

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	黒澤 陽一
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 811 号
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	Extensively reorganized systemic lymph nodes provide a feasible environment for self-reactivity in lupus-prone NZB/NZW F1 mice (NZBWF1 マウスにおいて大規模に組織再編された全身のリンパ節が自己免疫応答に適した環境を与える)
論文審査委員	主査 教授 近藤 英作 副査 教授 河内 裕 副査 教授 成田 一衛

博士論文の要旨

背景・目的

NZB×NZW F1 (BWF1) マウスは全身性エリテマトーデス(SLE)を自然発症する古典的モデルであり、加齢とともに抗二本鎖 (ds) DNA 抗体が出現し、糸球体腎炎 (GN) を発症する。二次リンパ組織における胚中心は、高親和性抗体獲得のために重要な構造であり、T 細胞依存的に抗体産生細胞が誘導される。これまで、いくつかの SLE モデルマウスにおいて胚中心形成が亢進することが報告されているが、おもに脾臓についての研究であり、リンパ節(LN: Lymph Nodes)の役割に関してはほとんど明らかにされていない。申請者らは、LN と自己免疫応答との関連を明確にする目的で、脾摘により脾臓の影響を除外したうえで、LN において抗体産生に関わる一連の応答を検討した。

方法

雌の BWF1 マウスは、加齢とともに血清中に抗 dsDNA 抗体がみられ、ループス腎炎様の症状を呈する。実験には雌マウスのみ使用し、尿試験紙で 3+以上を示した個体を腎炎発症とした。表在 LN (鼠径部、腋窩、上腕および頸部)、腎臓および腫大した頸部 LN (腎炎を発症したマウスでみられる) を用いて、フローサイトメトリーおよび蛍光免疫染色による解析を行った。LN からリンパ球を単離し、48 時間培養を行い、培養上清を回収した。血清、および培養上清中の自己抗体は ELISA により評価した。病態における脾臓の必要性を評価するため、6 週齢 BWF1 マウスの脾摘を行った。

結果

脾摘マウスでは未処置コントロールに比べわずかに早い時期から抗 dsDNA 抗体が検出され、糸球体腎炎の発症もみられた。したがって、脾臓非存在下においても自己抗体産生細胞が誘導されることが明らかになった。

申請者らは、脾臓と同じ二次リンパ組織である LN が自己抗体産生に関与しているとの仮説を

立てた。これを検証するために、申請者らは 30~40 週齢で腎炎を発症している BWF1 マウスの全身の LN を免疫学的小および組織学的に調べ、8~10 週齢の BWF1、腎炎を発症していない BWF1 と 30~40 週齢の NZW マウスと比較した。

フローサイトメトリーにより、腎炎を発症したマウスの LN でのみ B 細胞の増加が観察された。蛍光免疫組織化学染色では、腎炎を発症した BWF1 マウスの表在 LN において、有意な濾胞拡張、傍皮質の T 細胞領域の萎縮、T 細胞の散乱分布、および髄質の拡大を示した。腎所属 LN は腎炎を発症したマウスで顕著に腫大していた。これらの変化は、脾摘マウスにおいても同様にみられた。

次に、全身の LN における胚中心(germinal center; GC)形成を評価するために、フローサイトメトリーにより B220⁺ GL7⁺ GC B 細胞を評価した。若齢 BWF1 および 30~40 週齢の NZW マウスでは、LN に GC B 細胞はほとんど認めなかったが、腎炎を発症した BWF1 マウスの表在 LN では増加が見られ、腫大した頸部 LN や腎所属 LN ではその傾向がより顕著であった。脾摘マウスでも同様に GC B 細胞の増加がみられた。また、GC 数は腎炎を発症したマウスで有意に増加し、腎と頸部 LN ではさらに増加した。

GC の形成および B 細胞による高親和性抗体産生は濾胞性ヘルパー T (Tfh) 細胞に依存する。LN 中の CD4⁺ CXCR5⁺ PD-1^{hi} Tfh 細胞は、若齢 BWF1 マウスおよび 30~40 週齢 NZW マウスではほとんど検出されなかったが、腎炎を発症した BWF1 マウスの LN において Tfh 細胞は顕著に増加していた。脾摘した BWF1 の LN でも同様に Tfh 細胞の増加を示した。

LN における形質細胞の存在は、同 LN 中の B 細胞から直接分化したことを示唆する。CD138⁺

形質細胞は、腎炎発症マウスおよび脾摘マウスの LN、特に腫大した腎臓および頸部 LN でコントロールと比較し顕著に増加した。LN における自己抗体産生を確認するために、LN のリンパ球を単離、培養した。抗 dsDNA 抗体は、腎炎を発症した BWF1 マウス由来の LN の細胞の培養上清中に検出されたが、若齢 BWF1 および B6 マウス由来のものでは検出されなかった。以上のことから、自己抗体産生リンパ球が全身の LN において生成されることが示唆された。

考察

申請者らの今回の研究は BWF1 マウスの全身の LN における大規模な組織再構築の進行を示した。腎炎を発症する BWF1 マウス由来の LN において、GC B 細胞、Tfh 細胞および形質細胞は大幅に増加し、自己抗体産生に関連する免疫応答の存在を明らかにした。これらの結果は、LN が自己反応性リンパ球を活性化してループスの病態に寄与する部位であることを示唆している。脾摘 BWF1 マウスが、脾臓を有する個体に匹敵する LN 変化を伴って腎炎を発症することは、全身性自己免疫が脾臓なしで進行し得ることを示唆する。従って、脾臓が存在しない場合、自己抗体の産生に対する応答は他の二次リンパ組織、おそらく LN において開始される。

また、脾摘マウスの血清抗 dsDNA 抗体は、未処置のコントロールよりもわずかに早い時点で検出された。脾臓は抑制性免疫細胞の存在のために、全身性自己免疫の進行において何らかの抑制的役割を有する可能性がある。

結論として、全身性自己免疫の病態に寄与する潜在的な部位として LN を考慮する必要があり、LN の組織学的小および免疫学的小変化が疾患進行の有用な指標となる可能性がある。

審査結果の要旨

NZB×NZWF1 (BWF1) マウスは全身性エリテマトーデス(SLE)を自然発症するモデルであり、加齢とともに抗二本鎖DNA抗体が出現し、糸球体腎炎(GN)を発症する。このマウスでは末梢リンパ組織での胚中心形成を伴う2次濾胞の形成が報告されているが、おもに脾臓の影響に焦点を当てた研究であり、リンパ節(LN: Lymph Nodes)自身の役割に関しては不明である。そこで申請者は、LNと自己免疫応答との関連を明確にする目的で、脾摘により脾臓の影響を除外したうえで、LNにおいて抗体産生に関わる一連の応答を検討した。脾摘マウスでは未処置コントロールに比べわずかに早い時期から抗dsDNA抗体が出現し、糸球体腎炎も発症した。腎炎を発症したマウスのLNでのみB細胞の増加が観察された。脾摘の有無にかかわらず、腎炎発症マウスのLNにおいて、濾胞拡張、傍皮質のT細胞領域の萎縮、T細胞の散乱分布、および髄質の拡大が観察された。LN中のCD4⁺CXCR5⁺PD-1^{hi}Tfh細胞は、コントロールでは殆ど検出されないのに対し、腎炎発症マウスのLNにおいては顕著に増加していた。また抗dsDNA抗体は、腎炎を発症したBWF1マウス由来のLNの細胞の培養上清中に検出された。

以上、全身性自己免疫の病態形成に寄与する部位として、脾臓の他にLNを考慮する必要性とLNの組織学および免疫学的変化が疾患進行の有用な指標となる可能性を証明した点に、本論文の博士論文としての価値を認める。