

学 位 論 文 要 旨

氏名 中嶋 朋美

題 目 : Th1/Th2 病としての免疫疾患の免疫病理学的解析

Immunopathological analysis of immune diseases as Th1/Th2 unbalanced diseases

論文要旨 :

免疫疾患にはアレルギー性疾患と自己免疫疾患がある。前者は、通常は無害な物質に対して生体が過剰に反応し、ヘルパーT (Th) 2 反応優位であり、後者は、免疫寛容維持機構の破綻を背景に、自己成分に対して反応し、Th1 反応優位であるという点で異なるが、免疫疾患の発症には遺伝的要因と環境要因が大きく関わっている点では共通している。正常な生体ではサイトカイン・ケモカイン、接着分子や各種の免疫担当細胞が複雑にネットワークを形成して生体恒常性を維持しているが、このネットワークの攪乱が免疫疾患の病態発現に関係している。ナイーブヘルパーT 細胞から Th1 細胞や Th2 細胞へと分化誘導するサイトカインが臨床でも盛んに測定され、各種の疾患病態における Th1 細胞や Th2 細胞およびこれらが産生するサイトカインの意義が明らかになりつつある。

本研究では、免疫疾患の病態を Th1/Th2 バランスの異常として捉え、さらに環境因子の関与という視点から、アレルギー性疾患については遅発型喘息を、自己免疫疾患については 1 型糖尿病を、そして幼児の胆道閉鎖症を、免疫病理学的に解析した。

本論文は以下の 3 章から成る。

< 第 1 章 >

自己免疫疾患において、CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 制御性 T 細胞 (Treg) と病態との関連は良く調べられているが、アレルギー疾患では不明な点が多い。特に、喘息病変局所における Treg の存在や病変の発現における役割については理解が進んでいない。本研究では、BALB/c マウスに卵白アルブミン (OVA) で感作・チャレンジを行って Th2 性遅発型アレルギー性喘息のモデルマウスを作製し、それらの点について調べた。即時型アレルギーの病態では肥満細胞・好塩基球と IgE 抗体が主体であるが、遅発型アレルギーの病態では Th2 細胞と好酸球が主体である。BALB/c マウスに遅発型喘息を発症させると、好酸球・リンパ球による気管支・細気管支の炎症が起こり、末梢血や肺門リンパ節、胸腺において Treg が減少した。さらに、喘息病変の重症度と相関して Tregs 数の減少または Th2 サイトカインの IL-4 や Treg から分泌される免疫抑制性サイトカインの TGF- β 1 と IL-10 の肺門リンパ節における mRNA 発現の低下が認められた。なお、病変部において選択的活性化 M2 マクロファージの増加も認められた。病変形成には Treg 減少と免疫抑制性サイトカインの産生低下とが密に関係することが分かった。すなわち、本研究では、Treg は細胞間接着や免疫抑制性サイトカインの産生により、遅発型アレルギー性喘息の病態発現を調節することが示唆された。

<第 2 章>

難治性・進行性疾患である幼児の胆道閉鎖症の原因として、先天的胆道発生異常やウイルス感染（レオウイルス、ロタウイルス等）等が示唆されている。しかしながら、本病態を動物に作ることは極めて困難である。従って、その原因や発病機序については不明な点が多い。本研究では、新生仔 DBA/1J マウスにレオウイルス 2 型 (Reo-2) を接種して胆管傷害の機序を免疫病理学的に調べた。Reo-2 感染・増殖により肝外胆管上皮が傷害され、それに加えて、肝臓からのウイルス排除後、軽度の線維化を伴う非化膿性肝外胆管炎が認められた。胆管上皮における MHC class I の過剰発現、FAS の異所性発現、胆管上皮周囲での TNF- α 陽性マクロファージ、CD3・CD4・CD8・IFN- γ ・FAS・FASL・TNF- α 陽性リンパ球 (Tc 細胞・Th1 細胞優位) の浸潤が認められた。さらには、胆管上皮はアポトーシスや壊死に陥っていた。また、血中では胆管上皮細胞質抗体・IFN- γ の産生、脾細胞における IFN- γ 発現増強も認められた。なお、病変局所やリンパ節、胸腺では制御性 T 細胞 (Treg : Foxp3 陽性) 数が非感染対照群に比べ少なかった。以上より、Reo-2 感染新生仔 DBA/1J マウスでは、ウイルス増殖に引き続く自己免疫的機序による胆管上皮の破壊があることが示唆された。この病変は幼児の胆道閉鎖症の炎症期の病変と類似しており、本実験系はその病態解明の良いモデルとなる可能性があること、この病変発現の背景には Treg の質的・量的変化があること、そしてレオウイルスが本病態の原因となることも示唆された。

<第 3 章>

アレルギー性喘息は肥満細胞と IgE が関与する即時型と、Th2 細胞と好酸球が主体の遅発型に分けられ、その発現には遺伝的要因と環境要因が影響すると言われている。一方、Reo-2 に感染した新生仔 DBA/1J マウスでは、ウイルス増殖相と自己免疫性の β 細胞破壊相の 2 段階で Th1 型反応が惹起されるが、この Reo-2 誘導自己免疫性膵島炎は一過性で、マウスは数日で回復する。本研究では、衛生仮説の考えを基盤に置き、Reo-2 誘導自己免疫性膵島炎から回復した DBA/1J マウスにおける遅発型アレルギー性喘息の病態発現を調べた。生後 1 日齢の DBA/1J マウスに Reo-2 を感染させ、その 4 週間後に OVA で感作・チャレンジを行った。OVA 感作・チャレンジ後における末梢血中の総白血球数・好酸球数の増加および気管支・細気管支病変は、Reo-2 感染させたマウスでは軽度であった。また、免疫組織化学的に、気管支周囲における Th2 細胞および接着因子の発現の減少、Th1 細胞の増加がみられた。更に、脾細胞培養上清中の Th2 サイトカイン濃度の低下と Th1 サイトカイン濃度の上昇、血漿中 OVA 特異的 IgE と炎症性サイトカイン濃度の減少が認められた。なお、Reo-2 感染群において感作・チャレンジ後に膵島炎は認められなかった。以上より、新生仔期に Reo-2 に感染した DBA/1J マウスでは感染耐過後でも体内では Th2 から Th1 へのバランスシフトが生じ、Th1/Th2 相互抑制作用により Th2 性遅発型アレルギー性喘息の病態は軽減することが示唆された。

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	中嶋朋美
審査委員	主 査：山口大学 教授 林 俊春
	副 査：山口大学 教授 水野拓也
	副 査：鳥取大学 教授 森田剛仁
	副 査：山口大学 教授 佐藤 宏
	副 査：山口大学 教授 前田 健
題 目	Immunopathological analysis of immune diseases as Th1/Th2 unbalanced diseases Th1/Th2 病としての免疫疾患の免疫病理学的解析
審査結果の要旨： 通常は無害な物質に対して生体が過剰に反応するアレルギー性疾患や免疫寛容維持機構の破綻を背景に、自己成分に対して反応する自己免疫疾患などの免疫疾患の発症には遺伝的・環境要因が大きく関わっている。正常な生体ではサイトカイン・ケモカイン、接着分子や免疫担当細胞が複雑にネットワークを形成して恒常性を維持しているが、このネットワークの攪乱が免疫疾患の病態発現に関係している事が知られている。本研究では、免疫疾患の病態を Th1/Th2 バランス異常という観点から免疫病理学的解析を行った。 <第 1 章> 自己寛容維持に関わる CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ 制御性 T 細胞 (Treg) の局在と喘息病変発現との関連については理解が進んでいない。そこで、BALB/c マウスに卵白アルブミン (OVA) で遅発型アレルギー性 (気管支) 喘息 (late allergic asthma: LAA) モデルを作製し、それらの点について調べた。対照群 (非感作・非チャレンジ) に比べ、OVA 特異的 IgE 産生、好酸球増多症、好酸球と CD3 ⁺ ・CD4 ⁺ T 細胞浸潤による (細) 気管支炎がみられたが、CD20 ⁺ B 細胞の浸潤は少なかった。末梢血・肺門リンパ節・胸腺では Treg 数が減少していた。さらに、喘息病変の重症度と相関して全身性の Treg 数減少や IL-4 産生亢進、肺門リンパ節での IL-4 mRNA 発現増強と TGF-β1・IL-10 mRNAs 発現低下がみられた。IFN-γ mRNA の発現・増強はみられなかった。病変部には主に arginase-1 ⁺ M2 Mφ 浸潤が認められた。 以上により、病変形成過程においては Th2 優位の反応が生じる事、Treg 数減少と免疫抑制性サイトカインの産生低下・病態増悪とが密接に関係する事が分かった。なお、M2 Mφ は病変の進展に抑制的に働いている事が示唆された。	

<第 2 章>

難治性・進行性疾患であるヒト幼児の胆道閉鎖症 (biliary atresia: BA) の原因としては、先天的胆道発生異常やウイルス感染 (レオウイルス、ロタウイルス等) 等が示唆されている。しかしながら、本病態を動物に作る事は極めて困難であり、その原因や発病機序については不明な点が多い。そこで、新生仔 DBA/1J マウスにレオウイルス 2 型 (Reo-2) を接種して肝外胆管傷害の機序を調べた。まず、ウイルス感染・増殖による胆管上皮の破壊 (壊死・アポトーシス) がみられた。ついで、肝臓からのウイルス排除後に軽度の線維化を伴う非化膿性胆管炎が認められた。胆管上皮では MHC class I の過剰発現、FAS・FASL の異所性発現、TNF- α + M ϕ ・CD3⁺・CD4⁺・CD8⁺・IFN- γ ⁺・FAS⁺・FASL⁺または TNF- α ⁺ の Tc・Th1 細胞浸潤と樹状細胞の混在が認められ、胆管上皮細胞質抗体産生と ALP 値上昇を伴う胆管上皮の破壊がみられた。非感染対照群に比べ脾細胞における IFN- γ mRNA 発現増強がみられたが、IL-4・IL-17A・TGF- β 1 産生・mRNAs 発現との関連はみられなかった。病変部・リンパ節・胸腺では Treg 数は少なかった。なお、上皮の破壊はウイルス感染・増殖による壊死や TRAIL による DR の活性化を介するアポトーシスによる事が示唆された。

以上により、Reo-2 感染により、Th1 優位の反応・胆管上皮細胞質を標的とした自己免疫的機序による破壊が生じ、BA の炎症期の優れたモデルとなる事、病変発現・病変進展の背景には Treg の質的・量的変化がある事が示唆された。

<第 3 章>

Reo-2 に感染した新生仔 DBA/1J マウスでは、Th1 型優位の一過性の自己免疫性膵島炎が惹起される。そこで、衛生仮説の観点から、本ウイルス感染マウスの OVA 誘導 LAA に及ぼす影響を調べた。LAA 発現は、非感染喘息群に比べて軽減しており、気管支壁では IL-4⁺・VLA-4⁺ Th2 細胞浸潤や血管内皮細胞の Eotaxin-2 や VCAM-1 等の接着分子の発現低下がみられた。また、脾細胞培養上清の Th2 サイトカイン (IL-4・IL-5)・TNF- α ・OVA 特異的 IgE 産生は低下し、IFN- α 産生には差はなかった。

以上により、感染耐過後体内に Th1 記憶細胞が生存し、Th2 から Th1 へのバランスシフトが生じ、Th1/Th2 相互抑制作用により Th2 型 LAA の病態が軽減する事が示唆された。接着分子の発現低下はその一因となると推測される。

これらの一連の研究は、Th1/Th2 バランス異常という観点から免疫疾患を解析したもので、免疫疾患の病態解明とともに、予防・治療にも応用可能な展開性のある研究で、学術的価値は高く、獣医学・医学分野の研究の発展に大きく貢献する事が期待される。以上により、本論文は博士 (獣医学) の論文として、妥当なものであると判断された。