

学 位 論 文 題 名

Identification of cell types producing RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β in rat experimental autoimmune encephalomyelitis by in situ hybridization.

(ラット実験的アレルギー性脳脊髄炎におけるケモカイン産生細胞種の同定)

学位論文内容の要旨

実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) は中枢神経系の自己免疫性の脱髄疾患であり、多発性硬化症の動物モデルとして広く知られている。

急性期MSおよびEAE病巣において中枢神経へのリンパ球の浸潤は、血管内皮細胞との接触、活性化、沈着、および組織内への移行という4つのステップが考えられる。循環血中のT細胞上のVLA-4などのインテグリンと内皮細胞上のそのリガンドであるICAM-1やVCAM-1との結合によりT細胞と内皮細胞の接着は完成するが、インテグリンは何らかのシグナルにより活性化されない限り接着機能を発揮できない。ケモカインは分子量約10kDの構造の共通性を持った約30のメンバーからなるサイトカインファミリーであり、特定の白血球に対する遊走、活性化因子であり近年様々な疾患の原因となる炎症、免疫反応に本質的に関与することが示されている。RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β に代表される β ケモカインは炎症局所に固相化して存在するヘパリン結合性蛋白で主として単球やリンパ球にケモタキシス活性を有し、インテグリンを短時間に活性化しそのリガンドへの接着を誘導する。

EAE, MSの病巣形成にあたり、局所におけるこれらのケモカインの発現がリンパ球の組織内への移行を制御している可能性が考えられ、中枢神経におけるRANTES, MIP-1 α , -1 β の産生細胞種の検討を行った。

方法

Lewisラットにモルモット脊髄を完全フロイトアジュバンドとともに免疫しEAEを作製、早期・極期・回復期および対照コントロール脊髄の20 μ mm凍結切片を作製した。組織切片は4%パラフォルムアルデヒドにて固定した。45塩基のantisense合成オリゴヌクレオチドに3' S-dATPを3'-tailing法にて標識、42°C 10時間hybridizationを行った。洗浄後抗CD3, GFAP (アストロサイト), ED1 (マクロファージ) 抗体にて二重染色を行い、NTB2乳剤にて4~8週間露出し産生細胞種を同定した。過剰未標識antisenseプローブ添加による競合的コントロールin situ hybridizationを行った。また各病期における脊髄病巣よりRNAを抽出しRT-PCRにてRANTES mRNAの発現を検討した。

結果

対照コントロール脊髄ではRANTESおよびMIP-1 α , -1 β mRNA陽性細胞は認められなかった. RANTESはEAE感作後7日目より脊髄くも膜下腔単核細胞にてmRNA陽性, 10日目(早期)にはくも膜下腔より脊髄内への浸潤細胞にシグナルが確認された. 12~14日目(極期)では血管周囲の浸潤単核細胞を中心にシグナルが強陽性となり, 二重染色ではこれらの細胞は主としてT細胞, マクロファージであった. 病巣辺縁部の血管周囲にてアストロサイトにもシグナルが検出された. 感作後20日目(回復期)では脊髄内残存T細胞にのみシグナルが残存した.

20倍未標識antisenseプローブ添加によりシグナルは消失した. MIP-1 α , -1 β では感作後10日目より主として血管周囲の単核細胞にて陽性であり, その数は感作後12~14日にて最大となった.

考察

今回の我々の検討ではケモカインの主たる産生細胞腫は血管周囲, くも膜下腔に存在する浸潤T細胞, マクロファージであったが, アストロサイトでも産生が認められた.

EAEでは炎症初期, 臨床症状出現前よりケモカインmRNAの発現が認められ急性期にかけて臨床症状の増悪および浸潤細胞の増加と相関してケモカインの発現が増強し, EAE発症におけるケモカインの重要性が示された.

我々はMS患者髄液におけるMIP-1 α の検討を行ったが急性増悪期に髄液MIP-1 α の上昇を認め, 髄液MIP-1 α と髄液細胞数, 蛋白量との強い相関を報告し(Miyagishi et al 1995), また免疫組織学的にMS患者にて急性期病巣において病巣部辺縁にてMIP-1 α , MIP-1 β が血管内皮細胞, 血管周囲のマクロファージ, アストロサイトにて陽性であることを確認している.

急性期には血管周囲に存在するアストロサイトにてケモカインの発現が認められており, アストロサイトもケモカインを産生することによりケモタキシスの誘導あるいは各種の接着分子を活性化させlymphocyte trafficに関係することが考えられる.

EAE, MSの発症においてまず自己反応性T細胞が中枢神経内に侵入し, 自己抗原を認識, 様々の炎症性サイトカインを放出しT細胞, マクロファージを病巣に導く. この際ケモカインmRNAの発現がみられ, インテグリンを活性化しさらなる炎症細胞を病巣に導くことが考えられる. ケモカインがEAEにおけるlymphocyte trafficに関与しているものと考えられるが, ケモカインは正常組織では認められず病巣局所にてのみ発現するため治療に当たってより特異的な治療が可能となることが期待される.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 小 林 邦 彦

副 査 教 授 田 代 邦 雄

学 位 論 文 題 名

Identification of cell types producing RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β in rat experimental autoimmune encephalomyelitis by in situ hybridization.

(ラット実験的アレルギー性脳脊髄炎におけるケモカイン産生細胞種の同定)

ケモカインは分子量約 10kD の構造の共通性を持った約 30 のメンバーからなるサイトカインファミリーであり、RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β は主として単球、リンパ球にケモタキシス活性を有する。実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) は中枢神経系の自己免疫性の脱髄疾患であり、多発性硬化症 (MS) の動物モデルとして広く知られているが、EAE、MS の病巣形成にあたり、局所におけるこれらのケモカインの発現がリンパ球の組織内への移行を制御している可能性が考えられる。そこで中枢神経におけるケモカインの産生細胞種およびタイムコースについて検討を行った。

Lewis ラットにモルモット脊髄を完全フロイトアジュバンドとともに免疫し EAE を作製、早期・極期・回復期および対照コントロール脊髄の 20 μ mm 凍結切片を作製した。組織切片は 4 % パラフォルムアルデヒドにて固定した。45 塩基の antisense 合成オリゴヌクレオチドに 35 S -dATP を 3'-tailing 法にて標識、42 $^{\circ}$ C 10 時間 hybridization を行った。洗浄後抗 CD 3、GFAP (アストロサイト)、ED 1 (マクロファージ) 抗体にて二重染色を行い、NTB 2 乳剤にて 4 ~ 8 週間露出し産生細胞種を同定した。過剰未標識 antisense プローブ添加による競合的コントロール in situ hybridization を行った。

対照コントロール脊髄では RANTES および MIP-1 α 、-1 β mRNA 陽性細胞は認められなかった。RANTES は EAE 感作後 7 日目より脊髄くも膜下腔単核細胞にて mRNA 陽性、10 日目 (早期) にはくも膜下腔より脊髄内への浸潤細胞にシグナルが確認

された。12～14日目（極期）では血管周囲の浸潤単核細胞を中心にシグナルが強陽性となり、二重染色ではこれらの細胞は主としてT細胞、マクロファージであった。病巣辺縁部の血管周囲にてアストロサイトにもシグナルが検出された。感作後20日目（回復期）および90日目でも脊髄内残存T細胞にシグナルが残存した。

20倍未標識antisenseプローブ添加によりシグナルは消失した。MIP-1 α 、MIP-1 β では感作後10日目より主として血管周囲の単核細胞にて陽性であり、その数は感作後12～14日にて最大となった。

これらの結果よりケモカインの主たる産生細胞種は血管周囲、くも膜下腔に存在する浸潤T細胞、マクロファージであったが、アストロサイトでも産生が認められた。EAEでは炎症初期、臨床症状出現前よりケモカインmRNAの発現が認められ急性期にかけて臨床症状の増悪および浸潤細胞の増加と相関してケモカインの発現が増強し、EAE発症におけるケモカインの重要性が示された。

EAE、MSの発症においてまず自己反応性T細胞が中枢神経内に侵入し、自己抗原を認識、様々の炎症性サイトカインを放出しT細胞、マクロファージを病巣に導く。この際ケモカインmRNAの発現がみられ、インテグリンを活性化しさらなる炎症細胞を病巣に導くことが考えられる。ケモカインがEAEにおけるlymphocyte trafficに関与しているものと考えられた。

公開発表にあたり、主査ならびに副査より、CCケモカインに注目した理由、ラットを用いた理由、コントロール実験におけるsense probeの使用について、自己反応性T細胞の活性化の機序、血管内皮細胞におけるケモカインの産生およびレセプターの発現、病巣が回復する機序、抗ケモカイン抗体による治療の可能性について質問がなされたが発表者はおおむね妥当な解答を行った。

この論文はEAEにおける炎症細胞浸潤の機構におけるケモカインの関与について新たな所見を示した点で評価され、中枢性脱髄疾患の細胞遊走等に関する特異的な治療の基礎を確立したものと思われた。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（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。