039-44.
 14. Kieper, W.C., et al., Recent immune status determines the source of antigens that drive homeostatic T cell expansion. *J Immunol*, 2005. **174**(6): p. 3158-63.

15. Feng, T., et al., Microbiota innate stimulation is a prerequisite for T cell spontaneous proliferation and induction of experimental colitis. *J Exp Med*, 2010. **207**(6): p. 1321-32.
16. Kawabe, T., et al., Homeostatic proliferation of naive CD4⁺ T cells in mesenteric lymph nodes generates gut-tropic Th17 cells. *J Immunol*, 2013. **190**(11): p. 5788-98.
17. Wu, H.J. and E. Wu, The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. *Gut Microbes*, 2012. **3**(1): p. 4-14.
18. Schultz, M., et al., IL-2-deficient mice raised under germfree conditions develop delayed mild focal intestinal inflammation. *Am J Physiol*, 1999. **276**(6 Pt 1): p. G1461-72.
19. Dianda, L., et al., T cell receptor-alpha beta-deficient mice fail to develop colitis in the absence of a microbial environment. *Am J Pathol*, 1997. **150**(1): p. 91-7.
20. Sellon, R.K., et al., Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun*, 1998. **66**(11): p. 5224-31.
21. Wu, H.J., et al., Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity*, 2010. **32**(6): p. 815-27.

22. Wen, L., et al., Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature*, 2008. **455**(7216): p. 1109-13.
23. Maldonado, M.A., et al., The role of environmental antigens in the spontaneous development of autoimmunity in MRL-lpr mice. *J Immunol*, 1999. **162**(11): p. 6322-30.
24. Rakoff-Nahoum, S., et al., Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 2004. **118**(2): p. 229-41.
25. Celhar, T., R. Magalhaes, and A.M. Fairhurst, TLR7 and TLR9 in SLE: when sensing self goes wrong. *Immunol Res*, 2012. **53**(1-3): p. 58-77.
26. Kawahata, K., et al., Peripheral tolerance to a nuclear autoantigen: dendritic cells expressing a nuclear autoantigen lead to persistent anergic state of CD4+ autoreactive T cells after proliferation. *J Immunol*, 2002. **168**(3): p. 1103-12.
27. Souza, D.G., et al., The essential role of the intestinal microbiota in facilitating acute inflammatory responses. *J Immunol*, 2004. **173**(6): p. 4137-46.
28. Hoentjen, F., et al., Antibiotics with a selective aerobic or anaerobic spectrum have different therapeutic activities in various regions of the colon in interleukin 10 gene deficient mice. *Gut*, 2003. **52**(12): p. 1721-7.
29. Good-Jacobson, K.L., et al., PD-1 regulates germinal center B cell survival and

- the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nat Immunol*, 2010. **11**(6): p. 535-42.
30. Akiba, H., et al., The role of ICOS in the CXCR5+ follicular B helper T cell maintenance in vivo. *J Immunol*, 2005. **175**(4): p. 2340-8.
 31. Chtanova, T., et al., T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. *J Immunol*, 2004. **173**(1): p. 68-78.
 32. Breitfeld, D., et al., Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med*, 2000. **192**(11): p. 1545-52.
 33. Schaerli, P., et al., CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med*, 2000. **192**(11): p. 1553-62.
 34. Cervenak, L., et al., Differential expression of GL7 activation antigen on bone marrow B cell subpopulations and peripheral B cells. *Immunol Lett*, 2001. **78**(2): p. 89-96.
 35. Cozine, C.L., K.L. Wolniak, and T.J. Waldschmidt, The primary germinal center response in mice. *Curr Opin Immunol*, 2005. **17**(3): p. 298-302.

36. Guy-Grand, D., et al., Extrathymic T cell lymphopoiesis: ontogeny and contribution to gut intraepithelial lymphocytes in athymic and euthymic mice. *J Exp Med*, 2003. **197**(3): p. 333-41.
37. Nurieva, R.I., et al., Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science*, 2009. **325**(5943): p. 1001-5.
38. Johnston, R.J., et al., Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science*, 2009. **325**(5943): p. 1006-10.
39. Yu, D., et al., The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity*, 2009. **31**(3): p. 457-68.
40. Nurieva, R.I., et al., Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity*, 2008. **29**(1): p. 138-49.
41. Fazilleau, N., et al., Follicular helper T cells: lineage and location. *Immunity*, 2009. **30**(3): p. 324-35.
42. Kawahata, K., et al., Generation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells from autoreactive T cells simultaneously with their negative selection in the thymus and from nonautoreactive T cells by endogenous TCR expression. *J Immunol*,

2002. **168**(9): p. 4399-405.
43. Tsuji, M., et al., Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches. *Science*, 2009. **323**(5920): p. 1488-92.
 44. Voigt, I., et al., CXCR5-deficient mice develop functional germinal centers in the splenic T cell zone. *Eur J Immunol*, 2000. **30**(2): p. 560-7.
 45. Junt, T., et al., CXCR5-dependent seeding of follicular niches by B and Th cells augments antiviral B cell responses. *J Immunol*, 2005. **175**(11): p. 7109-16.
 46. Arnold, C.N., et al., The germinal center response is impaired in the absence of T cell-expressed CXCR5. *Eur J Immunol*, 2007. **37**(1): p. 100-9.
 47. Kieper, W.C., J.T. Burghardt, and C.D. Surh, A role for TCR affinity in regulating naive T cell homeostasis. *J Immunol*, 2004. **172**(1): p. 40-4.
 48. Leadbetter, E.A., et al., Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature*, 2002. **416**(6881): p. 603-7.
 49. Viglianti, G.A., et al., Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA. *Immunity*, 2003. **19**(6): p. 837-47.
 50. Herlands, R.A., et al., T cell-independent and toll-like receptor-dependent antigen-driven activation of autoreactive B cells. *Immunity*, 2008. **29**(2): p. 249-60.

51. Christensen, S.R., et al., Toll-like receptor 9 controls anti-DNA autoantibody production in murine lupus. *J Exp Med*, 2005. **202**(2): p. 321-31.
52. Christensen, S.R., et al., Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. *Immunity*, 2006. **25**(3): p. 417-28.
53. Wu, X. and S.L. Peng, Toll-like receptor 9 signaling protects against murine lupus. *Arthritis Rheum*, 2006. **54**(1): p. 336-42.
54. Atarashi, K., et al., Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science*, 2011. **331**(6015): p. 337-41.
55. Atarashi, K., et al., Treg induction by a rationally selected mixture of *Clostridia* strains from the human microbiota. *Nature*, 2013. **500**(7461): p. 232-6.
56. Yoshitomi, H., et al., A role for fungal {beta}-glucans and their receptor Dectin-1 in the induction of autoimmune arthritis in genetically susceptible mice. *J Exp Med*, 2005. **201**(6): p. 949-60.
57. James, J.A. and J.M. Robertson, Lupus and Epstein-Barr. *Curr Opin Rheumatol*, 2012. **24**(4): p. 383-8.

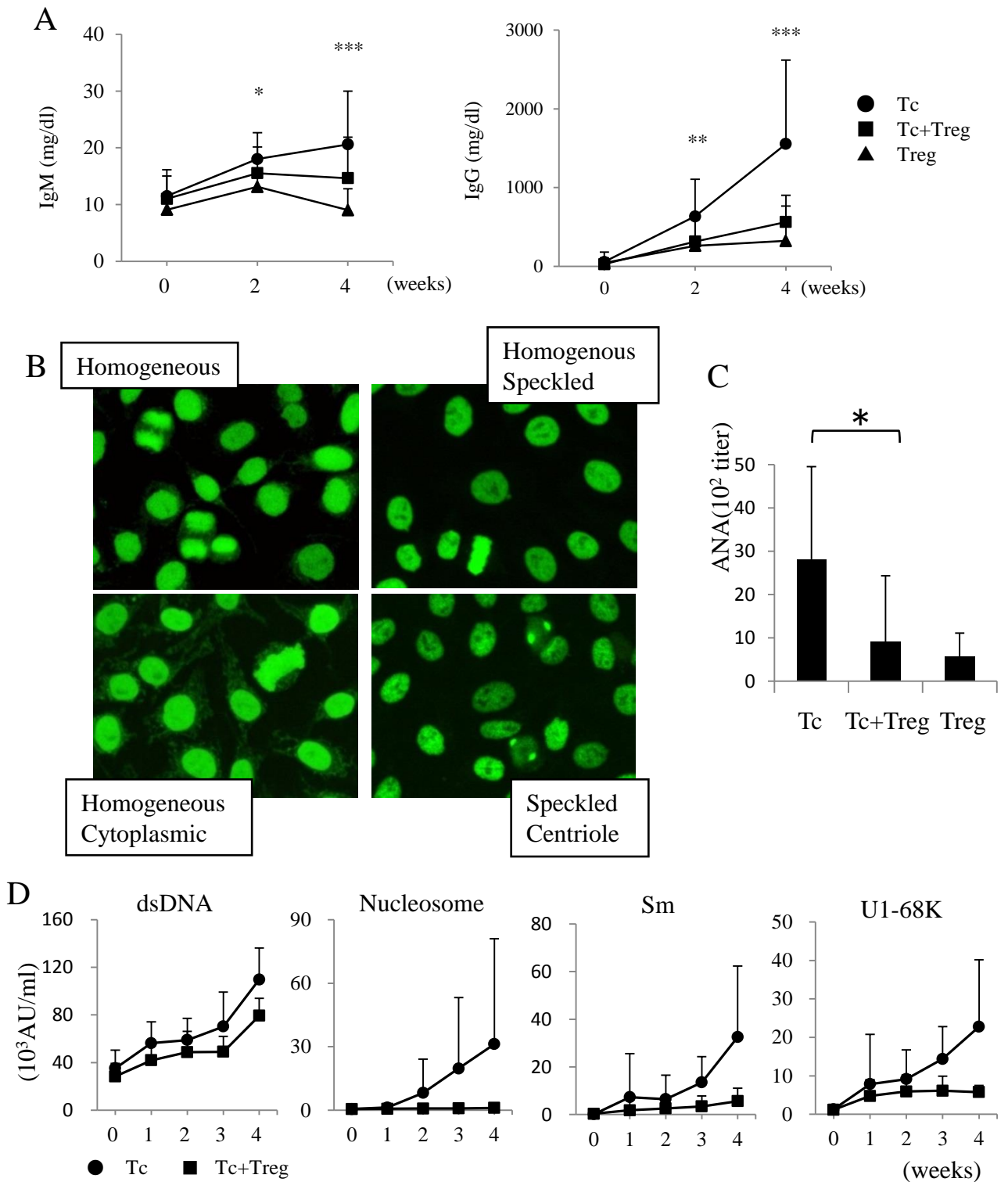


図1. ヌードマウスへのCD4⁺T細胞移入によるクラススイッチと抗核抗体産生

(Tc; CD4⁺CD25⁻T細胞、Treg: CD4⁺CD25⁺T細胞、Tc+Treg: CD4⁺T細胞) (*:p<0.05)

A. TcまたはTregまたはTc+Treg移入後のELISAによるIgMとIgGの測定 (各群5匹、2回の測定のmean±SEM)

B. 蛍光抗体法による抗核抗体の検出

C. 移入後3週における各レシピエント血清のhomogeneous pattern 抗核抗体価 (n = Tc群 10, Tc+Treg群 10, Treg 群4、mean±SEM)

A. ELISAによる各種抗核抗体の測定 (各群5匹、2回の測定のmean±SEM)

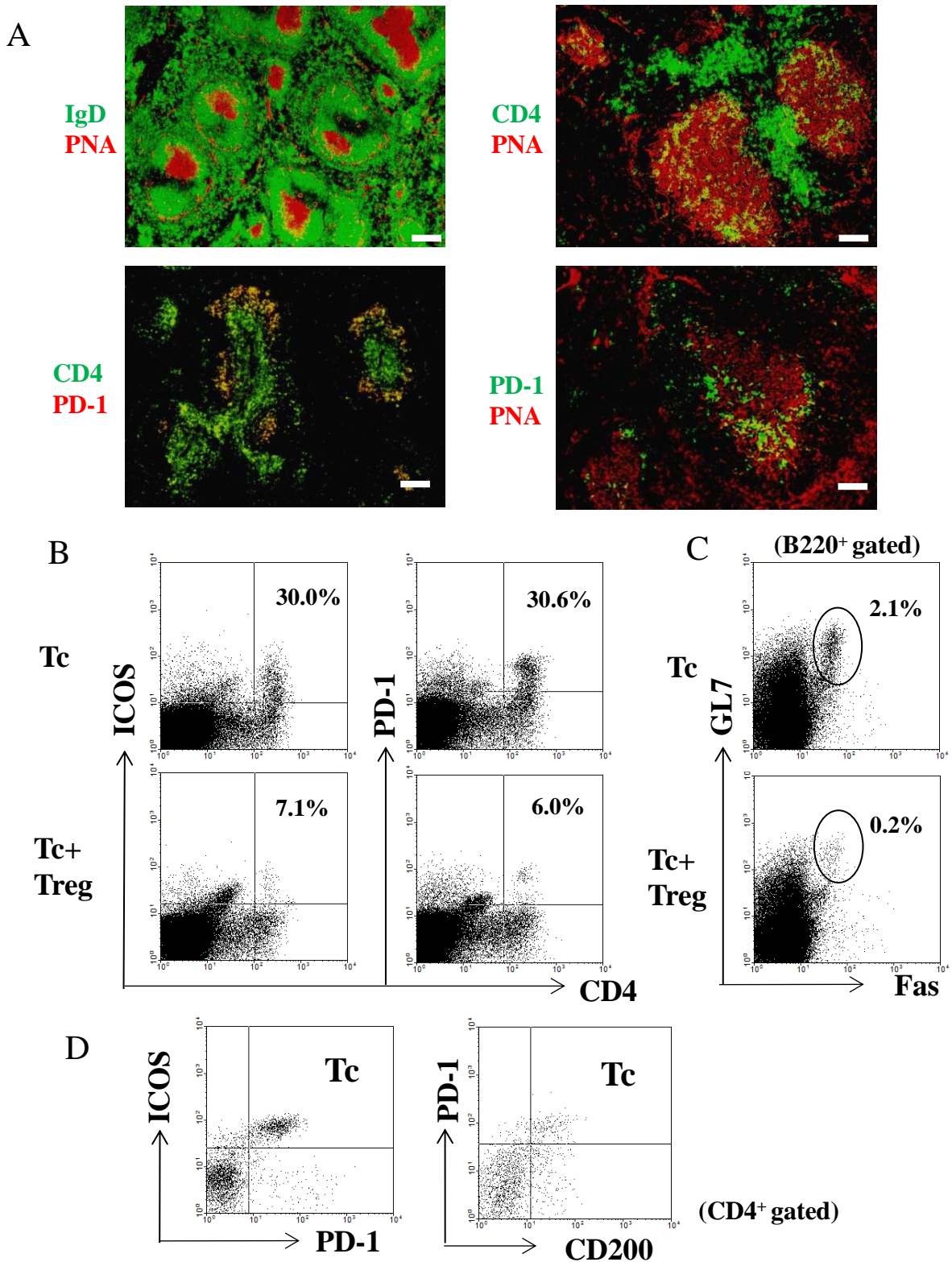


図2. CD4⁺T細胞移入5日後のヌードマウスにおけるgerminal center形成とCD4⁺T細胞の分化

- A. レシピエント脾臓の組織学的検討。IgD (左上 緑)、CD4 (右上 赤、左下 緑)、PD-1 (左下 赤、右下 緑) に対する抗体およびPNA (左上、右上、右下 赤) で免疫蛍光染色を行った (左上 40倍拡大, scale bars: 100 μ m、左上以外 100倍拡大, scale bars: 40 μ m)。
- B. C. TcまたはTc+Treg移入レシピエントの脾細胞におけるCD4、ICOS、PD-1の発現 (B) およびB220⁺細胞におけるGL7、Fasの発現 (C) をflow cytometryにより検討した。
- D. Tc移入レシピエントの脾細胞中のCD4⁺細胞におけるICOS、PD-1、CD200の多重発現をflow cytometryにより検討した。

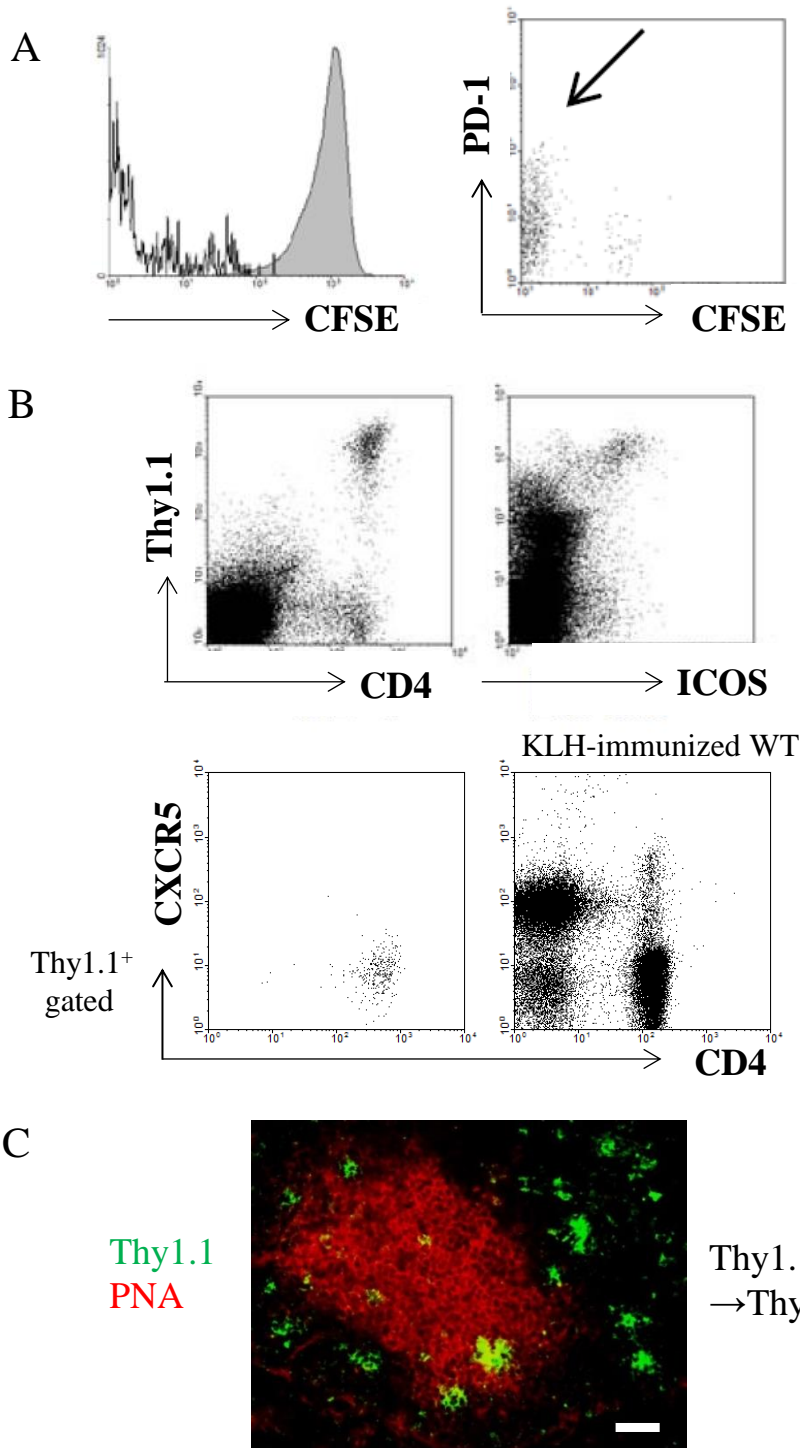


図3. ドナー由来移入T細胞のLIPによる T_{FH} への分化

A. 野生型マウス由来TcをCFSE染色してヌードマウスに移入し、5日後のレシピエント脾細胞のCFSEの低下およびPD-1の発現をflow cytometryにて検討した。

B. Thy1.1⁺野生型マウス由来TcをThy1.2⁺ヌードマウスに移入し、5日後のレシピエント脾細胞におけるThy1.1⁺CD4⁺細胞のICOSおよびCXCR5の発現を、flow cytometryにて検討した。CXCR5の陽性コントロールとしてKLHで免疫した野生型BALB/cマウスで産生される T_{FH} 細胞を用いた。

C. Thy1.1⁺野生型マウス由来TcをThy1.2⁺ヌードマウスに移入し、5日後の脾臓のPNA（赤）と抗Thy1.1抗体（緑）による蛍光抗体染色を行い、germinal centerとThy1.1⁺ドナー由来細胞の局在を検討した（100倍拡大、Scale bar:40 μ m）。

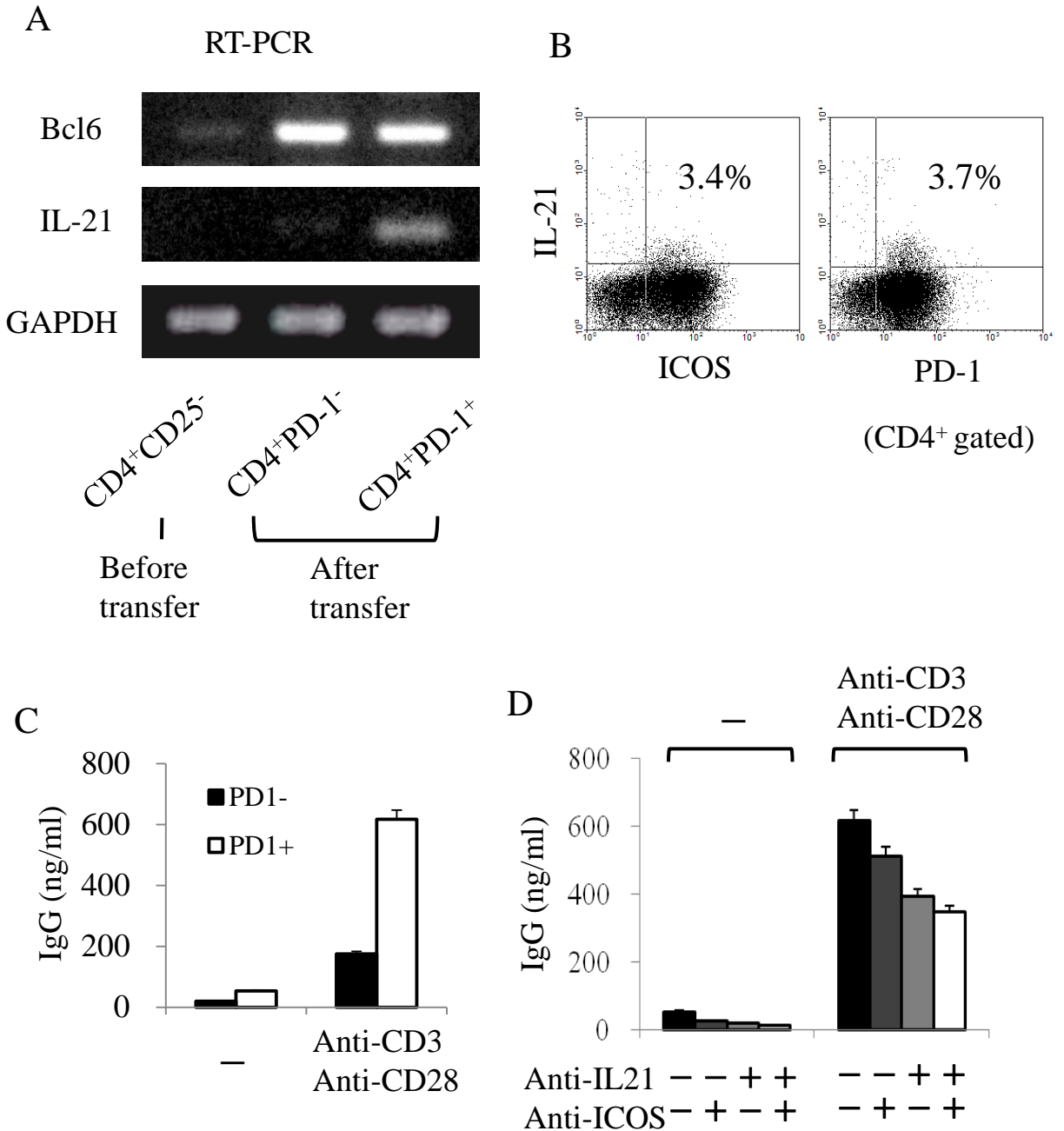
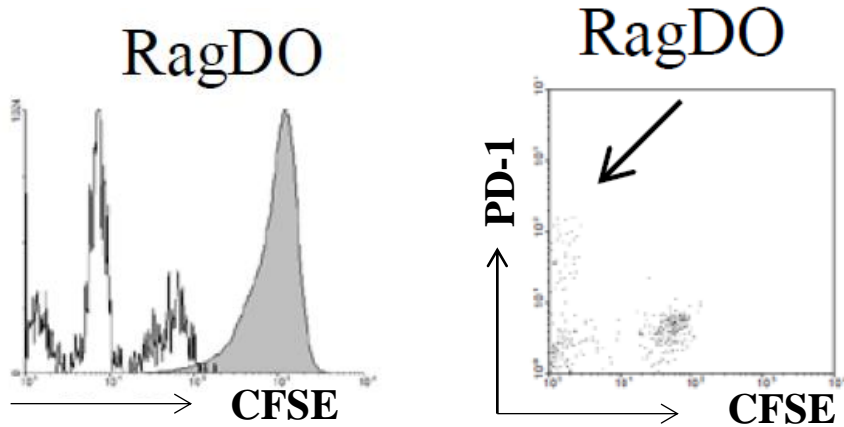


図4. PD-1⁺LIP-T細胞の機能解析

- A. 野生型マウスの脾臓から採取したCD4⁺CD25⁻細胞およびTc移入後5日目のヌードマウスの脾臓から採取したCD4⁺PD-1⁻細胞とCD4⁺PD-1⁺細胞におけるBcl-6 mRNAとIL-21 mRNAの発現を、RT-PCRで解析した。
- B. Tc移入後7日目のヌードマウスの脾細胞における、CD4⁺PD-1⁺細胞およびCD4⁺ICOS⁺細胞でのIL-21の発現をflow cytometryにより検討した。
- C. Tc移入後5日目のヌードマウス由来のCD4⁺PD-1⁻細胞またはCD4⁺PD-1⁺細胞と、野生型BALB/cマウス由来のCD19⁺B細胞を共培養して抗CD3抗体、抗CD28抗体で刺激したのちに、IgG産生量をELISAにて測定した。
- D. Cと同じ実験を、抗IL-21中和抗体または抗ICOS中和抗体または両者の存在下で行い、IgG産生量をELISAにて測定した。

A



B

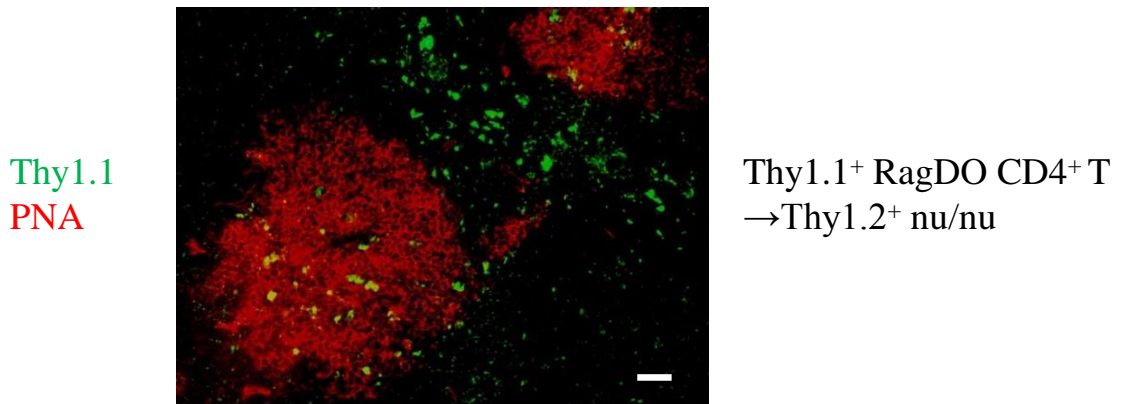


図5. RagDOマウス由来CD4⁺T細胞の移入によるLIPにおけるTCR specificityの検討
 A. RagDOマウス由来CD4⁺細胞をCFSE染色してヌードマウスに移入し、5日後のレシピエント脾細胞のCFSEの低下およびPD-1の発現をflow cytometryにて検討した。
 B. Thy1.1⁺RagDOマウス由来CD4⁺細胞をThy1.2⁺ヌードマウスに移入し、5日後の脾臓のPNA（赤）と抗Thy1.1抗体（緑）による蛍光抗体染色により、germinal centerとThy1.1⁺ドナー由来細胞の局在を検討した。（100倍拡大、Scale bar: 40μm）

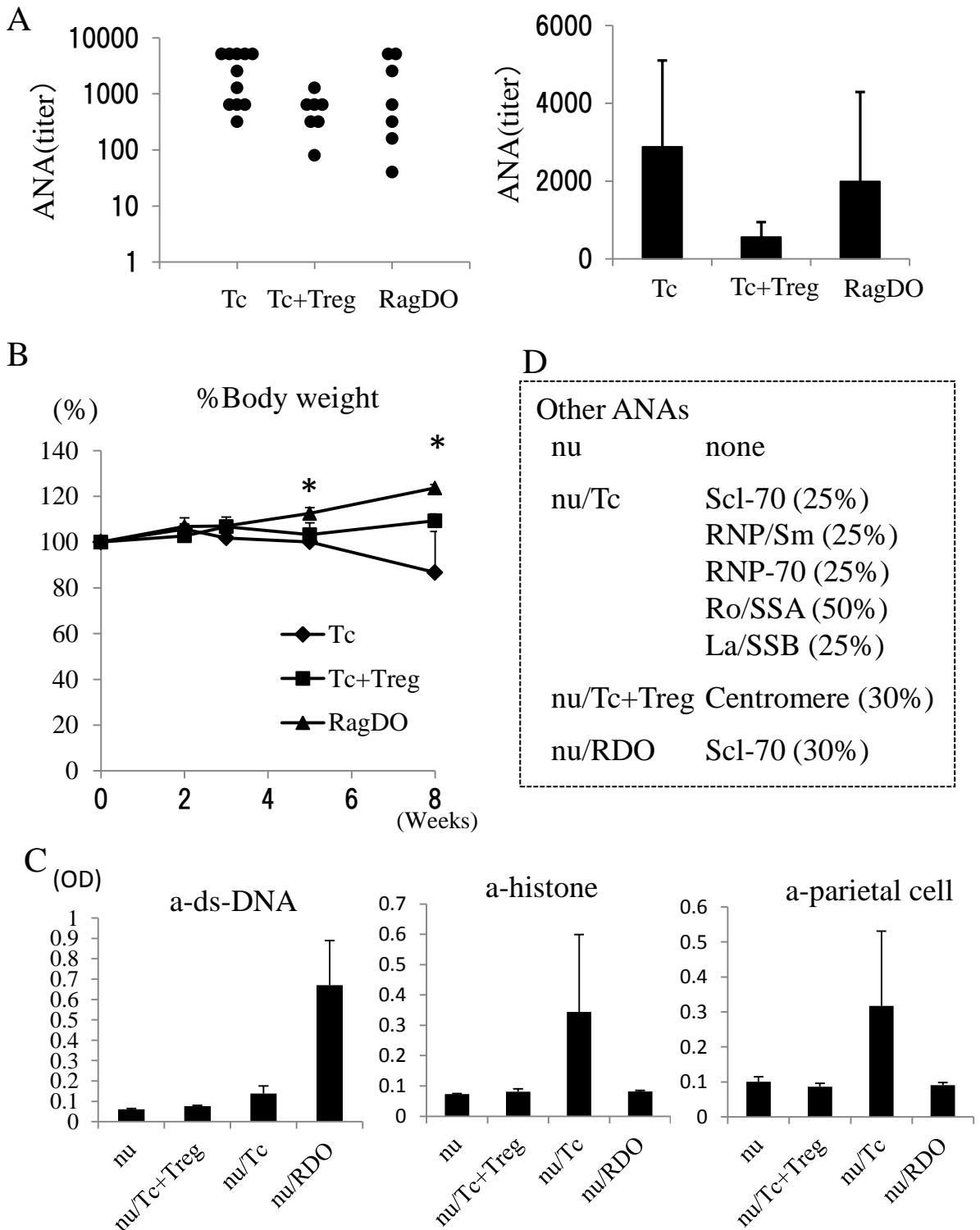


図6. 抗体産生および臓器特異的自己免疫へのTCR特異性の寄与の検討
 A. 野生型マウス由来Tc、Tc+Tregまたは、RagDOマウス由来CD4⁺細胞をヌードマウスに移入し、3週間後の抗核抗体価を比較した。
 B. Aのそれぞれのマウスの体重変化率を8週間記録した。それぞれの群で5匹のマウスの体重を2回測定して平均した (mean ± SEM, *:p<0.05)。
 C. Aのそれぞれのマウスおよび同週齢の非移入ヌードマウスの移入後4週目における血清中の抗ds-DNA抗体、抗histone抗体、抗胃壁抗体濃度をELISAで測定した。
 D. それぞれのマウスの移入後4週における各種抗体をANA combi ELISAキットを用いて解析した。

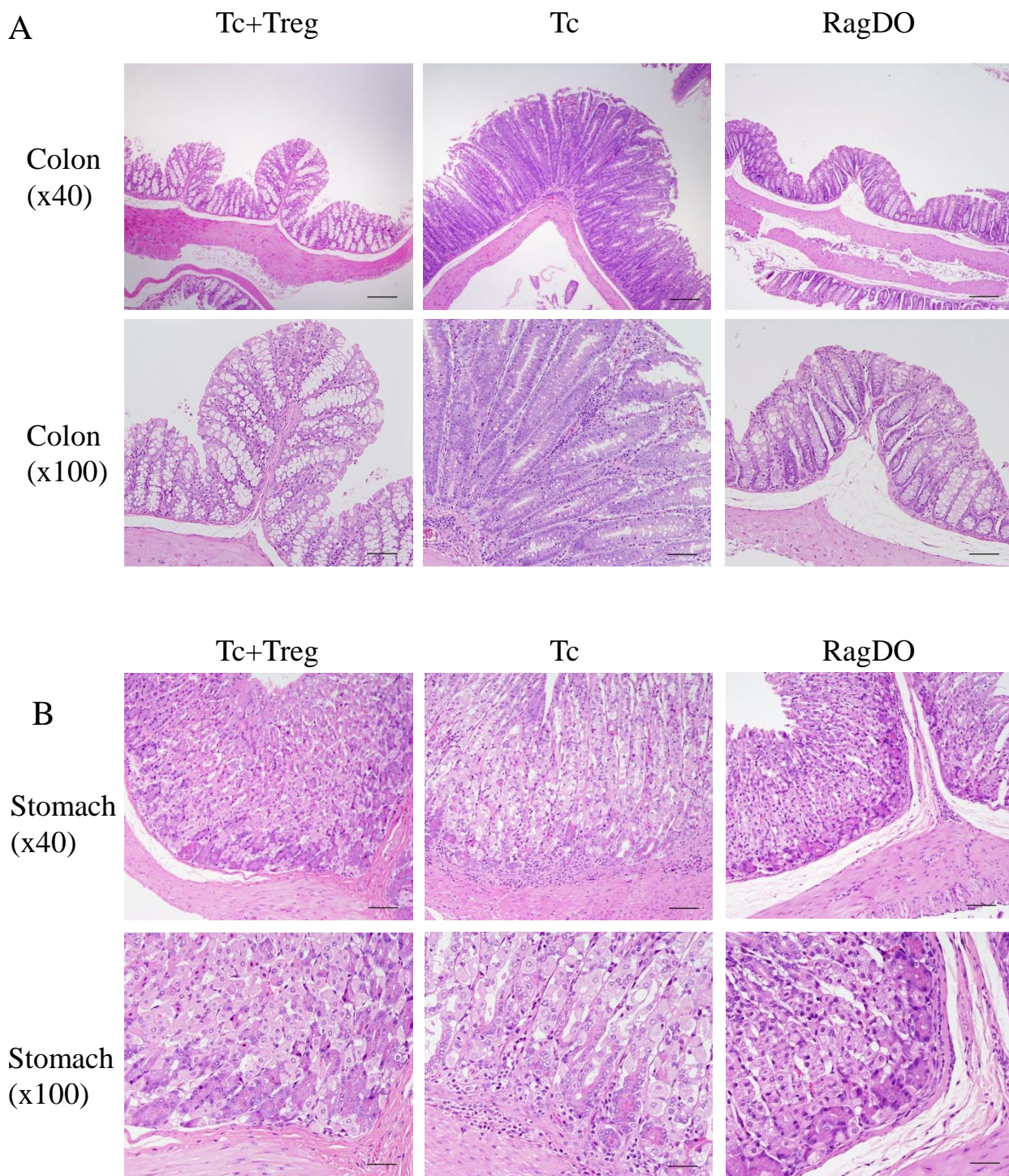


図7. CD4⁺T移入ヌードマウスにおける腸炎と胃炎の病理組織

野生型マウス由来Tc、Tc+TregまたはRagDOマウス由来CD4⁺細胞を移入したヌードマウスの2か月後の大腸標本のHE染色 (A)と胃標本のHE染色 (B)
 上段：40倍拡大, scale bars, 200μm、下段：100倍拡大, scale bars 80μm

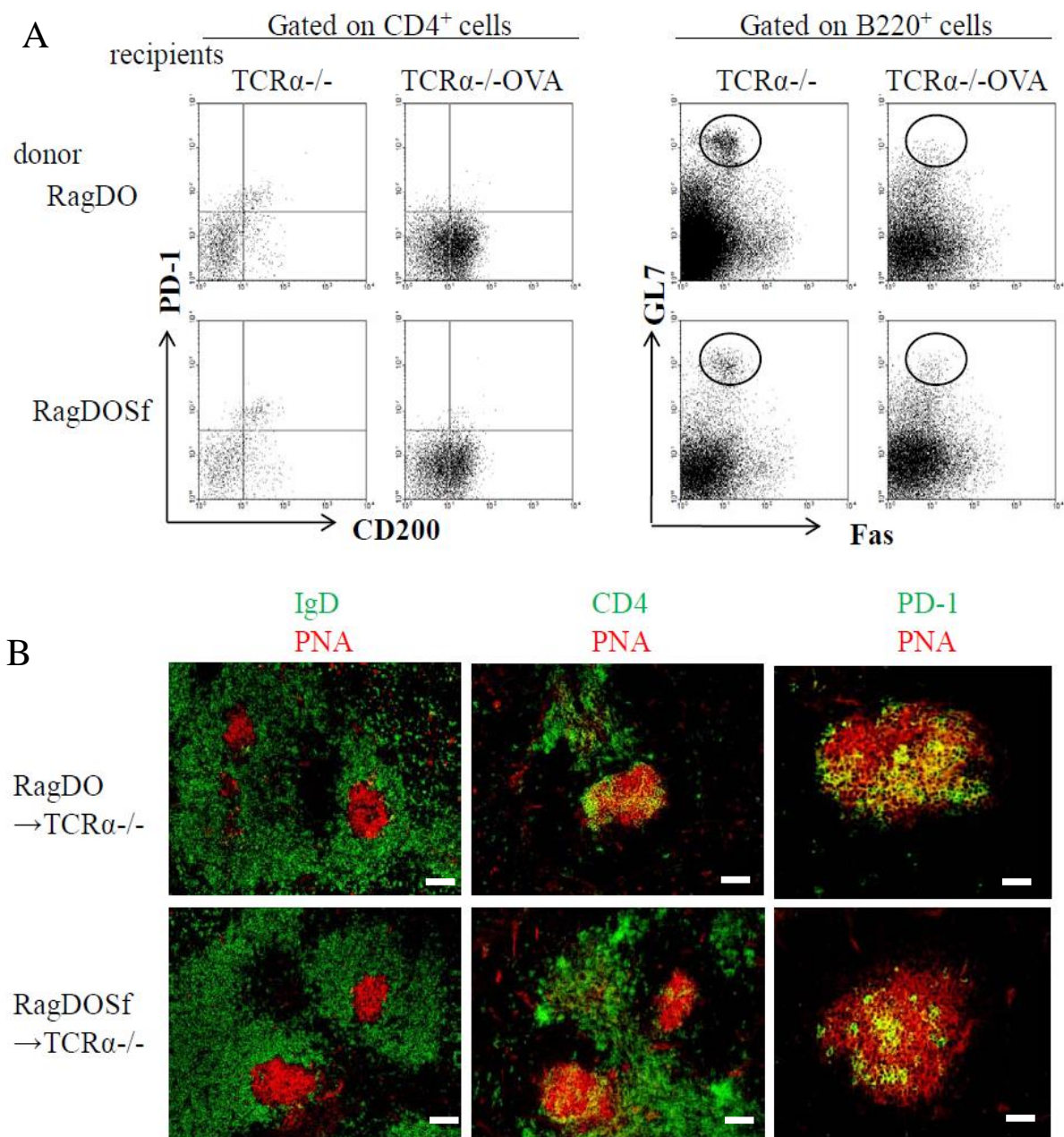


図8. TCR特異性とFoxp3のLIP-TFH分化への寄与の検討

- A. RagDOマウスまたはRagDOscurfyマウス由来のCD4⁺細胞を、TCR $\alpha^{-/-}$ マウスまたはLd-n-OVA TCR $\alpha^{-/-}$ に移入し、5日後の脾臓におけるPD-1⁺CD200⁺CD4⁺ T細胞とGL7⁺Fas⁺B220⁺ B細胞をflow cytometryにより検出して比較した。
- B. RagDOマウスまたはRagDOscurfyマウス由来のCD4⁺細胞をTCR $\alpha^{-/-}$ マウスに移入し、5日後の脾臓をIgD (緑、左列)、CD4 (緑、中列)、PD-1 (緑、右列) に対する抗体およびPNA (赤) により免疫蛍光染色を行った。(左列、中列：40倍拡大、scale bars: 100 μ m、右列：100倍拡大、scale bars: 40 μ m)

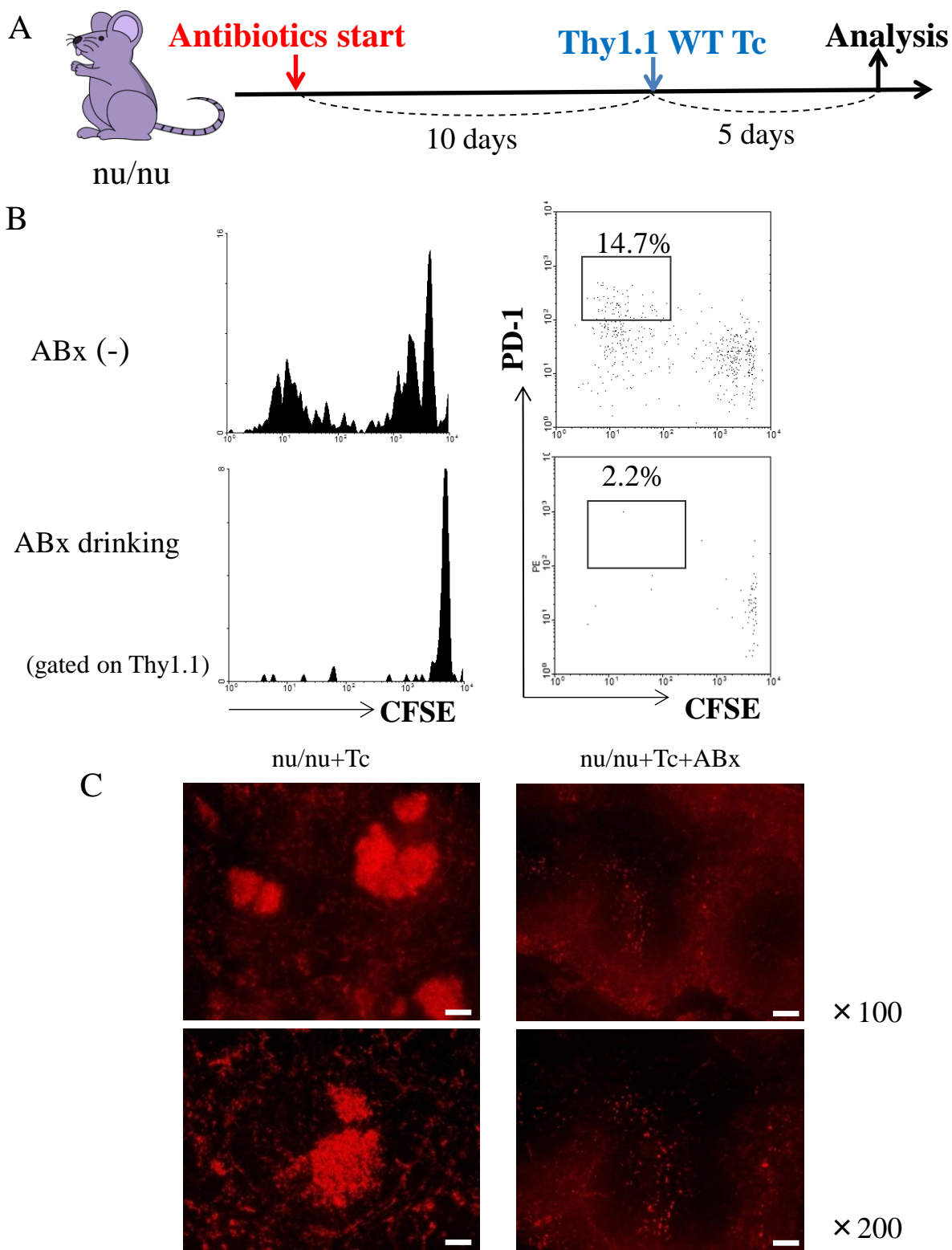


図9. 腸内細菌のLIPとLIP- T_{FH} 分化への影響

A. 抗生剤内服のスケジュール

B. Thy1.1⁺野生型マウス由来TcをCFSE染色して抗生剤内服/非内服ヌードマウスに移入し、5日目のレシピエントマウス脾臓におけるThy1.1⁺細胞のCFSE強度およびPD-1の発現をflow cytometryにて解析した。

C. Bのレシピエントマウス脾臓の組織におけるPNA蛍光染色によるgerminal center形成の評価（上段 100倍拡大, scale bars: 40 μ m、下段 200倍拡大, scale bars : 80 μ m）。

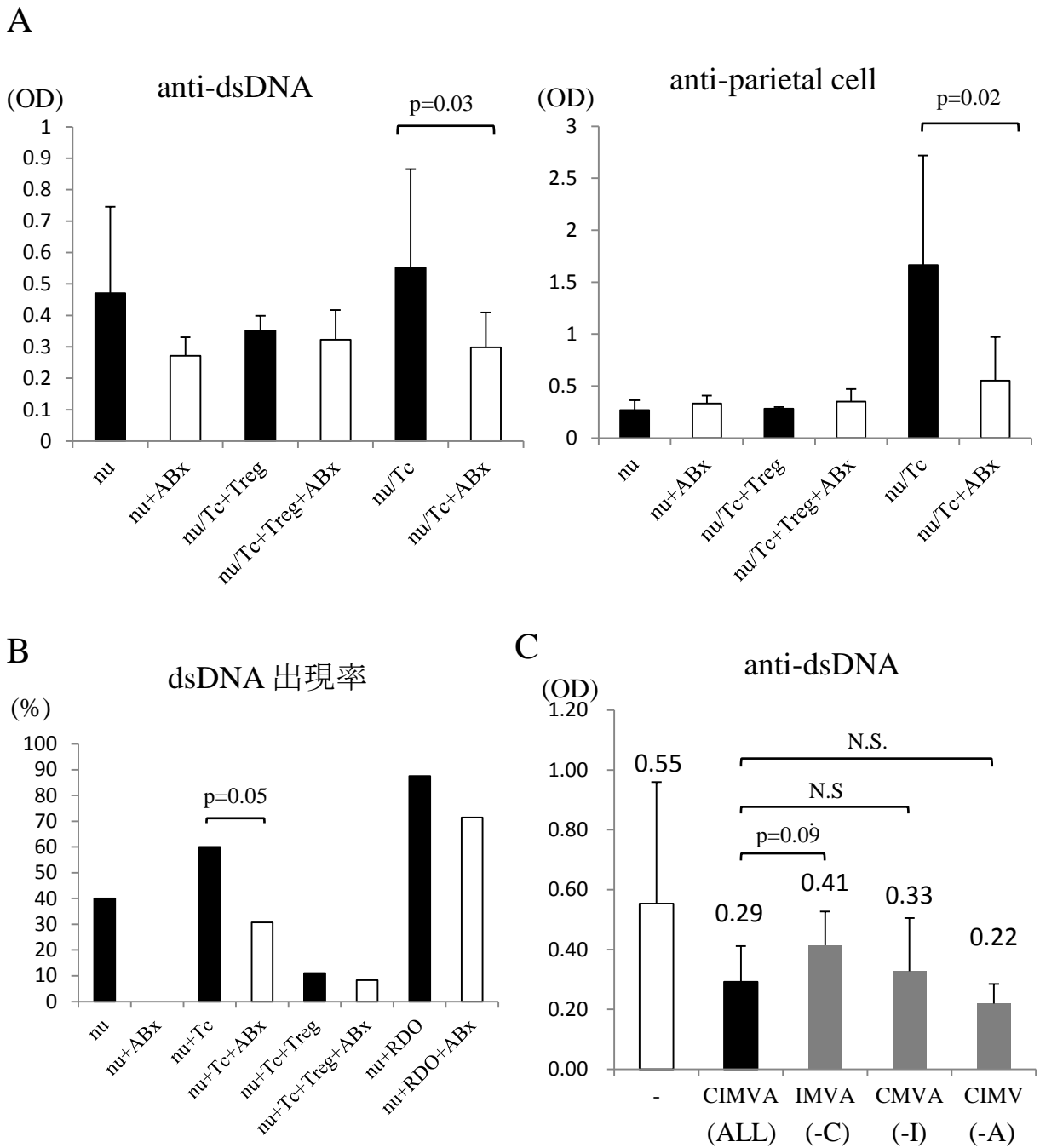
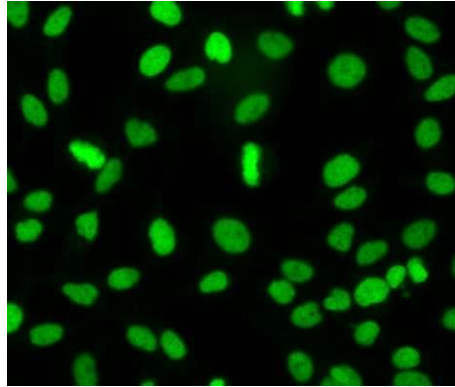


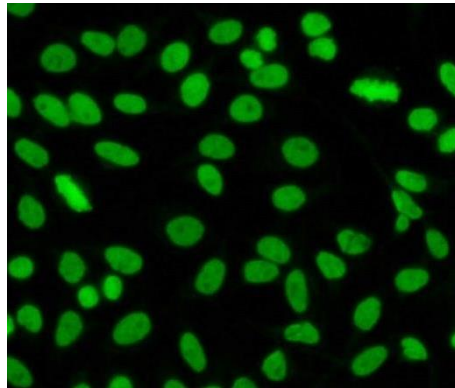
図10. LIP-自己免疫モデルマウスに対する抗生剤投与の自己抗体産生への影響

- A. 野生型マウス由来TcまたはTc+Treg、またはRagDOマウス由来CD4⁺を抗生剤投与/非投与ヌードマウスに移入し、14週後の抗ds-DNA抗体と抗胃壁抗体をELISAにて評価した (mean ± SEM, n=4)。
- B. 移入後2か月における抗dsDNA抗体の出現率の比較
- C. 抗生剤の組み合わせの検討。CPFX、IPM、MTZ、VCM、AMPH-Bの5剤およびCPX、IPM、AMPH-Bのそれぞれを除いた4剤を投与したヌードマウスに野生型マウス由来Tcを移入し、14週後の抗ds-DNA抗体をELISAにて評価した (mean ± SEM, n=3)。

TCR α ^{-/-}



TCR α ^{-/-}TLR7^{-/-}



TCR α ^{-/-}TLR9^{-/-}



図11. TCR α 鎖欠損マウスにおける抗核抗体産生に対する、toll-like receptor 7/9の関与
各マウスにおける自然発生抗核抗体を蛍光抗体法にて観察した。

上段 TCR α 鎖欠損マウス (homogeneous pattern、平均80倍 (n=3))

中段 TCR α 鎖欠損TLR7欠損マウス (homogeneous pattern、平均160倍 (n=3))

下段 TCR α 鎖欠損TLR9欠損マウス (観察されず (n=5))

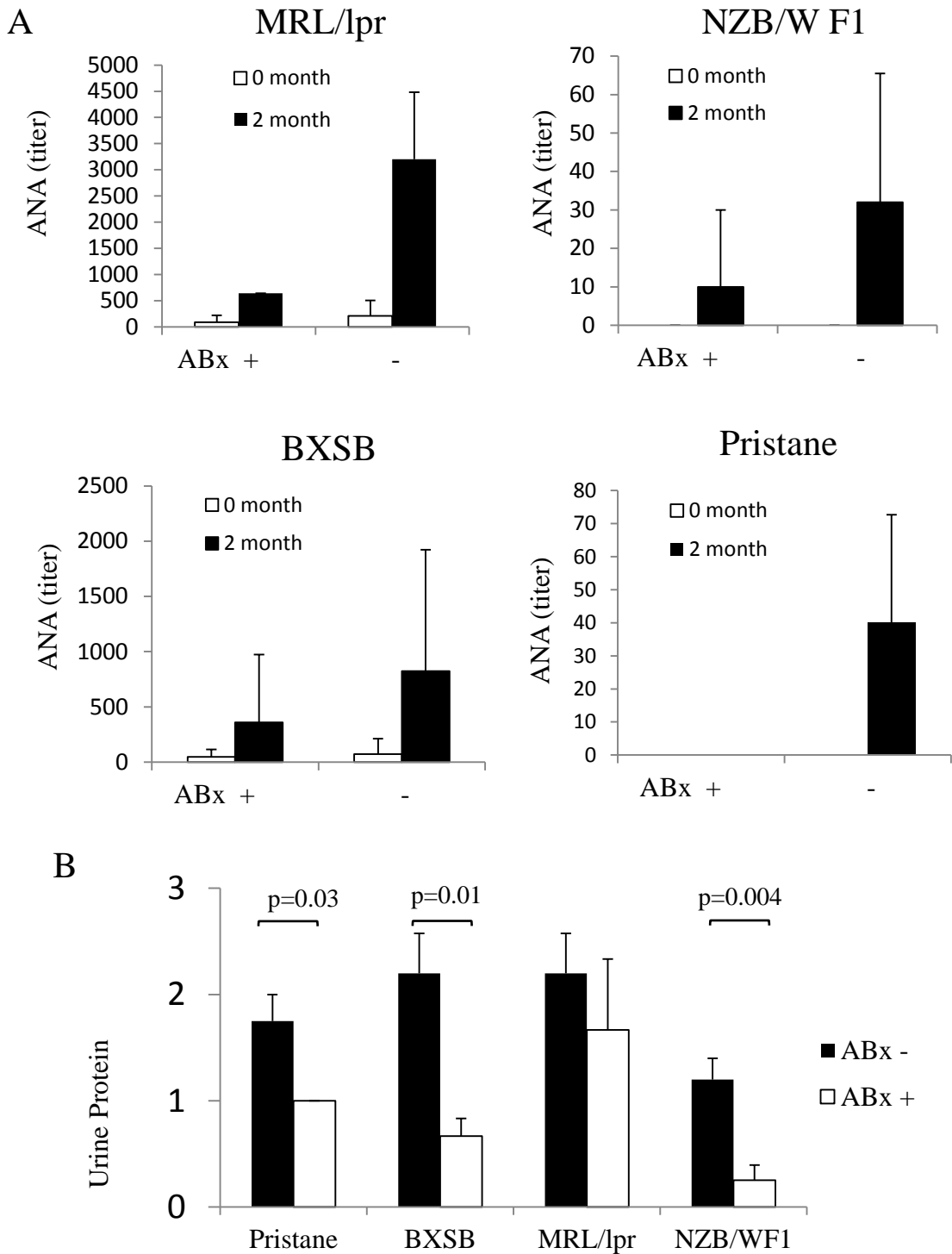


図12. 古典的ループスマウスに対する抗生剤投与の影響の評価

- A. 6週齢のMRL-lprマウスとNZB/WF1マウス、7週齢のBXSBマウス、6週齢の野生型マウスにPristaneを投与した群に対し5剤の抗生剤内服を開始し、抗生剤投与群/非投与群における0週および14週後の抗核抗体価を蛍光抗体法により評価した (mean ± SEM, n=5ずつ)。
- B. Aのマウスの17週での尿蛋白を試験紙法にて評価した (mean ± SEM, n=5ずつ)。

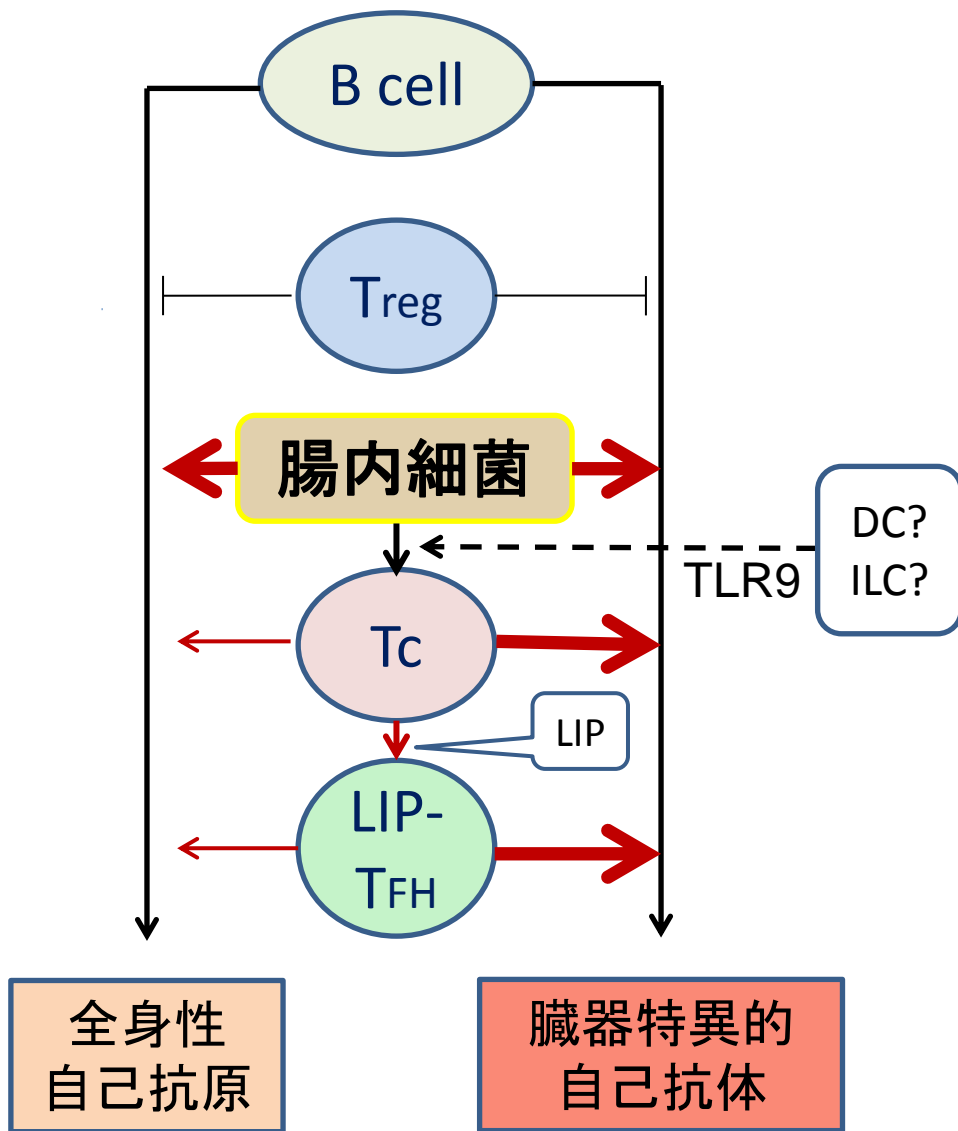


図13. 概念図

腸内細菌は、異常なB細胞応答による自己抗体産生を直接刺激するとともに、Tc細胞のlymphopenic-induced proliferationを経たLIP-T_{FH}への分化を誘導する。LIP-T_{FH}は全身性自己抗体の産生には単に促進的に作用するが、臓器特異的自己抗体の産生には必須である。いずれの経路もTregによる抑制が存在する。抗核抗体産生B細胞の出現にはTLR9が何らかの形で重要な働きをしていると考えられる。Tcによる腸内細菌の認識には、樹状細胞(DC)や自然リンパ球(ILC)が介在している可能性がある。