

学位論文題名

A Study on the Role of the CD28/CTLA4-B7
Costimulatory Signal in the Pathogenesis
of Diseases in MRL/*lpr* Mice

(MRL/*lpr* マウスの病態発生における CD28/CTLA4-B7
補助シグナルの役割に関する研究)

学位論文内容の要旨

自己免疫疾患は、自己抗体または自己反応性T細胞が自己の組織や細胞の抗原と反応し、臓器障害を引き起こされる疾患である。自己免疫疾患には、標的抗原と組織障害が単一臓器に限局している臓器特異的自己免疫疾患と、多臓器に渡って障害がみられる全身性自己免疫疾患がある。

全身性紅斑性狼瘡 (Systemic Lupus Erythematosus, SLE) は代表的な全身性自己免疫疾患の一つで、多彩な自己抗体の産生と免疫複合体の全身の結合織への沈着、中でも腎、血管などへの沈着による組織病変を特徴とする。SLEはヒトだけでなく、イヌ、ネコおよびウマでも起こるが、中でもイヌはヒトとの疾患類似性が強く指摘されている。

自己免疫疾患の病態発生を解析するには適切な動物モデルが不可欠である。ヒト SLE によく似た病態を自然発症するマウスは、SLEの発生病理を解明し、免疫学的概念を打ち立て検証する上で非常に重要である。それゆえ、マウスSLEの発生病理を解析することは、ヒトのみならずイヌのSLEを理解することにつながる。

MRL/*lpr* マウスはSLEのモデルマウスで、血中免疫グロブリンの増加、自己抗体の産生および免疫複合体の著明な増加がみられる。MRL/*lpr* マウスにみられる全身性の著明なリンパ節腫脹は、*lpr* 遺伝子によるこのマウスに特徴的な所見で、Fas遺伝子の欠損によるものと考えられている。MRL/*lpr* マウスにおける自己免疫疾患の病態発生には活性化したCD4⁺T細胞の関与が指摘されているが、詳細は不明である。

MRL/lpr マウスにみられる自己免疫疾患およびリンパ節腫脹の病態発生における CD28/CTLA4-B7補助シグナルの役割を明らかにする目的で、CD28/CTLA4-B7補助シグナルを遮断するCTLA4IgG (マウスCTLA4の細胞外ドメインとヒトIgGの恒常領域との融合蛋白)を1回100 μ g、生後24時間以内から20週齢まで週3回、腹腔内に投与した。また、対照にはヒトIgGを同様に投与した。その結果、CTLA4IgG投与により、抗dsDNA抗体およびリウマチ因子などの自己抗体の産生が阻害され、腎炎、唾液腺炎および肝炎に著明な改善がみられた。さらに、特徴的なリンパ節腫脹と脾腫も著しく軽減した。しかしながら、リンパ球とマクロファージの血管周囲および間質への浸潤で特徴づけられる肺病変については、病変の数と大きさについて定量的に解析したところ、対照群に較べて有意な改善は認められなかった。

これらの現象の機序を明らかにするために、リンパ節、脾臓および肺組織を用いて各免疫担当細胞における細胞表面活性化抗原の発現と細胞内サイトカインの産生をフローサイトメーターにより詳細に解析した。また、肺病変を臨床病理学的に解析する目的で、気管支肺胞洗浄液中のサイトカインをELISA法によって定量し、比較・検討した。その結果、CTLA4IgG投与により、(i) CD4⁺およびCD8⁺ (conventional) T細胞の活性化とconventional T細胞からのIL-4の産生、(ii) CD4⁻CD8⁻B220⁺ (double negative, DN) T細胞からのIFN- γ の産生、および(iii) 活性化B細胞の形質細胞への分化は阻害されたが、(iv) DN T細胞の発生と、(v) B細胞およびマクロファージの活性化は阻害されなかった。また、CTLA4IgG投与によって気管支肺胞洗浄液中のTNF- α 濃度に有意な変化は認められなかった。すなわち、MRL/lprマウスにおいては、CD28/CTLA4-B7補助シグナルを介して、(i) conventional T細胞がIL-4産生性Th2/Tc2様細胞へ分化し、自己抗体の産生を補助していること、(ii) B細胞が形質細胞へ分化すること、(iii) DN T細胞がIFN- γ を産生すること、(iv) 特定の細胞集団ではなく様々な細胞が集積する結果、リンパ節腫脹や脾腫が起こること、しかしながら、(v) DN T細胞の発生とB細胞およびマクロファージの活性化は、CD28/CTLA4-B7補助シグナル非依存性であることが明らかとなった。

次に、MRL/lprマウスにおけるループス腎炎に対する遺伝子治療の可能性を検討す

る目的で、CTLA4IgG遺伝子を発現するアデノウイルスベクター(Adex1CACTLA4IgG, AdCTLA4IgG)を3週齢のMRL/*lpr*マウスに 1×10^9 PFU静脈内に接種した。その結果、一回の静脈内投与のみで、自己抗体の産生がほぼ完全に抑制され、病理組織学的にループス腎炎の著明な改善が得られた。また、腎機能が温存されたことで、生存期間の著しい延長が認められた。このことから、AdCTLA4IgGを用いた遺伝子治療は、SLEに代表される自己免疫疾患の長期的制御に対して、簡単かつ経済的で有効な治療手段である可能性が示唆された。

以上の成績から、MRL/*lpr*マウスでは、CTLA4IgG投与によって、腎炎などの自己抗体に関連した疾患のみならず、リンパ節腫脹および脾腫も抑制されることが明らかになった。しかしながら、肺病変に改善がみられなかったことから、MRL/*lpr*マウスにおいては、CD28/CTLA4-B7 補助シグナルの依存性によって免疫担当細胞の活性化が異なり、表現型の異なる病態が存在することが判明した。また、SLEに対して、CTLA4IgG発現アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療の可能性が示唆された。

本研究から得られた知見は、ヒトのみならずイヌSLEの発生病理のさらなる解明と、新しい治療法の開発に貢献するものと思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 橋 本 晃
副 査 教 授 上 出 利 光
副 査 教 授 小 沼 操
副 査 教 授 梅 村 孝 司

学 位 論 文 題 名

A Study on the Role of the CD28/CTLA4-B7 Costimulatory Signal in the Pathogenesis of Diseases in MRL/*lpr* Mice

(MRL/*lpr* マウスの病態発生における CD28/CTLA4-B7
補助シグナルの役割に関する研究)

MRL/*lpr*マウスは、全身性紅斑性狼瘡(SLE)のモデルマウスで、自己抗体の産生および免疫複合体の著明な増加がみられ、SLE類似の組織病変を示す。著明な全身性リンパ節腫脹は*lpr* (lymphoproliferation) 遺伝子によるこのマウスに特徴的所見で、Fas遺伝子の欠損によるものと考えられている。MRL/*lpr*マウスにおける自己免疫病の病態発生には活性化したCD4⁺T細胞の関与が指摘されているが、詳細は不明である。本研究は、T細胞の活性化に不可欠な補助シグナルを遮断するCTLA4IgGを用いて、MRL/*lpr*マウスの病態発生にCD28/CTLA4-B7補助シグナルがどのように関与しているかを明らかにする目的で行われた。

はじめに、可溶性CTLA4IgGを週3回、100 μ g/回、MRL/*lpr*マウスの腹腔内に生後24時間以内から20週齢まで投与した。その結果、自己抗体の産生および腎炎、肝炎、唾液腺炎の発症が阻害され、生存期間が有意に延長した。また、リンパ節腫脹および脾腫が著明に抑制された。さらに、静止T細胞からIL-4産生性Th2/Tc2様細胞への分化は阻害されたが、マクロファージの活性化によるものと思われる肺病変については改善がみられなかった。

次に、ループス腎炎に対する遺伝子治療の可能性を検討するために、CTLA4IgG遺伝子発現アデノウイルスベクター(Adex1CACTLA4IgG)を3週齢のMRL/*lpr*マウスに 1×10^9 PFU静脈内に接種した。その結果、一回の静脈内投与のみで、自己抗体の産生がほぼ完全に抑制され、ループス腎炎の著明な改善が得られた。

以上のように申請者は、MRL/*lpr*マウスにおいては、CD28/CTLA4-B7補助シグナルの依存性によって免疫担当細胞の活性化が異なり、表現型の異なる病態が存在するこ

とを明らかにした。さらに、Adex1CACTLA4IgGを用いた遺伝子治療は、SLEに代表される自己免疫疾患の長期的制御に対して、簡単かつ経済的で有効な治療手段である可能性を示した。これらの成績はヒトのみならず、イヌSLEの病態発生のさらなる解明に貢献するものと思われる。よって、審査員一同は、滝口満喜氏が博士（獣医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。