

学位論文題名

HTLV-I LTR-env-pX 遺伝子導入ラットにおける
臓器特異的自己免疫疾患の発症機序に関する検討

学位論文内容の要旨

自己免疫疾患は、免疫系を中心とする様々な遺伝的要因を背景に何らかの環境要因をきっかけとして免疫学的自己寛容状態の破綻をきたし発症すると考えられる。その破綻を誘導する環境要因としては、以前より種々の病原体の関与が想定されている。特にウイルスは、その感染症で様々な自己免疫現象や自己免疫疾患類似の病態を引き起こすことが知られており注目されている。ヒトT細胞白血病ウイルスI型(Human T lymphocyte virus type I, 以下 HTLV-I)は、成人T細胞白血病(ATL)の原因ウイルスであるのみならず、痙性脊髄麻痺を主症状とするHAM/TSPをはじめとして、慢性関節リウマチ類似の関節炎(HAAP)、シェーグレン症候群類似の唾液腺炎、HTLV-Iぶどう膜炎、T細胞性肺炎(HAB)など、HTLV-I関連疾患と総称される自己免疫疾患に類似した様々な疾患を引き起こすことが知られている。当教室では、このようなHTLV-Iの多彩な病原性について *in vivo* で解析するため、HTLV-IのEnvおよびp40-Tax蛋白をコードするenv-pX遺伝子をウイルス自身のLTRプロモーターの制御下にWKAHラット受精卵に導入してHTLV-I LTR-env-pXトランスジェニックラット(以下env-pXラット)を作製し、このラットに慢性関節リウマチ類似の関節炎、壊死性血管炎、皮膚炎、心筋炎、筋炎など様々なcollagen vascular diseasesが発症することを報告してきた。本研究では、env-pXラットに認められる自己免疫疾患の発症機序を明らかにするために、正常同系ラットとの間で、脾細胞置換実験(SCT)および骨髓細胞置換実験(BMT)を行い、レシピエントラットにおける疾患発症の有無について病理学的ならびに血清学的解析を行った。また、胸腺でのリンパ球分化過程における導入遺伝子の役割を明らかにするために、胸腺を置換した上で骨髓細胞移入実験(ATx+TT+BMT)を行い病理学的ならびに血清学的解析を行った。

まずSCTでは、env-pXラットの脾細胞を正常ラットに移入した群では皮膚炎と血管炎が発症が観察された。皮膚炎については、肉眼的に脱毛が認められ、病理組織学的には表皮および真皮への単核球浸潤、表皮の潰瘍、錯角化などが観察された。この所見は、env-pXラットに認められる皮膚炎の所見と同様であった。また血管炎については、上縦隔あるいは腸間膜、精巣血管網など脂肪織によって周囲を支持されている組織内の小動脈に、周囲の線維増生、単核球主体の炎症細胞浸潤、血管壁中膜のフィブリノイド壊死を伴う壊死性動脈炎像であった。一方、正常脾細胞をenv-pXラットに移入した群では、ほぼすべての疾患の発症が抑制された。次にBMTでは、env-pXラット骨髓細胞を正常ラットに移入した群では、皮膚炎の発症が誘導されたが、その他の疾患の発症は認められなかった。皮膚

炎については、肉眼的および病理組織学的に SCT で認められたものと同様の所見であった。一方、env-pX ラットに正常骨髄細胞を移入した群では、皮膚炎の発症は抑制されたが、関節炎、血管炎、心筋炎、筋炎は抑制されなかった。関節炎については、env-pX ラットで認められていた骨破壊像やパンスの形成は認められず、関節腫脹も示さなかったものの、関節滑膜の lining cell hyperplasia や周囲間質への単核球等の炎症細胞浸潤が認められた。また ATx+TT+BMT では、正常 WKAH ラットに放射線照射後胸腺を摘出し、env-pX ラットの胸腺フレームワークを移植し正常骨髄を移入した群において、病理組織学的に、精巣血管網の部位を主体とし、血管の内腔、壁、および周囲への単核球主体の炎症細胞浸潤や、周囲線維の肉芽腫様増生によって構成され、一部フィブリノイドの沈着を示す壊死性血管炎の発症が認められた。血管炎以外の関節炎、心筋炎、筋炎、皮膚炎の発症は認められなかった。また血清学的解析では、BMT レシピエントラットでは、関節炎を発症したラットの一部にリウマトイド因子(RF)の産生が認められたが、SCT および ATx+TT+BMT の群では明らかな RF の産生は確認されなかった。

以上の結果から、env-pX ラットに認められる自己免疫疾患には標的となる臓器により異なる発症機構が存在することが示唆された。まず、皮膚炎については、SCT、BMT のいずれでも正常ラットに疾患の移入が可能であった。したがって、env-pX ラットの皮膚炎は、env-pX 遺伝子を発現するリンパ球が自己抗原を標的として起こす自己免疫疾患であり、その自己免疫現象の成立には、胸腺は関与していないものと思われる。次に関節炎や心筋炎、筋炎については、BMT および SCT の結果から、標的組織における env-pX 遺伝子の存在が疾患発症には必要であると考えられる。すなわち、標的分子は env-pX 遺伝子産物そのもの、あるいは env-pX 遺伝子に関連した抗原と考えられるが、関節炎局所の浸潤 T 細胞の T 細胞レセプター解析の結果からは、env-pX 遺伝子産物そのものといった単一の抗原が標的となっている可能性は低く、むしろ env-pX 遺伝子に関連した多彩な抗原を標的とした免疫反応が考えられている。一方、env-pX ラットの血液細胞を正常骨髄で置換することによりこれらの疾患の程度は抑えられるので、env-pX 遺伝子を発現するリンパ球は疾患の増悪因子として働いていることも示唆される。一方血管炎は、SCT で正常ラットに移入可能であることより、正常の血管構成分子が標的となり発症する自己免疫疾患であるといえる。しかし、皮膚炎と異なり BMT では、正常ラットに疾患を移入できなかった。env-pX ラットの脾細胞と骨髄細胞の違いは、env-pX 遺伝子を発現する胸腺を通過しているかどうかの違いと考えられるので、env-pX ラットの血管炎の発症には胸腺が深く関わっていると想定される。そこで血管炎発症における胸腺の関与を明らかにするために ATx+TT+BMT を行ったところ、胸腺のフレームワークにのみ env-pX 遺伝子を発現するように作製したラットに予想されたとおり血管炎の発症が観察された。したがって、env-pX ラットの血管炎は未熟なリンパ球が env-pX 遺伝子を発現する胸腺を通過することにより、正常の血管構成分子に対する反応性を保つ自己反応性細胞として末梢に出現してしまうことにより発症する自己免疫疾患と推定される。ATx+TT+BMT の実験系では、レシピエントの末梢血への移植胸腺由来リンパ球の混入は不可避であるが、今回の検討ではその混入比率は極めて低く、env-pX ラットの移植胸腺由来のリンパ球が血管炎の発症に関与した可能性は考えにくい。今後マイクロダイゼクション法により血管炎局所の浸潤リンパ球から選択的に DNA を抽出し、env-pX 遺伝子が検出されないことを確認する必要がある。

現在のところ、env-pX 遺伝子を発現する胸腺フレームワークがどのような分子機構で自己

に対する免疫学的寛容の破綻を誘導しているのかは明らかではないが, env-pX ラットの胸腺非リンパ球系細胞における種々の遺伝子発現の変化について, DNA アレイなどを用いて検討する必要がある. また, env-pX ラットおよび env-pX ラット胸腺に置換した正常ラットにおいて血管局所に浸潤するリンパ球のクローン解析や血管炎惹起性のリンパ球クローンの樹立などの検討も必要である.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 西 村 孝 司

学 位 論 文 題 名

HTLV-I LTR-env-pX 遺伝子導入ラットにおける 臓器特異的自己免疫疾患の発症機序に関する検討

ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (Human T lymphocyte virus type I、以下 HTLV-I) は、成人 T 細胞白血病 (ATL) の原因ウイルスであるのみならず、HTLV-I 関連疾患と総称される自己免疫疾患に類似した様々な疾患を引き起こすことが知られている。当教室では、このような HTLV-I の多彩な病原性について *in vivo* で解析するため、HTLV-I の env-pX 遺伝子をウイルス自身の LTR プロモーターの制御下に WKAH ラット受精卵に導入して HTLV-I LTR-env-pX トランスジェニックラット (以下 env-pX ラット) を作製し、このラットに様々な自己免疫疾患が発症することを報告してきた。本研究では、env-pX ラットに認められる疾患の発症機序を明らかにするために、正常同系ラットとの間で、脾細胞置換実験 (SCT) および骨髄細胞置換実験 (BMT) を行い、レシピエントラットにおける疾患発症の有無について病理学的ならびに血清学的解析を行った。また、胸腺でのリンパ球分化過程における導入遺伝子の役割を明らかにするために、胸腺を置換した上で骨髄細胞移入実験 (ATx+TT+BMT) を行い病理学的ならびに血清学的解析を行った。BMT では、env-pX ラット骨髄細胞を正常ラットに移入した群では、皮膚炎の発症が誘導されたが、その他の疾患の発症は認められなかった。一方、env-pX ラットに正常骨髄細胞を移入した群では、皮膚炎の発症は抑制され、関節炎、血管炎、心筋炎、筋炎は発症するものの病勢の減弱が認められた。SCT では、env-pX ラットの脾細胞を正常ラットに移入した群では皮膚炎と血管炎の発症が観察された。一方、正常脾細胞を env-pX ラットに移入した群では、ほぼすべての疾患の発症が抑制された。また ATx+TT+BMT では、正常ラットに env-pX ラットの胸腺フレームワークを移植し正常骨髄を移入した群において、血管炎の発症が認められた。血管炎以外の関節炎、心筋炎、筋炎、皮膚炎の発症は認められなかった。また血清学的解析

では、**BMT** レシピエントラットでは、関節炎を発症したラットの一部にリウマトイド因子(**RF**)の産生が認められたが、**SCT** および **ATx+TT+BMT** の群では明らかな **RF** の産生は確認されなかった。以上の結果から、**env-pX** ラットに認められる自己免疫疾患には標的となる臓器により異なる発症機構が存在することが示唆された。とくに **env-pX** ラットの血管炎は未熟なリンパ球が **env-pX** 遺伝子を発現する胸腺を通過することにより、正常の血管構成分子に対する反応性を保つ自己反応性細胞として末梢に出現してしまうことにより発症する自己免疫疾患と推定された。

口頭発表において、西村孝司教授より血管炎発症時に、**env-pX** 遺伝子を発現する胸腺フレームワークにおいて自己反応性 T 細胞の **selection** 機構にどのような異常があると考えられるのか、**env-pX** 遺伝子を発現する胸腺で正常血管内皮細胞の抗原と交叉性をもつ抗原が存在するのか、疾患局所浸潤細胞は **Th1**、**Th2** のどちらが優位なのか、正常ラットにおける抑制性 T 細胞の解析状況について質問があった。続いて、小池隆夫教授より **env-pX** ラットにおける血管炎はヒトにおいてどのような血管炎のモデルになるのか、また液性免疫の影響を除いたモデルの確立の必要性、**WKAH** ラットをバックグラウンドとしないとこれらの疾患は発症しないのか、移植した胸腺内に残存しているリンパ球が血管炎発症に関与している可能性について質問があった。また、吉木敬教授より **env-pX** ラットの胸腺フレームワーク内でどのような分子の異常があるのか、血管炎惹起性 T 細胞クローンの樹立、血管局所浸潤細胞の性格について質問があった。以上の質問に対し申請者は概ね妥当と思われる回答をした。

この論文は、血管炎の新しい発症機序を示すものとして高く評価され、今後血管炎の発症機構を解明する動物モデルとして更なる解析が期待される。

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。