

学 位 論 文 題 名

TGF- β 1 ノックアウトマウスにおける自己免疫病態の検討

学位論文内容の要旨

1. 緒言

TGF- β は 25kD のホモ二量体ペプチドで、種々の細胞の増殖および分化を制御することが知られている。TGF- β はさらに細胞外マトリックスの蓄積促進、細胞機能ならびに分化の制御、血管新生に対する作用、細胞周期の S 期への移行阻止など多彩な作用を有する。TGF- β のアイソフォームのひとつである TGF- β 1 は免疫系や炎症機転においては主に抑制効果を示し、T 細胞や B 細胞の増殖・分化、単球・マクロファージの機能やサイトカイン産生を抑制し、また好中球や T 細胞の血管内皮細胞への接着を抑制する。ジーンターゲッティングにより作製された TGF- β 1 ノックアウトマウスは、生後 2 週間後より肺、心臓、唾液腺など多臓器にリンパ球浸潤がみられ、生後 4~5 週間で悪液質・消耗症候群を呈して死亡する。私は免疫系に対する TGF- β 1 の抑制作用から、TGF- β 1 ノックアウトマウスでは、ヒト SLE やシェーグレン症候群にみられる自己免疫病態が存在するのではないかと考え、TGF- β 1 ノックアウトマウスおよび TGF- β 1/MHC class II ダブルノックアウトマウスの血清と腎および唾液腺組織を用いて検討した。

2. 対象と方法

NIH の Letterio 博士よりジーンターゲッティングにより得られた TGF- β 1 ノックアウトマウス (TGF- β 1 ホモ欠損マウス) {TGF- β 1 (-/-) マウス}、ヘテロ欠損マウス {TGF- β 1 (+/-) マウス}、野生型マウス {TGF- β 1 (+/+) マウス} および TGF- β 1/MHC class II ダブルノックアウトマウス {TGF- β 1 (-/-) / MHC class II (-/-) マウス} の血清、腎組織および唾液腺組織の供与を受けた。まず ELISA 法を用いてマウス血清中の抗 DNA 抗体や抗 Sm 抗体などの自己抗体活性の有無について検討した。IgG 型あるいは IgM 型の自己抗体活性の有無について検討し、さらに IgG 型抗 dsDNA 抗体および抗 Sm 抗体についてはそのサブクラスの検討も行った。次いで Hep2 細胞の核抽出物を含むニトロセルロース strip を用いウエスタンブロットを行い、マウス血清中の IgG 型および IgM 型の抗核酸蛋白抗体の有無について検討し、IgG 型抗体についてはそのサブクラスについても検討した。免疫組織染色により、マウス腎組織への免疫グロブリン沈着の有無について検討した。また唾液腺については、浸潤 T 細胞亜分画の検討および接着分子や MHC class II の発現を検

討した。マウス唾液腺における各種サイトカイン遺伝子の mRNA 発現の有無について RT-PCR 法を用いて検討した。

3. 結果

まず TGF- β 1 (–/–) マウスの血清・腎および唾液腺の検討をおこなった。ELISA 法による血清中の自己抗体活性の検討では、TGF- β 1 (–/–) マウスで IgG 型抗 dsDNA 抗体(3/8)、抗 ssDNA 抗体(4/8)、抗 Sm 抗体(4/8)と陽性であったが、IgG 型抗 SS-A 抗体、抗 SS-B 抗体やリウマトイド因子は陰性であった。IgM 型の抗 dsDNA 抗体や抗 Sm 抗体活性は認められなかった。IgG 型抗 dsDNA 抗体活性は、IgG2b および IgG3 にみられたが、IgG1 には認められなかった。TGF- β 1 (+/–) マウスおよび TGF- β 1 (+/+) マウスでは自己抗体活性は認められなかった。

ウエスタンブロットによる検討では、TGF- β 1 (–/–) マウス血清で抗 Sm 抗体などの IgG 型抗核酸蛋白抗体が認められたが、IgM 型の抗体はみられなかった。IgG 型抗体活性は IgG2b および IgG3 にみられたが、IgG1 には認められなかった。TGF- β 1 (+/+) マウスでは抗核酸蛋白抗体を認めなかった。

TGF- β 1 (–/–) マウスでは腎への免疫グロブリンの沈着がみられたが、TGF- β 1 (+/–) マウスおよび TGF- β 1 (+/+) マウスの腎には免疫グロブリンの沈着はみられなかった。

唾液腺におけるサイトカイン mRNA の検討では、IL-1 α 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10 および IFN- γ の mRNA の発現率は TGF- β 1 (+/+) マウスと比べて TGF- β 1 (–/–) マウスの唾液腺で有意に高かった。

TGF- β 1 (–/–) マウスの唾液腺には CD3 陽性 T 細胞の浸潤がみられ、CD4 陽性 T 細胞が優位に浸潤していた。TGF- β 1 (+/+) マウスの唾液腺には細胞浸潤は認められなかった。

TGF- β 1 (–/–) マウスの唾液腺の血管では TGF- β 1 (+/+) マウスに比べて、接着分子である ICAM-1 や VCAM-1 の発現が増強していた。また MHC class II の発現増強が、TGF- β 1 (–/–) マウスの唾液腺でみられた。

次に TGF- β 1 (–/–) / MHC class II (–/–) マウスの血清・腎および唾液腺について検討した。TGF- β 1 (–/–) / MHC class II (–/–) マウスの血清では、TGF- β 1 (–/–) マウス血清にみられた抗核酸蛋白抗体はみられなかった。TGF- β 1 (–/–) / MHC class II (–/–) マウスの腎には免疫グロブリンの沈着は認められず、また唾液腺にはリンパ球浸潤や VCAM-1 の発現の増強も認められなかった。

4. 結語

TGF- β 1 ノックアウトマウスでは SLE 類似の自己抗体産生や腎への免疫グロブリン沈着とシェーグレン症候群類似の唾液腺の炎症性病変を呈することが明らかとなった。また TGF- β 1 / MHC class II ダブルノックアウトマウスの検討から、TGF- β 1 ノックアウトマウスにみられる自己免疫病態の形成に MHC class II が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 上 出 利 光

学 位 論 文 題 名

TGF- β 1 ノックアウトマウスにおける自己免疫病態の検討

本学位論文は、transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)ノックアウトマウスにヒト SLE やシェーグレン症候群類似の自己免疫病態が存在することを初めて示し、また本マウスの自己免疫病態の形成に MHC class II が重要であることを明らかにしたものである。

論文内容の発表後、主査、副査の各教授から以下の質問がなされた。

- (1)ヒト SLE の場合の血中 TGF- β 1 の測定例の報告の有無について。
- (2)TGF- β 1 ノックアウトマウスの SLE のモデルマウスとしての適格性について。
- (3)遺伝的背景がこのマウスの表現型に影響を与える可能性について。
- (4)自己抗体の産生機序としての交叉反応性による機序の関与の有無について。
- (5)up-regulate されている各種サイトカインの自己免疫病態発症への関与の意義について。
- (6)CTLA-4 ノックアウトマウスと TGF- β 1 ノックアウトマウスの表現型の類似点と相違点。
- (7)自己抗体の産生について、抗 dsDNA 抗体と他の抗体の産生は平行するのか？
- (8)heterogeneous な抗体産生パターンと polyclonal な B 細胞活性化がないこととの解離について。
- (9)TGF- β と MHC class II との関連について。
- (10) TGF- β 1 遺伝子型の違いによる血中 TGF- β 1 濃度の差異について。
- (11)TGF- β 1 をこの変異マウスに補充した場合の病変形成への影響について。
- (12)Polyclonal な B 細胞活性化があるとすれば、どうして特定の自己抗体が出現するのか、抗原は同定されているのか、また遺伝的背景の影響はあるのかどうか。
- (13)自己抗体活性における IgG サブクラスの偏りについて。
- (14)CD4 陽性 T 細胞の欠如がダブルノックアウトマウスで炎症性病変がみられないことと関連するのではないか？
- (15) TGF- β 1 を欠損するようなヒトでの報告例の有無について。

以上の各々の質問に対して、学位申請者は以下のように回答した。

- (1) SLE で血中 TGF- β 1 上昇がみられる患者が存在すると報告されているが、多数例を対象とした報告はない。MRL/lpr マウスでは血中 TGF- β 1 濃度の上昇がみられ、このことがマクロファージ機能を抑制し、同マウスの易感染性に関与すると報告されている。

- (2) TGF- β 1 ノックアウトマウスは抗 dsDNA 抗体や腎への免疫グロブリン沈着がみられることから、SLE 類似の病態とはいえ、生存期間も短くまた腎炎発症もみられないため、SLE のモデルマウスとするには十分とはいえないと考える。
- (3) このノックアウトマウスの樹立には C57BL/6J マウスを用いており、Balb/c などを用いればより顕著な表現型をつかめた可能性はあると考える。
- (4) 抗原を特定できておらず、交叉反応性により抗 dsDNA 抗体などの自己抗体が誘導されるのかどうかは不明である。
- (5) 本マウスでは Th1 と Th2 両者のサイトカインの発現が増強し、いわゆる "cytokine storm" の状態で、末梢での自己免疫病態の形成に最終的に関与していると考えられる。
- (6) CTLA-4 ノックアウトマウスは TGF- β 1 ノックアウトマウスと同様に多臓器炎症を呈し、生後 4 週間で死亡する。両者の相違点としては CTLA-4 ノックアウトマウスでは TGF- β 1 ノックアウトマウスとは異なり、発生の異常がみられないことである。CTLA-4 の engagement により TGF- β 1 の産生が促されることが報告され、TGF- β 1 を介して CTLA-4 の T 細胞活性化に対する抑制作用が発揮される可能性が指摘されている。
- (7) 自己抗体産生は例えば抗 dsDNA 抗体が高値であれば、抗 Sm 抗体も高値であるなどの対応は必ずしも認められない。
- (8) 生後 3 週間までのマウスを対象に行った私自身の検討では、血中の免疫グロブリン量に TGF- β 1 ノックアウトマウスと正常マウス間に差はなかったが、他の報告によれば生後 3.5 週～5 週の TGF- β 1 ノックアウトマウスでは血中 IgG および IgM レベルの上昇が報告されており、基本的には polyclonal な B 細胞活性化が存在すると考えられる。
- (9) TGF- β は直接的に MHC class II の発現を抑制するとともに、IFN- γ の産生を抑制することにより、間接的にも MHC class II の発現を抑制する。
- (10) TGF- β 1 ノックアウトマウス、ヘテロ欠損マウスおよび正常マウスにおいて、血中の TGF- β 1 濃度を測定した報告はない。
- (11) TGF- β 1 を全身的に投与したが、多臓器へのリンパ球浸潤を抑制できず、マウスの生存期間を延長することはできなかった。
- (12) 特定の自己抗体産生がみられる理由は不明で、特定の抗原も同定されていない。また遺伝的背景の違いによる抗体産生パターンの差異については検討していない。
- (13) TGF- β 1 はマウス IgG2b の switch factor として知られており、TGF- β 1 の欠損により TGF- β 1 ノックアウトマウスでは IgG2b の増加がみられると考えられる。
- (14) ダブルノックアウトマウスでは CD4 陽性 T 細胞がないために炎症性病変を呈さないと考えられる。抗 CD4 抗体により TGF- β 1 ノックアウトマウスの CD4 陽性 T 細胞を排除すると多臓器炎症が抑制され生存期間が延長されることから、エフェクター細胞としての CD4 陽性 T 細胞の重要性は明らかである。しかし一連反応の起点となるのは、MHC class II による抗原認識と考えられ、TGF- β 1 ノックアウトマウスにおける MHC class II 発現増強の重要性は間違いないところと考える。
- (15) 現在までヒトで TGF- β 1 欠損が明らかとなったとの報告例はない。

以上、いずれの質問に対しても学位申請者は概ね適切な回答をした。本学位論文は、TGF- β 1

ノックアウトマウスにヒト SLE やシェーグレン症候群類似の自己免疫病態が存在することと本マウスの自己免疫病態の形成に MHC class II が重要であることを初めて示したものである。審査員一同は、この研究成果を高く評価し、また学位申請者が研究者として誠実かつ熱心であり、学位（医学）の授与に値する十分な資格を有すると判定した。