

博士(医学) 浅野 美佐子

学位論文題名

Endogenous Gamma Interferon Is Essential
in Granuloma Formation Induced
by Glycolipid-Containing Mycolic in Mice

(*Rhodococcus aurantiacus* の誘導する
肉芽腫形成における内在性 IFN- γ の意義)

学位論文内容の要旨

研究目的

Rhodococcus や *Mycobacterium*、*Corynebacterium* 等アクチノミセス類の細胞壁には疎水性の強いミコール酸が多く含まれている。この細胞壁脂質成分はマウスに肉芽腫形成誘導能を有する。肉芽腫は、ある種の異物に対する慢性局所性の炎症であり、主に単球／マクロファージ及びマクロファージ由来の類上皮細胞、リンパ球が集積して惹起された病変である。肉芽腫形成には、活性化されたマクロファージや T 細胞からのサイトカイン産生が重要であるといわれているが、その詳細については未だに明らかにされていない。本研究において、*Rhodococcus aurantiacus* (*R.aurantiacus*) またはその細胞壁成分であるミコール酸含有糖脂質 (G a GM) により誘導されるマウス肉芽腫形成に果たす内在性 IFN- γ の役割について多角的に検討した。

材料と方法

感染マウス：5 週齢 ddY マウスに *R.aurantiacus* (10^8 CFU/マウス) または G a GM (400 μ g/マウス) (沢井製薬大阪研究所加藤敬香博士より恵与された) を静脈内投与した。

モノクローナル抗体 (mAb) の投与：ラット抗マウス IFN- γ mAb (R4-6A2) (1 mg/マウス) は、感染 2 時間前あるいは 1、2 週後に静脈内投与した。ラット抗 CD4 mAb (GK1.5)、ラット抗 CD8 mAb (53-6.72) (400 μ g/マウス) は、感染 1 日前あるいは 1 週後に投与した。マウス抗 NK1.1 mAb (PK136) (500 μ g/マウス) は感染 3 日前または 1 週後に投与した。対照群には同量の正常ラットグロブリンまたは正常マウスグロブリンを投与した。

IFN- γ 測定：臓器抽出液及び血清中の IFN- γ の測定は、ラット抗マウス IFN- γ mAb 及びウサギ抗マウス IFN- γ 抗血清を用いたサンドイッチ ELISA 法によって行った。

組織学的検索：肝臓、脾臓、肺のH & E染色標本を用いて顕微鏡1視野内に認められる肉芽腫の面積（Granuloma size）及び数（Granuloma number）を測定した。その積をGranuloma areaとした。

免疫組織染色：G a GM投与後3週目の脾臓切片を用いて、IFN- γ 陽性細胞を酵素抗体法（ABC法）により検出した。一次抗体には、抗IFN- γ mAb（R4-6A2）を用いた。

結果

(1) 肉芽腫形成

感染後、肉芽腫は1週目頃より肝臓、脾臓、肺に形成されはじめ、3週目には成熟した肉芽腫が観察された。肉芽腫は、非壊死性であり リンパ球、単球、類上皮細胞から構成されていた。

(2) 内在性IFN- γ の産生

組織抽出液中の内在性IFN- γ は、感染直後に一過性に上昇し、再度3週目に肉芽腫形成に相関して上昇した。組織抽出液と比較すると低レベルではあるが、血清においてもIFN- γ が3週目をピークに検出された。

(3) IFN- γ 陽性細胞の検出

免疫組織染色法により脾臓組織内でのIFN- γ 陽性細胞を検出した。IFN- γ を産生する細胞は、肉芽腫内またはその周囲に存在した。

(4) 肉芽腫形成とIFN- γ 産生のG a GM濃度依存性

G a GMの投与量を200 μ gから800 μ gに増加させると、IFN- γ 産生と肉芽腫形成は、濃度依存的に上昇した。

(5) 抗IFN- γ mAbの肉芽腫形成に及ぼす効果

肉芽腫形成は抗IFN- γ mAb投与により有意に抑制された。特に初期のIFN- γ を中和した場合は肉芽腫の数が減少し、後期のIFN- γ を中和した場合は単球から類上皮細胞への分化及び肉芽腫の発達が抑制された。

(6) T細胞またはナチュラルキラー（NK）細胞枯渇によるIFN- γ 及び肉芽腫形成に及ぼす影響

初期のIFN- γ 産生は抗NK1.1mAbにより、後期のIFN- γ 産生は抗CD8mAbにより抑制された。肉芽腫形成は、感染前の抗NK1.1mAb処理、または感染後1週日の抗CD8mAb処理により抑制された。

考察

この研究は、*R.aurantiacus*及びG a GMにより誘導された内在性IFN- γ が、肉芽腫形成に重要な役割を担っていることを示している。内在性IFN- γ は2相性に産生され、後期のIFN- γ は肉芽腫の発達と強い相関性を示した。抗体投与実験より、初期のIFN- γ はNK細胞から産生されT細胞の免疫応答性を高めたりマクロファージの集積、活性化に働き、後期のIFN- γ はCD8⁺T細胞から産生され、単球の類上皮細胞への分化や肉芽腫の発達に関与することが示唆された。本研究の成果は、その後発表されたBCG感染におけるIFN- γ リセプター遺伝子ノックアウトマウスを使用した研究と、住血吸虫感染における抗IFN- γ mAb投与実験の成果と完全に一致し

た。IFN- γ は一般的にCD4 $^+$ T細胞から產生されることが知られているが、Nakaneらはリステリア感染において内在性IFN- γ はCD4 $^+$ T細胞のみならず、NK細胞やCD8 $^+$ T細胞からも產生されることを証明した。一方*R.aurantiacus*により誘導された肉芽腫は、IFN- γ と同様に初期のNK細胞と後期のCD8 $^+$ T細胞に応答性を示した。リステリア、住血吸虫やリューシュマニア感染により誘導される肉芽腫は、CD4 $^+$ T細胞に依存的であることが報告されている。*R.aurantiacus*による肉芽腫形成はIFN- γ 產生に依存的であり、その担当細胞がNK細胞からCD8 $^+$ T細胞に変化する点は興味深いところである。

結論

- (1) *R.aurantiacus*感染及び*R.aurantiacus*由来G a GMの静脈内投与により、同様の経過で3週目をピークに肝臓、脾臓、肺に肉芽腫が形成された。
 - (2) 内在性IFN- γ は、各臓器において2相性に產生され、感染直後のIFN- γ はNK細胞から、感染後1-3週目のIFN- γ は、CD8 $^+$ T細胞から產生された。肉芽腫形成もまた初期のNK細胞と後期のCD8 $^+$ T細胞に応答性を示した。
 - (3) 内在性IFN- γ は、肉芽腫病変内に局在することが、免疫組織染色により明らかになった。
 - (4) 肉芽腫形成は、抗IFN- γ mAb投与により抑制された。特に初期のIFN- γ を中和した場合は肉芽腫の数が減少し、後期のIFN- γ を中和した場合は单球から類上皮細胞への分化が抑制された。
- 以上のことから、肉芽腫病変局所においてNK細胞とCD8 $^+$ T細胞から產生されたIFN- γ は、肉芽腫の形成及び発達に必須の因子である。

学位論文審査の要旨

主査 教授 皆川知紀
副査 教授 長嶋和郎
副査 教授 小野江和則

学位論文題名

Endogenous Gamma Interferon Is Essential
in Granuloma Formation Induced
by Glycolipid-Containing Mycolic in Mice

(*Rhodococcus aurantiacus* の誘導する
肉芽腫形成における内在性 IFN- γ の意義)

I 研究目的

*Rhodococcus*や*Mycobacterium*、*Corynebacterium*等アクチノミセス類の細胞壁には疎水性の強いミコール酸が多く含まれている。この細胞壁脂質成分はマウスに肉芽腫形成能を有する。一方肉芽腫形成には、マクロファージやT細胞からのサイトカイン産生が重要であるといわれているが、その詳細については明らかにされていない。本研究において、*Rhodococcus aurantiacus* (*R.aurantiacus*) またはその細胞壁成分であるミコール酸含有糖脂質 (G a GM) により誘導されるマウス肉芽腫形成に果たす内在性 IFN- γ の役割について多角的に検討した。

II 材料と方法

感染マウス： 5週齢 ddYマウスに *R.aurantiacus* (10^8 CFU/マウス) または G a GM ($400\mu g$ /マウス) (沢井製薬大阪研究所加藤敬香博士より恵与された) を静脈内投与した。

モノクローナル抗体 (mA b) の投与：ラット抗マウス IFN- γ mA b (R4-6A2) ($1 mg$ /マウス) は、感染2時間前あるいは1、2週後に静脈内投与した。ラット抗 CD4 mA b (GK1.5)、ラット抗 CD8 mA b (53-6.72) ($400\mu g$ /マウス) は、感染1日前あるいは1週後に投与した。マウス抗NK1.1mA b (PK136) ($500\mu g$ /マウス) は感染3日前または1週後に投与した。対照群には同量の正常ラットグロブリンまたは正常マウスグロブリンを投与した。

IFN- γ 測定： 臓器抽出液中の IFN- γ の測定は、ラット抗マウス IFN- γ mA b 及びウサギ抗マウス IFN- γ 抗血清を用いたサンドイッチELISA法によつ

て行った。

組織学的検索：肝臓、脾臓、肺のH & E染色標本を用いて顕微鏡1視野内に認められる肉芽腫の面積（Granuloma size）及び数（Granuloma number）を測定した。その積をGranuloma areaとした。

免疫組織染色：G a GM投与後3週目の脾臓内のIFN- γ 陽性細胞を酵素抗体法（ABC法）により検出した。一次抗体には、抗IFN- γ mAb（R4-6A2）を用いた。

III 結果

(1) 肉芽腫形成：感染後3週目をピークに、リンパ球、単球、類上皮細胞から構成された肉芽腫が肝臓、脾臓、肺に形成された。

(2) 内在性IFN- γ の産生：組織抽出液中の内在性IFN- γ は、感染直後に一過性に上昇し、再度3週目に肉芽腫形成に相関して上昇した。

(3) IFN- γ 陽性細胞の検出：免疫組織染色法により脾臓組織内のIFN- γ 陽性細胞を検出した。IFN- γ を産生する細胞は、肉芽腫病変内またはその周囲に存在した。

(4) 抗IFN- γ mAbの肉芽腫形成に及ぼす効果：肉芽腫形成は、抗IFN- γ mAb投与により有意に抑制された。特に初期のIFN- γ を中和した場合は肉芽腫の数が減少し、後期のIFN- γ を中和した場合は肉芽腫の発達が抑制された。

(6) T細胞またはナチュラルキラー（NK）細胞に対する抗体のIFN- γ 産生及び肉芽腫形成に及ぼす影響：初期のIFN- γ 産生は抗NK1.1mAbにより、後期のIFN- γ 産生は抗CD8mAbにより抑制された。肉芽腫形成は、感染前の抗NK1.1mAb処理、または感染後1週日の抗CD8mAb処理により抑制された。

IV 考察

(1) *R.aurantiacus* またはG a GMにより肝臓、脾臓、肺に肉芽腫が形成された。

(2) 内在性IFN- γ は2相性に産生され、後期のIFN- γ は肉芽腫の発達と相関性を示した。

(3) T細胞またはNK細胞に対する抗体投与実験から、内在性IFN- γ の産生と肉芽腫形成は、初期のNK細胞と後期のCD8⁺T細胞に応答性を示した。

(4) 肉芽腫形成は、抗IFN- γ mAbにより抑制された。初期のIFN- γ は単球、T細胞の集積に働き、後期のIFN- γ は単球の類上皮細胞への分化及び肉芽腫の発達に関与することが示唆された。

以上の結果、*R.aurantiacus* またはG a GMにより誘導された内在性IFN- γ は、肉芽腫形成に重要な役割を担っていることが明らかになった。また初期のNK細胞と後期のCD8⁺T細胞は、内在性IFN- γ の産生を介して肉芽腫形成を調節している可能性が示唆された。

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。