

学 位 論 文 題 名

Experimental Autoimmune Panencephalitis and Uveoretinitis  
Transferred to the Lewis Rat by T Lymphocytes Specific for the  
S100  $\beta$  Molecule, a Calcium Binding Protein of Astroglia

（アストログリアのカルシウム結合性蛋白であるS100  $\beta$  分子に特異的なTリンパ球によって  
Lewisラットに移入された実験的自己免疫性全脳炎およびぶどう膜・網膜炎）

学位論文内容の要旨

実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）は脱髄性炎症性疾患である多発性硬化症（MS）の実験モデルとして、ミエリン構成蛋白、特にミエリン塩基性蛋白（MBP）を標的にした細胞性免疫を中心に研究されてきた。実際、EAEはMBP特異的T細胞（CD4<sup>+</sup>）の受動移入により誘導される。しかしその病変部位は比較的下部脊髄に局限されていること、またときにMSに合併する網膜炎などの眼病変を引き起こさないことなどを考えると、このモデルがMSの一般的な実験モデルとして適当なのか、それとも特別なケースなのか、明らかでない点が多い。

我々は、EAEを誘導するのに必要な中枢神経系（CNS）蛋白の構造的および機能的特徴を明らかにするために、MBPとは産生部位、生化学的特徴の異なる非ミエリン系蛋白であるS100  $\beta$  を用い、その脳炎惹起性について検討した。S100  $\beta$  はCNSから最初に分離されたカルシウム結合性蛋白で、91個のアミノ酸からなる可溶性の酸性蛋白である。91個のうち、ラットとウシとの間では4個、ラットとヒトとの間では2個のアミノ酸が異なるのみであり、かなり保存的な蛋白である。オリゴデンドロサイトに産生されるMBPとは異なり、S100  $\beta$  はCNSではアストロサイトにより、その他末梢神経系ではSchwann細胞や網膜組織のMüller細胞により産生される。またアストロサイトは活性型のS100  $\beta$  を分泌し、これは髄液中でも検出される。

先ず、ウシS100  $\beta$  で免疫されたラットのリンパ節細胞より特異的T細胞ラインを樹立し、そのエピトープ特異性、表面マーカー、T細胞受容体（TCR）V $\beta$  遺伝子の使用、サイトカイン産生、細胞障害性を調べ、さらにはこれらT細胞の受動移入による脳炎惹起性を臨床的、病理組織学的に、MBP特異的T細胞によるEAEとの比較において検討した。

樹立されたS100  $\beta$  特異的T細胞ラインはすべてW3/13<sup>+</sup>（全T細胞、顆粒球）、W3/25<sup>+</sup>（CD4）、OX8<sup>-</sup>（CD8）で、MBP特異的T細胞と全く同じであった。また使用されているTCRも同じ $\alpha/\beta$ であった。しかしV $\beta$  遺伝子の使用を調べると、脳炎惹起性MBP特異的T細胞のように、ある特定の遺伝子（V $\beta$  8.2）を多用す

るような傾向はみられなかった。中にはV $\beta$  16を多用する細胞ライン(50~100%)もいくつかみられたが、この使用程度と脳炎惹起性との間に関連性は認められなかった。サイトカイン産生の面からみると、これらのT細胞はやはりMBP特異的T細胞と同じく、INF- $\gamma$ 、IL-2を産生する、いわゆるTh-1様の細胞であった。また興味あることに、これらのラットT細胞ラインのほとんどはS100 $\beta$ のエピトープ(アミノ酸残基76-91)に対して、RT1B(主要組織適合抗原MHCクラスII)拘束性に強い自己免疫反応を示した。

正常な同系ラットへのS100 $\beta$ 特異的T細胞の受動移入により、病理学的にはCNSにおいて広範な強い炎症細胞浸潤が観察されたが、臨床的には神経障害がわずかに見られるのみであった。MBP特異的T細胞の受動移入により誘導される重篤なEAEと比較してみると、この結果は、CNSへのED1+マクロファージの遊走が減少していることに関連していると思われた。さらに*in vitro*ではMBP特異的T細胞と異なり、S100 $\beta$ 特異的T細胞はアストロサイトに対して細胞障害性を示さなかった。病理組織学的にも炎症部位の分布において、両者の間に大きな差が認められた。MBPのモデルに比べて、S100 $\beta$ の場合は脊髄ばかりでなく、全脳さらには眼組織の一部であるぶどう膜や網膜にまで強い炎症が及んでいた。CNSの白質および灰白質全体における広範な病変の分布を見ると、従来のEAEと区別するために、この新しいモデルはExperimental Autoimmune Panencephalitis(EAP)と呼ぶ方が相応しいと思われる。標的となる自己抗原の性質は、それにより誘導される自己免疫疾患の臨床的、病理組織学的な特徴に多大な影響を与えるが、今回の実験は、非ミエリン系のCNS自己蛋白抗原が自己免疫性T細胞反応を引き起こすことを始めて示したものである。MBPもS100 $\beta$ もCNSに広範に存在する蛋白であることから、このEAPは単に自己抗原の分布の結果として引き起こされたものではなく、CNSの部位によって特異的自己抗原の処理および提示能力に差があることを示唆している。一方、このS100 $\beta$ 特異的T細胞によって誘導される疾患モデルは、多くの点でMSに似ている。例えば、その緩徐な臨床経過、また脳や眼組織の病変などはミエリン蛋白に誘導されるEAEでは見られなかった。以上より、非ミエリン系の自己抗原もCNSの炎症性疾患の免疫病理において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦

副 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 田 代 邦 雄

学 位 論 文 題 名

## Experimental Autoimmune Panencephalitis and Uveoretinitis Transferred to the Lewis Rat by T Lymphocytes Specific for the S100 $\beta$ Molecule, a Calcium Binding Protein of Astroglia

(アストログリアのカルシウム結合性蛋白であるS100 $\beta$ 分子に特異的なTリンパ球によってLewisラットに移入された実験的自己免疫性全脳炎およびぶどう膜・網膜炎)

【緒言】実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)は脱髄性炎症性疾患である多発性硬化症(MS)の実験モデルとして、ミエリン構成蛋白、特にミエリン塩基性蛋白(MBP)を標的にした細胞性免疫を中心に研究されてきた。実際、EAEはMBP特異的T細胞(CD4+)の受動移入により誘導される。しかしその病変部位は比較的下部脊髄に局限され、ときにMSに合併する網膜炎などの眼病変を引き起こさないことなどから、このモデルがMSの一般的な実験モデルとして適当なのか、それとも特別なケースなのか、明らかでない。さらに、ミエリン蛋白だけが中枢神経系(CNS)の炎症性疾患に関与しているのかも疑問である。そこでEAEを誘導するのに必要なCNS蛋白の構造的および機能的特徴を明らかにするために、MBPとは産生部位、生化学的特徴の異なる非ミエリン系蛋白であるS100 $\beta$ を用い、その脳炎惹起性について検討した。S100 $\beta$ はCNSから最初に分離されたカルシウム結合性蛋白で、91個のアミノ酸からなる可溶性の酸性蛋白である。91個のうち、ラットとウシとの間では4個、ラットとヒトの間では2個のアミノ酸が異なるのみで、かなり保存的な蛋白である。オリゴデンドロサイトに産生されるMBPとは異なり、S100 $\beta$ はCNSではアストロサイトにより、末梢神経系ではSchwann細胞や網膜組織のMuller細胞により産生される。またアストロサイトは活性型のS100 $\beta$ を分泌し、これは髄液中でも検出される。

【方法】ウシS100 $\beta$ で免疫したLewisラットのリンパ節細胞より多数の特異的T細胞ラインを樹立し、モノクローナル抗体によるFACS解析によりその表面マーカー、T細胞受容体(TCR)V $\beta$ 遺伝子の使用を調べた。次にいくつかのT細胞ラインの培養上清を用いて、サイトカイン産生能(INF- $\gamma$ 、IL-2、IL-6およびTNF $\alpha$ )を定量的に調べた。主要組織適合抗原(MHC)拘束性については、抗MHCモノクローナル抗体を用いたブロッッキングアッセイにより検討した。エピトープ特異性は、ラットS100 $\beta$ のアミノ酸配列に準じて作成された16種類の合成ペプチドを用意し、それに対する各S100 $\beta$ 特異的T細胞ラインの増殖反応の強さにより評価した。また新生仔Lewisラット脳から得られたアストロサイトを $^{51}\text{Cr}$ でラベルし、それを標的細胞にして細胞障害性について調べた。最後に正常ラットへのこれらラインT細胞の受動移入による脳炎惹起性について、臨床的、病理免疫組織学的に検討した。

【結果および考察】樹立されたS100 $\beta$ 特異的T細胞ラインはすべてW3/13+ (全T細胞、顆粒球) W3/25+ (CD4)、OX8-(CD8)で、MBP特異的T細胞の表面マーカーと全く同じであった。また使用されているTCR定常部も同じ $\alpha/\beta$ であった。しかしV $\beta$ 遺伝子の使用を調べると、脳炎惹起性MBP特異的T細胞のように、ある特定の遺伝子(V $\beta$ 8.2)を多用するような傾向はみられなかった。中にはV $\beta$ 16を多用する(50~100%)細胞ラインも

いくつかみられたが、この使用程度と脳炎惹起性との間に関連性は認められなかった。

サイトカイン産生の面からみると、これらのT細胞はやはりMBP特異的T細胞と同じく、 $\text{INF-}\gamma$ 、 $\text{IL-2}$ を産生する、いわゆる $\text{Th-1}$ 様の細胞であった。これらのラットT細胞ラインの多くはラットS100 $\beta$ のC末端エピトープ（アミノ酸残基76-91）に対して、RT1B（MHCクラスII:I-A分子）拘束性に強い自己免疫反応を示した。しかしこのエピトープに対する各ライン細胞の反応には差があり、全く反応しないラインもあった。そして興味深いことにこの反応の強さは脳炎惹起性とはほぼ正の相関を示した。

正常な同系ラットへのS100 $\beta$ 特異的T細胞の受動移入により、臨床的には体重減少とわずかな神経障害（尾部の緊張低下）が見られるのみであったが、病理学的にはCNSにおいて広範な強い炎症細胞浸潤が観察された。これはMBPのモデルに比べると、かなり際立った特徴であり、炎症部位は脊髄ばかりでなく、全脳さらには眼組織の一部であるぶどう膜や網膜にまで及んでいた。CNSの白質および灰白質全体における広範な病変の分布を見ると、従来のEAEと区別するために、この新しいモデルはExperimental Autoimmune Panencephalitis (EPA)と呼ぶ方が相応しいと思われた。免疫組織学的にみると、MBP特異的T細胞の受動移入により誘導される重篤なEAEと比較して、このモデルではCNSへのED1+活性化マクロファージの遊走が減少していた。さらに*in vitro*ではMBP特異的T細胞と異なり、S100 $\beta$ 特異的T細胞はアストロサイトに対して細胞障害性を示さなかった。軽症な神経障害はこうした病理学的特徴を反映しているのかも知れない。一方、MBPのモデル同様、T細胞の受動移入のみでは脱髄所見は観察されなかったが、さらにその後、ミエリンの成分であるミエリン/オリゴデンドロサイト糖蛋白(MOG)に対する抗体を静注すると、四肢麻痺を引き起こし、病理学的には広範な脱髄巣が観察された。このことはMSの病態像が細胞性免疫のみでは説明しきれず、液性免疫も関与していることを示唆している。

標的となる自己抗原の性質は、それにより誘導される自己免疫疾患の臨床的、病理組織学的な特徴に多大な影響を与えるが、今回の実験は、非ミエリン系のCNS自己蛋白抗原が自己免疫性T細胞反応を引き起こすことを始めて示したものである。MBPもS100 $\beta$ もCNSに広範に存在する蛋白であることから、このEAPは単に自己抗原の分布の結果として引き起こされたものではなく、CNSの部位によって特異的自己抗原の処理および提示能力に差があることを示している。以上より、非ミエリン系の自己抗原もCNSの炎症性疾患の免疫病理において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

本研究では非ミエリン蛋白であるS100 $\beta$ 蛋白に対する特異的T細胞ラインを樹立し、そのラインの細胞特性を検討し、ミエリン蛋白のMBPに特異的T細胞とはほぼ同様の性格であることを明らかにし、またそのT細胞が認識するエピトープも同定し、その反応はMHC拘束性である事を見出した。またこのT細胞を正常ラットに移入することで、臨床的には軽い神経障害を見るのみであるが、病理組織学的には強い細胞浸潤が脳全体ならびに眼組織に及んでおり、明らかにMBP特異T細胞で起こるEAEとは異なることから、このモデルを新しくExperimental Autoimmune Panencephalitis (EAP)と命名する事を提唱した。

非ミエリン系の自己蛋白で、自己反応性T細胞由来の中樞神経系疾患モデルを作製した本研究はMSを始めとする一連の中樞神経系自己免疫疾患の研究に新たな手段を提供した意味で高く評価され、博士（医学）に値すると判定しました。