

学位論文題名

種々の膠原病を発症するHTLV-I env-pX遺伝子導入ラットの免疫学的解析

学位論文内容の要旨

ヒトT細胞白血病ウイルス (HTLV-I)は成人T細胞白血病の原因ウイルスであるだけでなく、痙性脊髄麻痺、ブドウ膜炎、慢性関節症の原因ウイルスであることも明らかにされている。さらにT細胞肺肺炎、シェーグレン症候群、感染性皮膚炎、多発性筋炎などを含む自己免疫疾患類似の病変の発症とも深く関係している。HTLV-IはLTR(long terminal repeat)をプロモーターとして、4種類の構造遺伝子 gag, pol, env, pX から構成されている。特にpX領域にはHTLV-Iウイルスに特徴的な蛋白であるTaxがコードされている。TaxはLTRを介してウイルス自身を活性化するのみならず、Interleukin-2(IL-2) IL-3, IL-4, IL-8ファミリー, granulocyte macrophage-colony stimulating factor, transforming growth factor β , tumor necrosis factor α などのサイトカインや、IL-2 receptor α , 更にc-fos, c-jun, egr-1, egr-2, fra-1などのプロトオンコジーンなど感染宿主の様々な遺伝子も活性化することが知られている。これらの遺伝子はいずれも免疫反応や細胞の腫瘍化において重要な役割を果たしており、Taxから活性化を受けることによりHTLV-I関連疾患が発症するのではないかと推測されている。一方、New Zealand マウスにおいてenv遺伝子産物のgp70が対応抗原として免疫複合体を形成しループ腎炎を発症することが知られており、HTLV-Iのenv産物もHTLV-I関連疾患発症の原因となっている可能性がある。我々は以前、LTRをプロモーターとしてHTLV-I env-pX領域を導入したトランスジェニックラット(env-pXラット)を作製し、慢性関節リウマチ様関節炎、心筋炎、皮膚炎、壊死性動脈炎、筋炎やシェーグレン症候群様唾液腺炎、涙腺炎の発症を報告した。本研究ではこれらの疾患の発症機序を解明するため、env-pXラットのリンパ球表面分子およびリンパ球機能を検討した。

env-pXラット、正常ラットおよび炎症疾患のコントロールとしてアジュヴァント関節炎やミオシン誘発心筋炎発症ラットの末梢単核球や炎症局所浸潤細胞の細胞表面分子の発現を抗CD3抗体と他の表面分子に対する抗体を用い2重染色を行いフローサイトメトリーにより比較検討した。CD3陽性細胞上においては、疾患発症env-pXラットで炎症局所浸潤リンパ球のみならず末梢リンパ球においてもCD80/86やICAM-1などの副シグナル分子が正常ラットやアジュヴァント関節炎、ミオシン誘発心筋炎発症ラットに比べ過剰に発現していた。さらにCD80/86やICAM-1の発現亢進は疾患発症以前のenv-pXラットの末梢リンパ球においても認められた。その他検索したT細胞受容体の使用頻度には正常ラットと有意な差は認めなかった。一方、抗原提示細胞を含むCD3陰性細胞群でも疾患未発症env-pXラット末梢単核球の一部にCD80/86の発現増強、疾患発症env-pXラットではCD80/86の強い発現とMHC class IIの弱い発現増強が認められた。しかし、アジュヴァント

関節炎やミオシン筋炎ラットの末梢血 CD3 陰性細胞では疾患の発現にも関わらず、これらの発現増強は認められなかった。したがって env-pX 遺伝子の導入が免疫担当細胞に広くこれらの分子、特に CD80/86 の発現増強を誘導しうる可能性が考えられた。CD80/86 は本来、活性化 B 細胞、マクロファージ、樹状細胞および単核球など抗原提示細胞側に発現し、T 細胞上の CD28 や CTLA4 と結合することで T 細胞に副シグナルを送る働きをしており、休止時 T 細胞には発現していない。しかし T 細胞も活性化すると CD80/86 を発現し抗原提示細胞として働き、T 細胞同士の自立性増殖をもたらすと考えられている。また ICAM-1 と MHC class II も休止期の T 細胞には発現していないが活性化した T 細胞においては発現が増強し、T 細胞が抗原提示細胞として働く上で重要な働きをする。今回の env-pX ラットにおける末梢 T 細胞上の CD80/86、ICAM-1、MHC class II の発現亢進は T 細胞の活性化を意味する。しかし、CD80/86 と ICAM-1 に関しては疾患未発症 env-pX ラットにも発現が亢進していること、これらの T 細胞のサイズが必ずしも増大しておらず、疾患未発症ラットにみられるこれらの分子の発現は芽球化に伴うものではないと考えられること、さらにコントロールとして比較したアジュヴァント関節炎やミオシン誘発心筋炎発症ラットの末梢 T 細胞上の発現と比べ強い発現であることより、CD80/86、ICAM-1、MHC class II の発現亢進の機序としては炎症により引き起こされた 2 次的なものだけでなく、導入した HTLV-I pX 遺伝子によるトランス活性化が重要な役割をしている可能性が考えられた。

env-pX ラットより採取したリンパ球は TSST-1、SEB の 2 種類のスーパー抗原に対して反応性が亢進していた。スーパー抗原は特定の T 細胞受容体と MHC class II との間を架橋し、抗原を介することなく T 細胞を強力に活性化することが知られている。ラットにおいては TSST-1 は T 細胞受容体 V β 15 をもった T 細胞クローンを活性化し、SEB に関しては V β 11, 17, 19 や V β 8.2, 8.5 をもった T 細胞を活性化するという報告がある。今回の研究では env-pX ラットの末梢 T 細胞ならびに疾患局所浸潤 T 細胞上の T 細胞受容体の使用頻度には正常ラットとの間に有意な差を認めなかった。利用可能な抗体の関係で 3 種類の T 細胞受容体についてのみの検討となったため、他の V β において使用頻度が増加している可能性は否定されないものの、env-pX ラット末梢 T 細胞ではすでに CD80/86 や ICAM-1 分子の発現が亢進していて活性化準備状態にあるためにスーパー抗原に対する反応性が亢進した可能性がある。いずれにせよ PCR-SSCP 法などを用いて多種類の T 細胞受容体を解析し、その偏位の有無についてなお詳細な検討の必要性がある。また抗原特異的反応としてミオシンで免疫した env-pX ラットのリンパ節細胞は *in vitro* においてミオシンに対し過剰な増殖反応性を示した。この高反応性についても CD80/86、ICAM-1 など副シグナル刺激分子が高発現した結果である可能性が高い。一方、ミオシンで免疫した正常ラットと env-pX ラットでは心筋炎の発症率に有意な差は認められなかったが、env-pX ラットにおいてはミオシンで免疫してから 3 週後に犠牲死させるまでに正常ラットの 2 頭に比べ 6 頭が死亡しており、*in vitro* の過剰な増殖反応性から考えて早期から強い炎症が誘導されている可能性が示唆された。もちろん HTLV-I 遺伝子産物である Tax は多くの炎症性サイトカインや細胞増殖因子などに対してトランス活性化機能を有することはよく知られており、env-pX ラットにおいても疾患の発症に深く関与していると考えられる。今回の研究ではこの点について詳細な検討を行っていないものの、本論文で示したように炎症性サイトカインなどの関与以外にも env-pX ラットに発症する種々の自己免疫疾患には env-pX 遺伝子による副シグナル系の up-regulation が関与している可能性が示唆される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 犬 山 征 夫
副 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 小 池 隆 夫

学 位 論 文 題 名

種々の膠原病を発症するHTLV-I-env-pX遺伝子導入ラットの免疫学的解析

ヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV-I)は成人T細胞白血病の原因ウイルスであるだけでなく、痙性脊髄麻痺、ブドウ膜炎、慢性関節症などを含む自己免疫疾患類似の病変の発症とも深く関係している。HTLV-IのpX領域にはHTLV-Iウイルスに特徴的な蛋白であるTaxがコードされている。TaxはLTRを介してウイルス自身を活性化するのみならず、サイトカインや、細胞表面分子、プロトオンコジーンなど感染宿主の様々な遺伝子も活性化することが知られている。これらの遺伝子はいずれも免疫反応や細胞の腫瘍化において重要な役割を果たしており、Taxから活性化を受けることによりHTLV-I関連疾患が発症するのではないかと推測されている。一方、HTLV-Iのenv産物もHTLV-I関連疾患発症の原因となっている可能性があるため、我々は以前LTRをプロモーターとしてHTLV-I-env-pX領域を導入したトランスジェニックラット(env-pXラット)を作製し、慢性関節リウマチ様関節炎、心筋炎、皮膚炎、壊死性動脈炎、筋炎やシェーグレン症候群様唾液腺炎、涙腺炎の発症を報告した。本研究ではこれらの疾患の発症機序を解明するため、env-pXラットのリンパ球表面分子およびリンパ球機能を検討した。

env-pXラット、正常ラットおよび炎症疾患のコントロールとしてアジュヴァント関節炎やミオシン誘発心筋炎発症ラットの末梢単核球や炎症局所浸潤細胞の細胞表面分子の発現を抗CD3抗体と他の表面分子に対する抗体を用い2重染色を行いフローサイトメトリーにより比較検討した。CD3陽性細胞上すなわちT細胞上においては、疾患発症env-pXラットで炎症局所浸潤T細胞のみならず末梢T細胞においてもCD80/86やICAM-1などの副シグナル分子が過剰に発現していた。さらにCD80/86やICAM-1の発現亢進は疾患発症以前のenv-pXラットの末梢T細胞においても認められた。その他検索したT細胞受容体の使用頻度には正常ラットと有意な差は認めなかった。一方、抗原提示細胞を含むCD3陰性細胞群でも疾患未発症env-pXラット末梢単核球の一部にCD80/86の発現増強、疾患発症env-pXラットでは

CD80/86 の強い発現と MHC classII の弱い発現増強が認められた。env-pX 遺伝子の導入が免疫担当細胞に広くこれらの分子、特に CD80/86 の発現増強を誘導しうる可能性が考えられた。CD80/86、ICAM-1、MHC classII の発現亢進の機序としては炎症により引き起こされた2次的なものだけでなく、導入した HTLV-I pX 遺伝子によるトランス活性化が重要な役割をしている可能性が考えられた。

env-pX ラットより採取したリンパ球は TSST-1、SEB の2種類のスーパー抗原に対して反応性が亢進していた。今回の研究では env-pX ラットの末梢 T 細胞ならびに疾患局所浸潤 T 細胞上の T 細胞受容体の使用頻度には正常ラットとの間に有意な差を認めなかった。env-pX ラット末梢 T 細胞ではすでに CD80/86 や ICAM-1 分子の発現が亢進していて活性化準備状態にあるためにスーパー抗原に対する反応性が亢進した可能性がある。また抗原特異的反応としてミオシンで免疫した env-pX ラットのリンパ節細胞は *in vitro* においてミオシンに対し過剰な増殖反応性を示した。この高反応性についても CD80/86、ICAM-1 など副シグナル刺激分子が高発現した結果である可能性が考えられた。

以上の発表について吉木敬教授よりヒト HTLV-I 感染における副シグナル分子の発現について、本ラットに発現した胸腺萎縮の機序についての質問があった。次いで小池隆夫教授より、本研究で認められた CD80/86 等の発現亢進がヒトの自己免疫疾患とどのように関連しているか、env-pX ラットで発症する疾患に臓器特異性がない理由、ヒトの疾患モデルとしてはどのような疾患を考えているのか、本研究と耳鼻咽喉科領域の研究との関連について質問があった。いずれの質問に対しても、申請者はヒト慢性関節リウマチの滑液中の T 細胞やサルコイドーシス患者の肺胞洗浄液中の T 細胞に CD80/86 分子の発現亢進を認めた論文などを引用し、豊富な知識に基づいて明確に回答した。

本研究は、env-pX ラットにおける疾患発症にリンパ球における副シグナル刺激分子の発現亢進により生じる過剰な反応性が関与していることを明らかにしたものである。今後、ヒト自己免疫疾患の発症機序解明の役立つことが期待される。審査員一同は、これらの結果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。