

学位論文題名

自己免疫疾患発症 HTLV-I 遺伝子導入ラットの
炎症局所浸潤 T 細胞の解析

学位論文内容の要旨

自己免疫疾患では種々の自己抗体産生や自己反応性 T 細胞の出現など免疫学的寛容状態の破綻とともに、さまざまなサイトカインが動員されて病態が形成される。しかし、それら病態の根本的な原因については未知の部分が多い。そのような中で、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、慢性関節リウマチ類似の関節炎や痙攣性脊髄麻痺、ブドウ膜炎なども引き起こすことが明らかとなり、シェーグレン症候群、T 細胞性肺炎、感染性皮膚炎などにも病因的な関連が指摘され、自己免疫疾患の病因のひとつとして注目されるようになった。HTLV-I は long terminal repeat (LTR) をプロモーターとして、4 種類の構造遺伝子 gag, pol, env, pX から構成されており、なかでも pX は他のレトロウイルスには認められない HTLV-I に特異的な領域で、高い転写促進活性を持つ Tax 蛋白がコードされている。Tax は LTR を介してウイルス遺伝子自身を活性化するとともに、Interleukin (IL)-2, IL-3, IL-4, tumor necrosis factor α などのサイトカインや、IL-2 receptor α 、さらに c-fos, c-jun などのプロトオンコジーンなど感染宿主のさまざまな遺伝子も活性化することが知られている。これら遺伝子はいずれも免疫応答や細胞の腫瘍化に重要な役割を果たしており、Tax はこれを活性化することにより HTLV-I 関連疾患を発症させると推測されている。一方、New Zealand マウスでは env 遺伝子産物の gp70 が自己抗原となって免疫複合体が形成され、血管炎やループス腎炎が発症することが知られており、HTLV-I の env 産物が疾患発症に関わっている可能性も高い。以前我々が作製した、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) は、慢性関節リウマチ様関節炎、筋炎・心筋炎、皮膚炎、壊死性動脈炎、シェーグレン症候群類似の涙腺・唾液腺炎などさまざまな疾患を発症し、抗核抗体やリウマトイド因子などの自己抗体が出現することから、これら疾患は自己免疫的機序により発症すると考えられた。さらに末梢および炎症局所浸潤 T 細胞は、ICAM-1, CD80/86 などの副シグナル分子を高発現し、種々の抗原刺激に対して高反応性を示すなど、易反応性の状態にあるものと考えられた。本研究では、この易反応性 T 細胞の病態形成機序を解析するため、関節炎および皮膚炎局所に浸潤する T 細胞のクロナリティーについて、T 細胞受容体 (TCR) の complementarity determining region 3 (CDR3) 領域を reverse transcriptase-polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (RT-PCR-SSCP) 法を用いて検索した。また env-pX ラットおよびコントロール WKAH ラット

にII型コラーゲン(CII)を免疫することにより誘導した関節炎局所に浸潤するT細胞についても同様の検索を行い、比較検討した。

肉眼的に両側関節腫脹をみた3頭のenv-pXラットの関節炎局所組織、計6サンプルと皮膚炎組織3サンプル、末梢血T細胞を反映すると考えられる脾臓2サンプルについてT細胞のクロナリティーをRT-PCR-SSCP法で解析した。関節炎や皮膚炎組織では末梢リンパ球ではみられないオリゴクローナルなT細胞の集積が認められ、T細胞が関節局所で抗原認識により増殖し、疾患の発症・維持に関与していることがうかがわれた。一部、V β 3.3、V β 9、V β 17、などで脾細胞にも弱いSSCPバンドが認められたが、これら22種類のV β のなかでも少数にとどまっており、炎症局所で抗原刺激を受けたT細胞が末梢血中にも現れるためと考えられた。疾患発症に特定の抗原が関与しているとしたら、その抗原は遺伝的背景が均一なラボラトリーラットであるWKAH系に遺伝子導入したenv-pXラットの場合、個体や炎症部位が異なっても同様に発現しているはずであり、そこに浸潤するT細胞も同じ抗原を認識する同一のクローンが増殖してくると考えられる。したがって、複数の関節炎組織をSSCP解析した場合、同じ個体の関節か否かに関わらず各関節で共通するSSCPバンドが確認できるものと予想された。しかし、実際には全ての関節炎部で共通するSSCPバンドは認められず、関節や個体差を越えて普遍的に炎症局所に浸潤するT細胞クローンは得られなかった。またCDR3領域の検索でも共通する塩基配列やアミノ酸モチーフは得られなかった。したがって、env-pX遺伝子産物が抗原となっている可能性は低く、多彩な自己抗原を標的としてT細胞クローンが局所で増殖し、病態を形成しているものと考えられた。一方、同一個体の左右関節では、比較的共通のT細胞クローンが集積する傾向が認められ、個体ごとの標的抗原は限られている可能性が示唆された。各V β の使用頻度をみると関節炎、皮膚炎のいずれにも大きな偏りは認められず、疾患発症におけるスーパー抗原の関与は否定的であった。

env-pXラットのin vivoにおける免疫反応性を検討する目的、ならびにenv-pXラットに自然発症する関節炎との比較を目的としてCII投与による関節炎の誘導を試みた。その結果、CIIをラットの背部皮内に接種した場合、env-pXラットでは100%に関節炎の発症をみたが、WKAHラットでは関節炎は確認されなかった。しかし、投与部位を尾根部皮内に変えるとenv-pXラットのみならずWKAHラットにも高率に関節炎が発症したことから、この発症の違いは投与経路による抗原性の強さの違いである可能性が高かった。しかし少なくとも、env-pXラットはWKAHラットと比較してin vivoで免疫学的に高反応性を獲得しているものと考えられた。CIIで誘導した関節炎局所浸潤T細胞のクロナリティーをRT-PCR-SSCP法で解析したところ、env-pXラットではCII免疫したコントロールWKAHラットにみられたような共通クローンの増殖は確認されず、コントロールラットのシャープなバンドと比較して全体に不鮮明でスメア状のものが多かった。これはenv-pXラットのT細胞が易反応性であるために、CII感作により非常に多くのT細胞クローンが反応して全体にスメア状になり、CII反応性クローンがマスクされてバンドとして明らかにならなかった可能性が高い。CII投与量の減量や他の関節関連抗原による関節炎誘発実験などさらなる実験による確認が必要であるが、この結果はenv-pXラットがすでに関節炎を発症する前段階にあり、CIIの投与はそれにきっかけを与えただけかもしれないことを意味していると考えられた。

以上、今回のT細胞を中心とした解析結果から、env-pX ラットでは導入された env-pX 遺伝子（特に pX 遺伝子）の影響により、種々の自己抗原の発現増強や修飾さらに免疫制御機構の異常をきたし、関節炎の発症に深く関わっている可能性が高いと考えられた。

学位論文審査の要旨

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

学 位 論 文 題 名

自己免疫疾患発症 HTLV-I 遺伝子導入ラットの 炎症局所浸潤 T 細胞の解析

申請者は HTLV-I 遺伝子導入ラットに発症する関節炎に着目し、炎症局所浸潤 T 細胞クロナリティーの解析を通してヒトの慢性関節リウマチ (RA) の発症機序を解明するため研究を行った。その結果、末梢リンパ球ではみられないオリゴクローナルな T 細胞の集積が関節炎局所で認められ、T 細胞が関節局所で抗原認識により増殖し、疾患の発症・維持に関与していることがうかがわれた。しかし、個体差を超えて全ての関節炎部に普遍的な T 細胞クローンは認められず、CDR3 領域に共通する塩基配列やアミノ酸モチーフも得られなかったことから、多彩な抗原を標的として T 細胞クローンが炎症局所で増殖し、病態を形成しているものと考えられた。env-pX 遺伝子の導入によって II 型コラーゲンの免疫により関節炎が誘導されやすくなることも明らかとなり、易反応性の env-pX ラットのリンパ球が関節炎発症に重要であることが示唆された。発表の後、上出利光教授と以下のような質疑応答があった。問：env-pX 遺伝子を導入するラットの strain の違いによって疾患発症率が異なるか。答：遺伝子導入に成功したのは WKAH strain のみであり、strain 差による発症の違いについては明らかでない。問：env-pX ラットの関節炎の組織像をみると骨破壊・壊死が強いようだが、血管炎等に伴う血流障害などが関与しているのか。答：env-pX ラットに認められる血管炎は心筋内、脾臓周囲脂肪織内、副睾丸周囲などの組織に多く、関節炎周囲組織では確認されていないので、その関与は少ないと考えられる。問：env-pX ラットの関節炎局所の T 細胞クロナリティーは、関節炎の進行とともにどのように変化するか。答：T 細胞クロナリティーを経時的には検討していないため、その変化については明らかでない。しかし、5 週、18 週、44 週齢の env-pX ラットの関節炎部の T 細胞クロナリティーを調べた今回の結果では、増殖 T 細胞クローン数に加齢による一定の傾向は認められない。問：関節浸潤 T 細胞を CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞に分けてクロナリティーを検討したか。答：関節炎部に浸潤する T 細胞の 90%以上は CD4 陽性 T 細胞であるため、CD4・CD8 に分けて検討することは行っていない。問：env-pX ラットの免疫反応が高くなる主因は何か。答：pX 遺伝子領域にコードされている Tax 蛋白の発現によって、NF- κ B 活性が高まるのがその主因と思われる。問：lpr マウスでは CTLA4-Ig の投与により抑制される疾患と抑制されない疾患がある。env-pX ラットではどうか。答：env-pX ラットでは CTLA4-Ig の投与は行っておらず、今後の課題と考える。また、小池隆夫教授と以下のような質疑応答

があった。問：WKAH ラットは II 型コラーゲンの免疫で関節炎が起こりにくい strain なのか。答：一般的な WKA ラットでは関節炎を発症させると成書には記載があるが、今回用いている WKAH ラットは II 型コラーゲンで関節炎を誘発しにくい strain であると考えられる。問：II 型コラーゲン誘導関節炎と env-pX ラットの関節炎のどちらが RA に近いのか。答：env-pX ラットのリンパ球は関節炎の発症以前から易反応性の状態にあることから、RA モデルの初期像としてはやや考えにくい。RA の初期像としては、II 型コラーゲン誘導関節炎の方がモデルとして適当ではないか。関節炎が進行・維持されている段階では env-pX ラットの関節炎は RA によく類似しているように思われる。問：II 型コラーゲンと関節炎のように、臓器特異的な抗原を免疫して疾患を誘導したことがほかにもあるか。答：血管平滑筋抗原をアジュバントとともに免疫したが、血管炎は生じなかった。疾患を誘導できるか否かは、抗原活性の強さに依存するものと考えている。問：リウマチ因子の値と関節炎の強さとの間に相関はあるか。答：相関は認められない。問：env-pX ラットでは活性化したリンパ球がなぜ特定の部位（関節滑膜や唾液腺など）に炎症を起こしてくるのか。答：これはヒトの場合と同じく明らかではない。ただ、env-pX ラットでは関節炎を発症するものは皮膚炎が起こりにくく、皮膚炎を発症するものは関節炎が起こりにくい傾向がある。関節炎では Th1 優位に、皮膚炎では Th2 優位になっていることが予想され、炎症の場の決定にサイトカインバランスが関与している可能性がある。最後に吉木敬教授と以下のような質疑応答があった。問：外来抗原が env-pX ラット関節炎の発症に関与している可能性はあるか。答：env-pX ラットは SPF 環境下において関節炎などを発症するため、その可能性は低いと考えられる。問：演者は RA の初期像としては env-pX ラット関節炎は考えにくいとの見解であったが、RA の一部には env-pX ラットの関節炎発症機序と一致するものがあるのではないか。答：その可能性は否定できないと思われる。以上質疑に対する応答は概ね妥当であった。

この論文は、慢性関節リウマチの病因としての HTLV-I およびその env、pX 遺伝子の関連について、関節炎局所浸潤 T 細胞のクロナリティーを解析することにより考察した点が高く評価され、今後の慢性関節リウマチの病因解明の一翼を担うものとして期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、北海道大学大学院研究科病態制御学専攻病態解析学講座分子病理学分野および札幌医科大学医学部内科学第一講座研究生としての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。