

学 位 論 文 題 名

Development of Autoimmune Disease in Rats with Neonatal  
Thymus Atrophy and Discovery of a Novel Subtype of  
Monocytes/Macrophages Exhibiting a Cytotoxic Phenotype

(新生仔期に胸腺萎縮をきたすラットにおける自己免疫疾患の発症と  
細胞傷害形質を有する新しい単球/マクロファージ系細胞の発見)

学位論文内容の要旨

自己免疫疾患とは自己抗原に対する異常な免疫反応を原因とした疾患である。正常の免疫反応は、細菌、ウイルス、寄生虫などの感染性微生物のような異物を生体内から排除することを目的としており、生体が生きていく上で最も重要な防御機構のひとつである。しかし、ある特定の病的条件下では、自己の抗原を標的とした自己免疫反応により、自らの組織や臓器が攻撃されることが知られている。自己免疫疾患の発症には自己反応性 T 細胞の誘導が決定的要因となることが知られており、自己反応性 T 細胞は自己免疫疾患研究におけるキーファクターとして注目されている。T 前駆細胞は胸腺内で正と負の選択を受け、T 細胞へと分化、成熟する。正常な胸腺内では自己反応性 T 細胞は負の選択により排除されている。一方、胸腺の機能異常は自己反応性 T 細胞の誘導、さらには自己免疫疾患の発症に強く関与していると考えられる。

lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (p56lck)プロモーター制御下でヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (human T-cell leukemia virus type-I ; HTLV-I) 由来 pX 遺伝子を発現するトランスジェニックラット (lck-pX ラット) は上皮型胸腺腫を自然発症することが報告されている。本腫瘍の発生が宿主である F344 系に特異的な現象であるかを調べるため、lck-pX ラットと他系統ラットの交配実験を行なったところ、Wistar 系ラットとの交配種である FW-pX ラット (雄) に、生後早期での胸腺萎縮と多臓器にわたる炎症性細胞浸潤を主徴とした新しい phenotype の発現が認められた。新生仔期の胸腺は T 前駆細胞の分化が活発で、T 細胞レパトリーの形成が最も盛んであることから、免疫機構の構築に重要な役割を担っていると考えられている。FW-pX ラットは生後早期での胸腺萎縮を示すことなどから、胸腺機能異常とそれに伴う末梢免疫異常、さらには自己免疫疾患の発症メカニズムを解析する上で有用なモデル動物となる可能性が示唆された。そこで本研究では、FW-pX ラットで認められた胸腺萎縮の詳細な解析、多臓器における炎症性細胞浸潤との関連、末梢免疫系に与える影響などについて調べ、自己免疫反応を含めた免疫異常の発症に対する胸腺の関与について検討した。

病理組織学的な解析の結果、交配種（雄）の 70%以上に胸腺萎縮とともに多臓器における炎症性細胞浸潤が認められた。胸腺萎縮に関しては胸腺上皮細胞と CD4/CD8 double positive (DP) 胸腺細胞の apoptosis が主なメカニズムであり、その結果 chronic GVHD に類似した末梢低 T リンパ球血症とリンパ装置の構造異常が誘導されることが判明した。また、多臓器における炎症性細胞浸潤については、CD8 T 細胞、マクロファージが優位に浸潤しており、脾細胞を用いた adoptive transfer の結果、移入リンパ球の正常ラット組織への浸潤が確認され、自己反応性 T 細胞の関与、すなわち自己免疫メカニズムの関与が示唆された。加えて、regulatory T 細胞 (Treg) の減少も部分的に影響している可能性が考えられた。

また、FW-pX ラットでは、末梢血の低 T リンパ球血症を代償する、単球を中心とした骨髓球系細胞の異常な活性化も観察された。その中で本研究では、CD4、CD8 分子を同時に発現した単球/マクロファージ系細胞の新しいサブタイプを発見し、その分化誘導メカニズムや機能的特徴についての解析を行なった。その結果、CD4/CD8 DP 単球は導入遺伝子である pX 遺伝子に依存せず、結核死菌を用いたアジュバント免疫などの特定の免疫活性化状態において、正常ラット末梢血中にも誘導されることが明らかとなった。また、機能的には CD4/CD8 DP マクロファージとして炎症局所に浸潤すること、さらには他のマクロファージと比較し IFN- $\gamma$  や IL-18 といった I 型サイトカインを高発現していること、CTL や NK 細胞で特徴とされる Granzyme、Perforin などの細胞傷害因子の発現が認められることなどから、炎症局所において Th1 type の免疫反応を誘導し、かつ、それ自体が組織傷害に関与する可能性が示唆された。加えて、癌細胞を標的とした細胞傷害試験の結果、in vitro での細胞傷害活性も確認された。また、興味深いことに CD4/CD8 DP 単球はヒト末梢血中にも認められた。

本研究の結果から、FW-pX ラットでは、新生仔期の胸腺異常に伴い、自己反応性 T 細胞の生成や Treg の減少を含む全身的な免疫恒常性の破綻により、chronic GVHD 様の自己免疫疾患が自然発症することが示された。しかし、その詳しいメカニズムについては今後の検討課題であり、本研究を発展させることにより chronic GVHD を含む原因が未だ不明な自己免疫疾患の病因、病態生理を理解する上で重要な知見が得られる可能性が期待される。また、本モデルラットにおいて見出した単球/マクロファージ系細胞の新しいサブタイプについては、今後さらなる免疫病理学的な解析を行うことにより、自己免疫疾患への関与を明らかにする必要があるのみならず、癌の免疫療法やその他感染症治療への幅広い応用の可能性についても検討してゆく必要があると考えている。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 笠 原 正 典

副 査 教 授 小 野 江 和 則

副 査 教 授 瀬 谷 司

### 学 位 論 文 題 名

## Development of Autoimmune Disease in Rats with Neonatal Thymus Atrophy and Discovery of a Novel Subtype of Monocytes/Macrophages Exhibiting a Cytotoxic Phenotype

(新生仔期に胸腺萎縮をきたすラットにおける自己免疫疾患の発症と細胞傷害形質を有する新しい単球/マクロファージ系細胞の発見)

胸腺は年齢と共に生理的に退縮する臓器であり、ヒトにおいて胸腺機能異常と自己免疫疾患の直接的な関連を調べる事は病理学的に難しく、有用なモデル動物の確立が必要とされている。そこで我々は生後早期での胸腺萎縮と多臓器にわたる炎症性細胞浸潤が観察されたヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-I) 由来 pX 遺伝子導入 F344 rat と Wistar rat との交配種である FW-pX rat の新たな自己免疫疾患モデル動物としての確立を目的とし、胸腺萎縮の詳細な解析、多臓器性炎症性細胞浸潤との関連、末梢免疫系に与える影響などについて調べ、自己免疫反応を含めた免疫異常の発生における胸腺の関与について検討した。

免疫病理学的解析の結果、生後早期での胸腺萎縮は胸腺上皮細胞と CD4/CD8 double positive (DP) 胸腺細胞の apoptosis が主なメカニズムであることがわかった。さらに chronic GVHD に類似した多臓器性の炎症細胞浸潤においては生後早期での胸腺異常により末梢血中に自己反応性 T 細胞が過剰に誘導されたことに起因した全身性の自己免疫疾患であることがわかった。また、末梢血 PBMC の詳細な解析の結果、FW-pX ラット末梢血中に CD4、CD8 分子を同時に発現した単球・マクロファージ系細胞の新しいサブタイプを発見し、詳細な解析の結果、CD4/CD8 DP 単球は結核死菌を用いたアジュバント免疫などの免疫活性化状態において、誘導されることがわかった。機能的には CD4/CD8 DP マクロファージとして炎症局所に浸潤すること、さらには CTL や NK 細胞で特徴とされる Granzyme、Perforin などの細胞傷害因子の発現が認められることなどから、それ自体が炎症局所において組織傷害に関与していた可能性が示唆された。加えて細胞傷害試験の結果、*in vitro* での細胞傷害能も確認された。また興味深いことに CD4/CD8 DP 単球はヒト末梢血中にも認められた。

公開発表において、副査の瀬谷 司教授より、胸腺上皮細胞と CD4/CD8 DP 胸腺細胞の apoptosis の原因と CD4/CD8 DP 単球・マクロファージ系細胞については、他の系統のラットでの検討とヒト末梢血中での本細胞の割合の個体差を規定する要因について、さらには癌細胞の細胞傷害に関わる ligand と receptor について質問があった。これらの質問に対して申請者は、胸腺上皮細胞の apoptosis について予備実験での FW-pX rat 胸腺組織におけるケ

モカインの高発現とマクロファージの異常な浸潤が認められたことを報告し、炎症に類似した現象による apoptosis の可能性を示し、上皮細胞の消失により生存を維持できなくなった胸腺細胞が apoptosis に陥るのではないかと回答した。また CD4/CD8 DP 単球については、他の系統のラットでも認められるが系統差が大きいこと、ヒト末梢血サンプルは全て臨床的に健康なヒトから採取したことを報告し、それをふまえてヒト末梢血中に認められた個体差は遺伝的影響が強い可能性があるとして回答し、細胞傷害機序に関しては本細胞で NKG2D のラットにおけるカウンターパートの mRNA 発現を確認したが、検討は不十分であることを示した。次いで、副査の小野江 和則教授より、FW-pX rat の胸腺内で CD8 single positive 胸腺細胞が比較的維持されていた理由と regulatory T 細胞の自己免疫疾患への関与について、また CD4/CD8 DP 細胞が単球系細胞であるという決定的な証拠についての質問と本細胞の機能的解析に関しては NK 感受性腫瘍株を用いた細胞傷害試験の必要性和 FW-pX rat で認められた自己免疫疾患への関与について今後解析すべきであるとの助言を受けた。これらの質問に対して申請者は、CD8 T 細胞の分化に NF- $\kappa$ B の関与が報告されていることから pX 遺伝子による直接的な影響を考えていること、regulatory T 細胞については部分的な関与の可能性を実験の結果をもとに回答した。さらに単球系細胞を示す決定的な証拠として、CD4/CD8 DP 細胞は貪食活性を持つ事を報告した。最後に、主査の笠原正典教授より、CD4/CD8 DP 単球・マクロファージ系細胞の特異的マーカーの解析やヒト末梢血中に認められた CD4/CD8 DP 単球においても機能的に類似しているのかなどの今後の課題について助言を受けた。

この論文は、胸腺機能異常が関わる自己免疫疾患の新しい動物モデルの作製と免疫病理学的に重要な役割を担っている可能性のある新しい細胞を発見したことにより高く評価され、今後本モデル動物を用いた自己反応性 T 細胞産生メカニズムの解明や、CD4/CD8 DP 単球・マクロファージ系細胞においてはヒトにおける自己免疫疾患への関与のみならず、癌の免疫療法やその他感染症治療への幅広い応用の可能性が期待される。

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。