

学位論文題名

ラットにおける Thy-1 発現誘導とその臓器特異性

—急性拒絶反応と肉芽腫性炎症反応における検討—

学位論文内容の要旨

ラット Thy-1 は *in vivo*, *in vitro* でその発現が調節されており、最近血管透過性亢進を媒介する機能分子であることが示された。すなわち血管内皮をはじめとする細胞群の Thy-1 発現が誘導され各種炎症病態を修飾する可能性が考えられる。そこでラット Thy-1 抗原の発現につき各臓器での発現と肺、腎、皮膚の同種移植拒絶反応時および肉芽腫性炎症時における発現誘導を検討した。

移植モデルはドナーに LEJ/Hkm (RT-1^l)、レシピエントに WKAH/Hkm (RT-1^k)を用いて左同所性肺移植術、右異所性腎移植術、皮膚移植術を施行した。また肉芽腫性炎症モデルはフロイント完全アジュバント（以下 FCA）を各臓器に注入して作製した。

正常ラットにおいて、末梢血単核球を除き脳、胸腺、心、肺、肝、脾、腎、皮膚、リンパ節において Thy-1 mRNA の発現が RT-PCR 法にて同定されたが、ノーザンブロット法で明らかに認められる量を発現するのは脳、胸腺、腎であった。さらにウエスタンブロット法による Thy-1 蛋白の存在は脳、胸腺、腎と、ノーザンブロット法で mRNA を検出できる臓器に限られていた。

皮膚では FCA 誘発肉芽腫性炎症局所に Thy-1 の発現誘導が観察された。さらに同種皮膚移植拒絶局所においても Thy-1 の発現誘導が認められた。また抗 Thy-1 抗体 (TM78-8)を用いて免疫組織学的に Thy-1 の発現誘導部位を検索すると、いずれの場合でも真皮の血管内皮細胞に陽性であった。したがって真皮の血管内皮細胞は各種の炎症において Thy-1 の誘導が起りやすいと考えられる。Thy-1 の natural ligand の同定はまだ行われていない。しかし、FCA 誘発炎症局所において Thy-1 を抗 Thy-1 抗体により刺激すると血管透過性亢進が引き起こされることが既に示されているので、同様に同種皮膚移植拒絶片内においても Thy-1 を介した透過性調節がおこり拒絶の病像を修飾している可能性が考えられた。

一方腎では、FCA 誘発炎症局所の明らかな Thy-1 発現増強は見られなかった。しかし、同種腎移植拒絶片局所においては Thy-1 の蛋白レベルでの発現増強が認められた。この蛋白発現増強に伴ってノーザンブロット法での mRNA の発現増強が認められた。また免疫組織学的に腎拒絶片内で Thy-1 の発現が誘導された細胞を検索すると糸球体外の血管内皮細胞ではなく、尿細管上皮細胞であった。

また肺においては FCA 誘発肉芽腫性炎症反応、同種移植拒絶反応のいずれにおいても Thy-1 の発現誘導は蛋白レベルおよびメッセージレベルのいずれにおいても認められなかった。しかし新たにドナーと同系の LEJ ラットからの肺由来血管内皮細胞培養株（以下 RLEC）を樹立したと

ころ、Thy-1 の細胞表面上の発現が誘導されていた。ラットの下大静脈由来の血管内皮細胞株上の Thy-1 抗原の発現は IL-1 産生を介する自己活性化によっていることが既に示されているが、それと同様の機構が RLEC においても作用した結果と考えられ、内皮細胞株樹立に伴う変化と考えられた。RLEC に IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6 といったサイトカインで刺激を加えても、それ以上の Thy-1 の発現は増強せず、自己活性化による Thy-1 発現誘導は既に飽和状態に達していると考えられた。その一方で生体内においては、FCA 誘発炎症・移植拒絶反応由来の各種サイトカインによる刺激によってもなお血管内皮細胞を始めとする肺の構成細胞に Thy-1 発現誘導は認められなかった。

肺、腎、皮膚における同種移植片の拒絶は典型的な細胞性拒絶反応である。これはリンパ球・単球系細胞浸潤の主体となる反応で互いによく類似している。皮膚拒絶片ではこの反応時に Thy-1 発現を介した血管透過性亢進が病態を修飾していると考えられる。一方肺血管においては Thy-1 の発現誘導が見られないことから拒絶時に Thy-1 発現を介する血管透過性亢進機構が働いていないと考えられる。FCA 誘発炎症はリンパ球・単球に好中球を加えた細胞構成で同種拒絶と異なり、組織の局所的変性も高度である。この炎症型の相違から腎における拒絶では Thy-1 誘導が見られ、FCA 炎症時に見られない結果になったと考えられる。一方肺では FCA 炎症でも Thy-1 は発現せず、肺は生体内でいろいろな刺激によっても Thy-1 の関与する血管透過性亢進を受けにくいと考えられた。肺血管透過性亢進は生体にとって、肺浮腫を続発し致死的になる可能性が大きく、厳重な制御が Thy-1 発現機構に働いていると考えられた。

今回の研究により Thy-1 の発現誘導現象には強い臓器特異性があり、しかも発現臓器の中でも細胞特異性が存在することが示された。われわれが行った拒絶モデル・炎症モデルによる発現増強は、主として mRNA 量の調節による転写レベルでの制御であった。一方 Thy-1 発現の臓器特異性・細胞特異性には、遺伝子レベルにおける制御が関与するという報告がみられる。マウスでは T リンパ球上の Thy-1 抗原の発現調節は転写・翻訳レベルの各段階で受けるとの報告に加えて、Thy-1 抗原発現には mRNA の発現だけでなく、さらに何らかのシグナルが必要であることも報告されている。一方 Thy-1 の発現調節については細胞種特異的な repressor の存在が示唆されている。今回 Thy-1 の発現しなかった肺においてはそのような repressor が臓器特異的に発現され、炎症性サイトカイン等による Thy-1 の発現刺激にも抵抗性を示している可能性も考えられる。

以上から Thy-1 抗原の発現誘導には臓器特異的な制御機構が認められ、血管透過性調節機構を介して皮膚同種移植の拒絶像が修飾される可能性が示唆された。また同種腎移植においても尿細管上皮に発現誘導された Thy-1 が何らかの拒絶像修飾を示す可能性が想定された。最後に Thy-1 抗原発現の臓器特異的制御機構について解析を進めることは、炎症や移植臓器拒絶における病態形成における Thy-1 抗原の役割について知見を得ることに有用である。加えて各臓器においてそれぞれ特徴のある急性拒絶反応のメカニズムの病因論的理解に役立つ新しい知見につながる可能性があり、意義深いことと思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 藤 紘 之

副 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 上 出 利 光

学位論文題名

ラットにおける Thy-1 発現誘導とその臓器特異性

—急性拒絶反応と肉芽腫性炎症反応における検討—

ラットThy-1はin vivo, in vitroでその発現が調節されており、最近血管透過性亢進を媒介する機能分子であることが示された。これより血管内皮をはじめとする細胞群にThy-1が発現誘導され各種炎症病態を修飾する可能性が考えられる。そこでラットThy-1抗原の発現につき肺、腎、皮膚の同種移植拒絶反応時および肉芽腫性炎症時における発現誘導を検討した。

移植モデルはドナーにLEJ(RT1^l), レシピエントにWKAH(RT1^k)を用いて左同所性肺移植術, 右異所性腎移植術, 皮膚移植術を施行した。また肉芽腫性炎症モデルはフロイント完全アジュバント(FCA)を各臓器に注入して作製した。

皮膚ではFCA誘発肉芽腫性炎症局所にThy-1の発現誘導が観察された。さらに同種皮膚移植拒絶局所においてもThy-1の発現誘導が認められた。また抗Thy-1抗体(TM78-8)を用いて免疫組織学的にThy-1の発現誘導部位を検索すると、いずれも真皮の血管内皮細胞に陽性であった。

一方腎では、FCA誘発炎症局所の明らかなThy-1発現増強は見られなかった。しかし、同種腎移植拒絶片局所においてはThy-1の発現増強が認められた。この蛋白発現増強に伴ってThy-1 mRNAの発現増強が認められた。また免疫組織学的に腎拒絶片内でThy-1の発現が誘導された細胞を検索すると尿細管上皮細胞であった。

また肺においてはFCA誘発肉芽腫性炎症反応、同種移植拒絶反応のいずれにおいてもThy-1抗原およびmRNA発現誘導は認められなかった。しかし新たにドナーと同系のLEJラットからの培養肺血管内皮細胞(RLEC)を樹立したところ、Thy-1の細胞表面上の発現が誘導されていた。またRLEに各種サイトカインで刺激を加えてもそれ以上のThy-1の発現は増強せず、自己活性化によるThy-1発現誘導は既に飽和状態に達していると考えられた。その一方で生体内においては、FCA誘発炎症・移植拒絶反応由来のサイトカインによる刺激によってもなお血管内皮細胞を始めとする肺の構成細胞にThy-1発現誘導は認められなかった。

肺、腎、皮膚における同種移植片の拒絶は典型的な細胞性拒絶反応である。これはリンパ球・単球系細胞浸潤の主体となる反応で互によく類似している。皮膚拒絶片ではThy-1発現を介した血管透過性亢進が病態を修飾していると考えられる。一方肺血管においてはThy-1の発現誘導が見られないことから拒絶時にThy-1発現を介する血管透過性亢進機構が働いていない。FCA誘発炎症はリンパ球・単球に好中球を加えた細胞構成で同種拒絶と異なり、組織の局所の変性も高度である。この炎症型の相違から腎における拒絶ではThy-1誘導が見られ、FCA炎症時に見られない結果になったと考えられる。一方肺ではFCA炎症でもThy-1は発

現せず、肺は生体内でいろいろな刺激によってもThy-1の関与する血管透過性亢進を受けにくく、厳重な制御がThy-1発現機構に働いている可能性がある。

本研究によりThy-1抗原の発現誘導には臓器特異性があり、その制御は主に転写レベルで行われていることが確認された。また肺移植では、Thy-1急性拒絶反応への関与は認められなかった。皮膚移植ではThy-1の媒介する血管透過性調節機構を介して急性拒絶像が修飾される可能性が示唆された。一方腎移植においても尿細管上皮に発現誘導されたThy-1が何らかの拒絶像修飾を示す可能性が想定された。

口頭発表において上出利光教授よりThy-1発現の臓器特異性の遺伝子レベルでの発現調節機構について、転写因子の種による違いについて、FCA注入モデルの長期経過観察について、臓器によりその血管透過性を介し炎症反応を修飾しThy-1発現に違いが生じている可能性について、および抗Thy-1抗体投与による病態修飾について、吉木 敬教授よりヒトにおけるThy-1発現について、ヒトにおけるThy-1の機能について、抗Thy-1抗体を使用した実験について、Thy-1のnatural ligandについて、Thy-1 mRNAが末梢血に陰性であるにも関わらず、脾・リンパ節に陽性である理由について、およびラットにおける末梢T cellにおけるThy-1 mRNA発現について、脇坂明美助教授より腎移植の急性拒絶反応でThy-1発現部位が血管内皮ではなく尿細管上皮であることについて、加藤紘之教授より肺でThy-1発現を認めなかった機序について、3つの臓器の結果の違いが生じた機序について、および肺移植の困難性についての質問があったが、申請者はおおむね妥当な回答をしていた。

本研究は急性拒絶反応時におけるThy-1抗原発現誘導の臓器特異性およびその制御機構について初めて報告したものである。この結果は炎症や移植臓器拒絶反応におけるThy-1抗原の役割についての知見、および各臓器においてそれぞれ特徴のある急性拒絶反応のメカニズムの病因論的理解を深める上でその意義は大きく、審査員一同、本論文は博士(医学)の学位授与に値するものと判定する。