

論文の内容の要旨

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

序文

全身性エリテマトーデス(SLE)を始めとする様々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。だが抗核抗体の産生機序は不明であり、抗核抗体そのものが病原性を有するのか、単に自己免疫疾患発症の結果として産生されるのかも明らかではない。自然発症ループスモデルマウスとして従来用いられる MRL/lpr マウスや NZB/WF1 マウス、BXSB マウスは、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、また誘導モデルとして用いられる pristane 投与の系も、発症に時間がかかること、非生物物質の投与の生理的意義などの問題があった。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するようなマウスモデルの確立が望まれている。

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などの膠原病で見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 細胞が分裂増殖し恒常性を保つ homeostatic proliferation という生理的現象が生ずる。Lymphopenia-induced proliferation (LIP) と自己免疫疾患発症との関連は、ヒトでは SLE や関節リウマチ、多発性硬化症、マウスでは 1 型糖尿病モデルである NOD マウスにおいて報告されている。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、胸腺を欠くヌードマウスに CD4⁺CD25⁺T 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。本研究ではこの誘導系の自己抗体産生モデルとしての有用性を検討したのちに、この系における自己抗体産生機序を検討した。

腸内細菌と生体の免疫恒常性維持との関連は近年多方面で注目を浴びている。LIP においては、特に IL-7 非依存性の”rapid spontaneous proliferation”では腸内細菌に対する抗原認識の関与が報告されている。また自己免疫疾患モデルマウスを germ-free (GF) 下で生育すると、炎症性腸疾患モデルや関節炎モデル (K/BxN) マウスでは疾患の改善が見られるのに対し、NOD マウスでは悪化することから、腸内細菌には疾患促進的なものと抑制的に働くものがある可能性が考えられる。MRL/lpr マウスは GF でも疾患活動性は変化しないとの報告があるが、促進的細菌、抑制的細菌の存在を考慮すれば、腸内細菌がループス発症に関与していることは否定できない。本実験系の LIP マウスモデルにおいて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。さらに、他の自然発症ループスモデルマウスにおいても、リンパ球減少またはその他の経路を介した自己抗体産生に腸内細菌が関与して

いる可能性を考え、同様の腸管滅菌を行った。

方法と結果

CD4⁺CD25⁻ T 細胞移入ヌードマウスによる抗核抗体の産生

BALB/c 野生型マウス由来脾臓 CD4⁺細胞を CD25⁻ (Tc: T conventional) と CD25⁺ (Treg) に分離し、それぞれまたは両者を BALB/c ヌードマウスへ移入した。Treg もしくは Tc+Treg を移入した群に比べ、Tc を移入した群では IgG 型の種々の抗核抗体が 4 週以内に高率に高力価で認められた。この系の抗核抗体産生マウスモデルとしての有用性、および Treg による異常な B 細胞応答の抑制が示された。

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

Tc 移入マウスの脾臓の組織学的検討では germinal center(GC)の形成と GC 内への PD-1⁺CD4⁺ 細胞の侵入が観察された。Flow cytometry では Tc 移入群では ICOS⁺PD-1⁺CD200⁺CD4⁺T 細胞が多く認められた。CFSE ラベルした Tc 細胞を移入し CFSE の蛍光強度により分裂の評価をしたところ、PD-1⁺細胞は分裂とともに分化した細胞群であった。この細胞群がヌードマウスに内在する胸腺外発育 T 細胞に由来するものではないことを確認するため、Thy1.1⁺野生型マウス由来の Tc 細胞を Thy1.2⁺ヌードマウスに移入したところ、5 日目の脾臓において移入された Thy1.1⁺T 細胞の GC 内への侵入と ICOS⁺PD-1⁺細胞への分化を認めた。また、flow cytometry におけるこの細胞群の CXCR5 の発現は、KLH 免疫で誘導される通常の follicular helper T 細胞 (T_{FH})と比較し、低値であった。

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

RT-PCR によりこの細胞群における発現遺伝子の解析を行ったところ、Interleukin (IL)-21 および転写因子である Bcl-6 の遺伝子発現を認めた。IL-21 の産生は flow cytometry でも認められた。この細胞群と B 細胞との共培養実験を行い、抗体産生誘導能を検討したところ、B 細胞による IgG 産生の促進が見られた。以上よりこの細胞群は、表面マーカー、転写因子、機能において T_{FH} であると結論し、LIP-T_{FH} と名付けた。

TCR 特異性の抗核抗体産生と胃炎・腸炎発症への寄与

Rag2 欠損 DO11.10 マウス(RagDO)は全ての CD4⁺ T 細胞が OVA 反応性の単一 TCR を有するマウスであり、Treg を有しない。RagDO マウス由来の CD4⁺細胞をヌードマウスに移入したところ、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および抗 ds-DNA 抗体の上昇が見られた。しかし移入後 8 週目までに Tc 移入群で見られた体重減少と胃炎・腸炎発症、抗胃壁抗体の上昇は、RagDO 移入群では見られなかった。このことから、TCR 特異性は抗核抗体産生に対しては寄与しないが、腸炎発症や抗胃壁抗体等の臓器特異的自己抗体産生に対しては関与すると考えられた。

RagDO マウスから Ln-OVA-TCR α ⁺マウスへの T 細胞移入

RagDO マウス由来 CD4⁺細胞を TCR α 鎖欠損マウス(TCR α ^{-/-})に移入すると、上記と同

様に PD-1⁺ LIP⁻ T_{FH} と GC 形成が観察された。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、LIP⁻T_{FH} と GC-B 細胞の産生は見られなかった。これは TCR が cognate な自己抗原に対する強い反応性を持つ場合には、免疫寛容が誘導されることを示唆している。

RagDOsf マウスからヌードマウスへの T 細胞移入

さらに機能的 Foxp3 を欠いた RagDOsf マウスおよび単なる RagDO マウスから採取した CD4⁺ T 細胞をそれぞれ TCR α マウスに移入したところ、いずれの群においても PD-1⁺CD200⁺CD4⁺ T 細胞の産生と、GC 形成が観察された。これより、LIP⁻T_{FH} は Treg から分化する follicular regular T 細胞(T_{FR})ではないことが示された。

腸内細菌の LIP と LIP⁻T_{FH} 分化への関与

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)) を経口投与し、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。抗生剤投与群では移入細胞の分裂がほぼ消失し、PD-1⁺細胞への分化もほぼ見られなかった。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。

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 週後に ELISA にて自己抗体産生を観察した。Tc 細胞移入によって誘導される抗 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。非移入群のヌードマウスでも長期間の観察により抗 ds-DNA 抗体の上昇がみられたが、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関わらず抗体価の上昇は抑制されていた。

抗生剤の組み合わせの検討

上記の 5 種の抗生剤のうち、どの抗生剤が効果的であるかを検討するため、CPFEX、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、CPFEX を除いたものでは 5 剤投与群と比較し抑制効果が劣り、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。この結果より、CPFEX 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。

古典的ループスマウスへの抗生剤投与による治療効果

6-7 週齢の MRL/lpr マウス、NZB/WF1 マウス、BXSb マウス、また 6 週齢の BALB/c 野生型マウスの腹腔内に pristane を注射した群に対し、上記の抗生剤セットを投与し、投与 17 週目での抗核抗体価および尿蛋白半定量試験を検討した。いずれのマウスでも抗生剤非投与群で抗核抗体価の上昇および尿蛋白増加が見られたが、抗生剤投与群では抗体価の

上昇が低く尿蛋白増加も抑制されていた。

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 α ^{-/-}TLR7^{-/-}マウスと TCR α ^{-/-}TLR9^{-/-}マウスを作成した。TCR α ^{-/-}マウスでも、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 α ^{-/-}TLR9^{-/-}では抗核抗体産生が全く見られなかった。一方 TCR α ^{-/-}TLR7^{-/-}マウスでは TCR α ^{-/-}マウスと同程度の抗核抗体産生が見られた。

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 Tc 細胞を移入する系は、IgG 型の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を誘導する系として有用であることが示された。また LIP および LIP-T_{FH} 産生を介した自己抗体誘導機序において、腸内細菌が重要な役割を果たしていることが示された。

本系において産生される LIP-T_{FH} は、CXCR5 が低い、腸内細菌により誘導される、自己抗体を誘導するという点において、従来の T_{FH} とは異なる新たなサブセットである可能性が考えられた。TCR 特異性の検討により LIP-T_{FH} の誕生には cognate な抗原認識を必要としないことが示されたが、一方腸内細菌の存在は LIP に必須であり、その認識経路は解明の余地がある。これまでの報告では、spontaneous proliferation では、細菌抗原から TLR を介した刺激が DC に伝わり IL-6 を介して T 細胞分裂を促していることが判明しており、本系でもその可能性がある。リンパ球減少下の自己抗体産生機序における LIP-T_{FH} の意義については、LIP-T_{FH} が必須であるもの(抗胃壁抗体)と、LIP-T_{FH} が単に促進的に働いているもの(抗 ds-DNA 抗体等)があると考えられた。いずれの経路においても Treg による異常な B 細胞応答の抑制が見られた。

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に関わっている可能性を示唆している。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を含め、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の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。