

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	BOGDANOVA Dana
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大博 (医) 第 1801 号
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
博士論文名	Essential Role of Canonical NF- κ B Activity in the Development of Stromal Cell Subsets in Secondary Lymphoid Organs (二次リンパ器官の間質細胞サブセット発生において NF- κ B 古典的経路活性化が果たす必須の役割)
論文審査委員	主査 教授 牛木 辰男 副査 教授 近藤 英作 副査 教授 片貝 智哉

博士論文の要旨

<背景と目的>

二次リンパ器官はリンパ球と非血球系間質細胞の密接な相互作用を伴った複雑な過程を経て形成される。リンパ節やパイエル板の形成には、胎児期に自然リンパ球の一種であるリンパ組織誘導細胞 (LTi) と原間質細胞 (LT₀) の相互作用が必要であるのに対し、脾臓の白脾髄形成には出生後の成熟したリンパ球と血管周囲の間質細胞の相互作用が関与している。

リンパ球系の細胞が産生するサイトカインの一種、リンフォトキシン α 1 β 2 を間質細胞上に発現するリンフォトキシン β 受容体が感知すると、間質細胞内では転写因子 NF- κ B を介するシグナル伝達経路が活性化することが知られている。この活性化によって間質細胞から産生される CXCL13 や CCL19、CCL21 等のケモカインの発現が促進するため、二次リンパ組織には更に多くのリンパ球系の細胞が呼び寄せられ、結果として間質細胞の活性化が更に亢進する正のフィードバックシステムが形成される。このシステムの形成が組織構築の進行に重要であると考えられている。

しかし生体内において間質細胞内部の NF κ B 経路の活性化が二次リンパ器官の発生と組織形成に必須であるかは、厳密な意味では直接的に示されていない。申請者らは条件付き遺伝子組換えマウスを用いて、この点を明らかにすることを試みた。

<方法>

転写因子 NF- κ B は、平常時にはその働きを阻害する I κ B と複合体を形成して細胞質内で不活性化されているが、活性化シグナルが伝達されると I κ B が速やかに分解され、NF- κ B は活性化、核移行して様々な遺伝子の発現を誘導する。I κ B の変異タンパク質 I κ BSR は活性化シグナルが伝達されても分解されず、NF- κ B の働きを抑制し続けることができる。また、ケモカインの一つである CCL19 の遺伝子の転写制御領域を利用した遺伝子組換えマウスでは、二次リンパ器官の間質細胞のみで目的のタンパク質を発現させることができる。

申請者らは CCL19 遺伝子の転写制御下で Cre タンパク質を発現させ、Cre-loxP システムを利用して二次リンパ器官の間質細胞のみで I κ BSR の発現を誘導することで、恒常的に NF- κ B 経路の

活性化を阻害する遺伝子組換えマウス (Ccl19-IkBSR) を作製して、生体内における二次リンパ器官の形成にどのような影響があるのかを調べた。

<結果>

○Ccl19-IkBSR マウスでは、リンパ節のサイズが小さく、形状にも異常が認められ、内在しているリンパ球の数も激減していた。脾臓には外見上大きな変化は認められなかったものの、リンパ球の数には減少を認めた。○フローサイトメーターによる解析を行ったところ、リンパ節ではT細胞の割合が大きく減少し相対的にB細胞の割合が高くなっていたのに対し、脾臓ではこれらの割合に変化は認められなかった。○免疫組織化学的手法でリンパ組織の内部を観察すると、リンパ節ではT細胞領域の発達が大きく阻害されT細胞の数にも明らかな減少が認められたが、B細胞の存在する濾胞はサイズに変化が認められるものの影響は比較的軽微で多くのB細胞を確認した。脾臓では殆どのT細胞が白脾髄のT細胞領域に局在せず、赤脾髄に蓄積しているのに対し、濾胞は小さいながらも確認することが出来た。○定量的PCRでリンパ節、脾臓から産生されるケモカインの発現量を比較したところ、Ccl19-IkBSR マウスではどちらの組織でもT細胞領域の間質細胞が産生しているCCL21の発現が激減していた。これに逆相関して、リンパ節では濾胞の間質細胞が産生するCXCL13の増加が顕著であった。○CCL19の転写制御領域を利用したCre-loxPシステムでGFPの発現を誘導する遺伝子組換えマウスでは、二次リンパ器官の全ての間質細胞でGFPが発現するところを確認したが、Ccl19-IkBSR マウスでは濾胞を形成している間質細胞にIkBSRの発現が誘導された形跡が認められなかった。

<考察>

CCL19 ケモカインはT細胞領域の間質細胞が発現するケモカインとして知られているが、CCL19の転写制御領域を利用したCre-loxPシステムの遺伝子組換えマウスでは二次リンパ組織の全ての間質細胞に作用が及ぶことから、濾胞を含む全ての間質細胞はその分化過程で一過性にCCL19を発現するものと考えられる。IkBSRが発現した間質細胞は正常な組織形成を誘導できず、ケモカインの発現も著しく減少したことから、間質細胞におけるNF- κ B経路の活性化が二次リンパ器官の発生と組織構築に必須であることが確認された。また、Ccl19-IkBSRマウスのリンパ節濾胞ではIkBSRの発現が認められない間質細胞が存在したことから、濾胞の間質細胞には未分化細胞からCCL19発現を伴わずに分化することが可能な代替経路が存在する可能性が示唆された。このため、濾胞領域の影響が比較的軽微であったと考えられる。

審査結果の要旨

二次リンパ器官はリンパ球と非血球系間質細胞の密接な相互作用を伴った複雑な過程を経て形成される。本研究では、CCL19遺伝子の転写制御下でCreタンパク質を発現させ、Cre-loxPシステムを利用して二次リンパ器官の間質細胞のみでIkBSRの発現を誘導することで、恒常的にNF- κ B経路の活性化を阻害する遺伝子組換えマウス (Ccl19-IkBSR) を作製し、二次リンパ器官の形成への影響を調べた。

Ccl19-IkBSRマウスのリンパ節は小さく、形状に異常がみられ、内在するリンパ球数も激減していた。脾臓では外見上の変化はみられないが、リンパ球数は減少していた。フローサイトメーターの解析で、リンパ節ではT細胞の割合が大きく減少していたが、脾臓では割合の変化はみられなかった。免疫組織化学的には、リンパ節でT細胞領域の発達が乏しい一方で、濾胞への影響は軽微であった。

脾臓でも白脾髄の T 細胞領域の発達は乏しいが、濾胞は小さいながら確認された。

以上から、IkBSR が発現した間質細胞は正常な組織形成を誘導できず、ケモカインの発現も著しく減少し、間質細胞における NF- κ B 経路の活性化が二次リンパ器官の発生と組織構築に必須であることが示された。また、濾胞の間質細胞に、未分化細胞から CCL19 発現を伴わずに分化しうる代替経路が存在する可能性も示唆された。

以上の所見は、二次リンパ器官の形成を考える上の重要な知見を与えるもので、その点で学位論文の価値を認める。