

学位論文題名

自己免疫疾患発症モデル MRL/Mp-lpr/lpr マウス
におけるEta-1 (Early T lymphocyte activation-1)
の発現とその作用に関する研究

Studies on Expression and Function of
Eta-1 (Early T Lymphocyte Activation-1) in
autoimmune prone MRL/Mp-lpr/lpr mice

学位論文内容の要旨

はじめに

自己免疫疾患発症モデルマウスであるMRL/Mp-lpr/lpr(MRL/lpr)マウスはB細胞活性化、自己抗体の産生、腎炎などSLE様症状を呈する。MRL/lprのリンパ球の主体はCD4-CD8-CD45R+のT細胞(DNT細胞)である。本研究では、このDNT細胞がサイトカインであるEta-1 (Early T lymphocyte activation-1)を発現していることと、Eta-1のB細胞活性化との関連とについて検討した。

材料と方法

1. マウス

2から4ヶ月齢の雌を使用した。MRL/lprおよびC57BL6/J-lpr/lpr(B6/lpr)はJackson laboratoryより入手し、MRL-+/+(MRL/+), B6, Balb/cは静岡動物センターから入手し使用した。

2. 細胞分離

FACStar(Becton Dickinson)によって、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗CD45R抗体、抗sIg抗体を用いてCD4T細胞およびDNT細胞を収集した。

3. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)

IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IFN- γ , TNF- α , TNF- β , TGF- β , Eta-1, CD4, CD8, CD45R, Mac-1, β -actinについてprimerを作製しCD4T細胞およびDNT細胞のサイトカイン遺伝子発現を検索した。

4. Eta-1の精製

陰イオン交換カラム(DE52カラム)およびゲル濾過クロマトカラム(Sephadex-G 150カラム)を用いてヒト初乳よりEta-1を精製した。

5. Eta-1の検出法

血清に等容量のクエン酸バリウムを混和吸着させ、蒸留水で洗浄後、0.2Mのクエン酸ナトリウムを含むSDSサンプルバッファーに溶出させ、SDS-PAGEに電気泳動を行った。ウェスタンブロット後、ウサギ抗Eta-1抗体およびペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ抗体で免疫染色をし、発色にはジアミノベンチジンをを用いた。

6. 抗体産生

MRL/lprおよびMRL/+の脾細胞より、抗Thy1.2抗体およびウサギ血清を用いてT

細胞を除去し、B細胞を得た。BCL1(in vivo)細胞は 1×10^7 個細胞をBalb/cに腹腔内注入し、6週間後腫大した脾臓より同様にT細胞を除去して得た。96穴プレートに 1×10^4 個(BCL1は 2.5×10^4 個)接種し、リポ多糖(LPS) $0.1 \mu\text{g/ml}$, Eta-1($0 \sim 10 \mu\text{g/ml}$), 抗マウス ヴイトロネクチンレセプター抗体(RMV-7) ($0 \sim 10 \mu\text{g/ml}$)を加えた。IgMの量はELISA (サンドイッチ法) で測定した。

結果

1. MRL/lpr脾細胞における各種サイトカインmRNAの発現

MRL/lpr、MRL/+のCD4T細胞およびDNT細胞は98%以上の純度で収集することができた。MRL/lprのCD4T細胞はIL-1 α , IL-6, IFN- γ , TNF- α , TNF- β のmRNAの発現が認められたが、MRL/+のCD4T細胞では認められなかった。MRL/lprのDNT細胞ではEta-1の発現は認められたが、IL-1 α , IL-4, IL-5, IL-6のmRNAの発現は認められなかった。

2. Eta-1の精製

ヒト初乳100mlよりEta-1を1.98mg収集することができた。

3. Eta-1の抗体産生におよぼす影響

MRL/lprおよびMRL/+の脾細胞より95%以上の純度のB細胞を得た。BCL1 (in vivo)は99%以上の純度であった。MRL/lprのB細胞ではEta-1を加えることによりIgMの産生は25倍に増加した。MRL/+のB細胞でも同様の傾向が認められた。BCL1でも同様の傾向を示したが、このEta-1の作用はRMV-7によってコントロールレベルにまで抑制された。

4. lprマウス血清中のEta-1

MRL/lprおよびB6/lprでは54Kおよび28KのEta-1を認めたが、Balb/c, B6では認められなかった。また生後11日、17日のB6/lpr血清中には54KのEta-1を認めたが、28KのEta-1は認められなかった。

考察

MRL/lprのリンパ球の80%を占めるDNT細胞は、B細胞を活性化するサイトカインであるIL-4, IL-5, IL-6の遺伝子を発現していなかったが、T細胞が分泌しB細胞を活性化するサイトカインであるEta-1を常に分泌していた。更に、このEta-1の機能を検討するため、Eta-1を精製し、B細胞の活性化を測定した。Eta-1はB細胞を活性化するが、この作用はヴィトロネクチンレセプター(VNR)に対する抗体で抑制された。マクロファージはLPSによってVNRを発現することと、Eta-1はRGD(アルギニン、グリシン、アスパラギン酸) 接着アミノ酸配列によってマクロファージに接着することが知られている。Eta-1はマクロファージ上のVNRを介して刺激を与え、マクロファージが分泌するサイトカインまたは細胞間シグナルによりB細胞を活性化したと考えられた。一方、Eta-1は正常マウス血清中にはほとんど認められなかったが、MRL/lprの血清中には多量に存在した。IL-6はMRL/lpr血清中で3~6ヶ月齢で上昇することが知られているが、それに先行してEta-1の存在していたことが示された。

結論

DNT細胞が分泌し、lprマウス血清中に存在するEta-1はMRL/lprの自己免疫病態に密接に関係していることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 宮 崎 保
副 査 教 授 小 林 邦 彦
副 査 教 授 皆 川 知 紀

学 位 論 文 題 名

自己免疫疾患発症モデル MRL/Mp-lpr/lpr マウス
におけるEta-1 (Early T lymphocyte activation-1)
の発現とその作用に関する研究

Studies on Expression and Function of
Eta-1 (Early T Lymphocyte Activation-1) in
autoimmune prone MRL/Mp-lpr/lpr mice

I. 目的

自己免疫疾患発症モデルマウスであるMRL/Mp-lpr/lpr(MRL/lpr)マウスはB細胞活性化、腎炎などSLE様症状を呈する。MRL/lprのリンパ球の主体はCD4-CD8-CD45R+のT細胞(DNT細胞)である。本研究では、このDNT細胞がサイトカインであるEta-1 (Early T lymphocyte activation-1)を発現していることと、Eta-1のB細胞活性化との関連について検討した。

II. 材料と方法

1. マウス

2～4ヶ月齢の雌のMRL/lpr, MRL-+/+(MRL/+), C57BL6/J-lpr/lpr(B6/lpr), B6, Balb/c, NZB/NZW-F1を使用した。

2. 細胞分離

FACStarによって、CD4T細胞およびDNT細胞を回収した。

3. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)

IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IFN- γ , TNF- α , TNF- β , TGF- β , Eta-1, CD4, CD8, CD45R, Mac-1, β -actinについてprimerを作製しCD4T細胞およびDNT細胞のサイトカイン遺伝子発現を検索した。

4. Eta-1の精製

陰イオン交換カラム (DE52カラム) およびゲル濾過クロマトカラム (Sephadex-G 150カラム) を用いてヒト初乳よりEta-1を精製した。

5. Eta-1の検出法

クエン酸バリウム吸着濃縮法およびウェスタンブロット法により血清中のEta-1を検出した。

6. 抗体産生

MRL/lprおよびMRL/+の脾細胞よりT細胞を除去し、B細胞を得た。BCL1(in vivo)細胞は常法によって得た。B細胞をリポ多糖 (LPS) 0.1 μ g/ml, Eta-1 (0-10 μ g/ml), 抗マウスヴィトロネクチンレセプター抗体 (RMV-7) (0-10 μ g/ml) と共培養し、IgMを測定 (ELISA法) した。

III. 結果

1. MRL/lpr脾細胞における各種サイトカインmRNAの発現

CD4T細胞およびDNT細胞は98%以上の純度で回収できた。MRL/lprのDNT細胞ではEta-1の発現は認められたが、IL-1 α , IL-4, IL-5, IL-6は認められなかった。CD4T細胞ではEta-1の発現は認められなかった。

2. Eta-1の精製

ヒト初乳100mlよりEta-1を1.98mg収集することができた。

3. Eta-1の抗体産生におよぼす影響

MRL/lprおよびMRL/+の脾細胞より95%以上の純度のB細胞を得た。BCL1 (in vivo) は99%以上の純度であった。MRL/lprのB細胞ではEta-1を加えることによりIgMの産生は25倍に増加した。MRL/+のB細胞でも、BCL1でも同様の傾向を示した。このEta-1の作用はRMV-7によってコントロールレベルにまで抑制された。

4. lprマウス血清中のEta-1

MRL/lprおよびB6/lprでは54Kおよび28KのEta-1を認めたが、Balb/c, B6では認められなかった。一方、生後11日、17日のB6/lpr血清中には54KのEta-1を認めたが、28KのEta-1は認めなかった。

IV. 考察

MRL/lprのリンパ球の80%を占めるDNT細胞はIL-4, IL-5, IL-6の遺伝子を発現していなかったが、B細胞を活性化するサイトカインであるEta-1を常に分泌していた。更にこのEta-1の機能を検討するため、Eta-1を精製しB細胞の活性化を測定した。Eta-1はB細胞を活性化するが、この作用はヴィトロネクチンレセプター (VNR) に対する抗体で抑制された。マクロファージはLPSによってVNRを発現することと、Eta-1はRGD接着アミノ酸配列によってマクロファージに接着することが知られている。Eta-1はマクロファージ上のVNRを介して刺激を与え、マクロファージが分泌するサイトカインまたは細胞間シグナルによりB細胞を活性化したと考えられた。一方、Eta-1は正常マウス血清中にはほとんど認められなかったが、MRL/lprの血清中には多量に存在した。IL-6がMRL/lpr血清中で3-6ヶ月齢で上昇することが知られているが、それに先行

してEta-1の存在が示された。以上より、DNT細胞が分泌し、l p r マウス血清中に存在するEta-1はMRL/lprの自己免疫病態に深く関わっていることが示唆された。

以上より、本研究は博士（医学）の学位論文として妥当なものと判断される。