

学位論文題名

Role of T cells in granuloma formation induced by
Rhodococcus aurantiacus is independent of
their interferon-gamma production.

(*Rhodococcus aurantiacus* 感染により誘導された
肉芽腫形成における T 細胞の役割に関する研究)

学位論文内容の要旨

細胞内増殖菌による感染に伴う肉芽腫形成は、感染症からの治癒過程で生じる生体防御機構の典型的な姿として理解されている。病理組織学的には類上皮細胞よりなる結節性の病巣であり、リンパ球やマクロファージの関与が見られる。感染性肉芽腫の代表とも言える結核においては、類上皮細胞性肉芽腫の中心部に壊死巣が見られ、結核結節の特徴とされている。一方、類上皮細胞よりなる非壊死性肉芽腫が全身に多発し病態を形成するサルコイドーシス症がある。類上皮細胞性肉芽腫の形成機序や病態との関係はまだ十分には解明されていない。これまで、マウス、ラット、ウサギなどの実験動物を用いた肉芽腫の形成機序について様々な研究が行われてきたが、我々はマウスを用いて *Rhodococcus aurantiacus* (*R. aurantiacus*) 菌感染における肉芽腫形成のメカニズムを解析してきた。

マウスの肉芽腫には、Th1 細胞を主体とした Type1 肉芽腫と Th2 細胞を主体とした Type2 肉芽腫があることが指摘されてきた。正常マウスでは、*R. aurantiacus* の静脈内感染により誘導された肉芽腫はサルコイドーシス症に類似する類上皮細胞よりなる非壊死性肉芽腫であり、Th1 サイトカインである IFN- γ 、TNF- α に依存的に発達し、典型的な Type1 肉芽腫と言える。*R. aurantiacus* 感染後、正常マウスの IFN- γ は 2 峰性の産生パターンを示し、感染後 1~3 日に最初の IFN- γ ピークが認められ、その後徐々に減少するが、感染後 2 週目、つまり肉芽腫が増大する時期に IFN- γ は再び臓器中に高く検出され、ピークに達した後肉芽腫の退縮とともに漸減する。感染初期 IFN- γ の減少は Th2 サイトカインである IL-10 により調節され、後期 IFN- γ の減少および肉芽腫の退縮は Th2 サイトカインである IL-4 によると考えられるが、肉芽腫形成因子として感染初期 IFN- γ は NK 細胞より産生され、後期 IFN- γ は CD8⁺T 細胞より産生される。これらの IFN- γ の役割を解明するために、今回 IFN- γ ノックアウト (KO) マウスを用いて肉芽腫の形成と内在性サイトカインの産生との関係について検討した。

R. aurantiacus (1×10^8 CFU/マウス) を静脈内に接種した正常 C57BL/6 マウスおよび正常 BALB/c マウスにおける類上皮性肉芽腫の形成に対し、C57BL/6 IFN- γ KO マウスおよび BALB/c IFN- γ KO マウスでは肉芽腫は全く形成されず、肝臓を中心に軽度の炎症細胞浸潤のみ認められた。正常

マウスに比較し IFN- γ KO マウスでは IL-10 の産生が上昇していた。経時的にマウス体内の生菌数を測定したところ、*R. aurantiacus* はマウス体内で増加せず、正常マウスではほぼ感染 10 日前後に消失するが、IFN- γ KO マウスでは感染 2 週間後まで残存していた。すなわち IFN- γ KO マウスでは、感染防御機構としての肉芽腫が形成されないために、菌の排除が遅れたと解釈される。IFN- γ KO マウスにおける肉芽腫形成抑制機序を解明するために、マウスの感染脾細胞の移入実験を行った。C57BL/6IFN- γ KO マウスに *R. aurantiacus* を感染させる前日に、感染後 7 日目の正常マウスの脾細胞 (1×10^8 /マウス) を移入しても、感染後 2 週目に肉芽腫は形成されず、IFN- γ も検出されなかった。IL-10 の産生が抑制された。逆に、IFN- γ KO マウスの感染脾細胞を移入した正常マウスでは、感染のみの正常マウスに比較し形成した肉芽腫の数量およびサイズが減少し、IL-10 が高く検出されたが、IFN- γ の産生には有意差がなかった。また、*R. aurantiacus* 感染後細胞浸潤も肉芽腫形成も認められないヌードマウスに、正常 BALB/C マウスの感染脾細胞を移入すると肉芽腫が大量に形成されたが、IFN- γ KO マウスの感染脾細胞を移入したヌードマウスでは、肉芽腫の形成は数もサイズも抑制されていた。IFN- γ 産生を検索したところ、*R. aurantiacus* 感染のみのヌードマウスは IFN- γ を少量に産生したのに対し、正常マウスの感染脾細胞を移入したヌードマウスでは IFN- γ が 2 倍以上検出された。IFN- γ KO マウスの感染脾細胞を移入したヌードマウスでも IFN- γ の産生が認められた。

生体レベルにおける主な IFN- γ 産生細胞は T 細胞および NK 細胞の 2 種であるが、正常マウスの感染脾細胞を移入した IFN- γ KO マウスでは、IFN- γ 産生 NK 細胞より IFN- γ 産生 T 細胞が大量に存在したものの、肉芽腫形成が回復しなかった。一方、T 細胞が欠如するヌードマウスでは、IFN- γ 産生 NK 細胞が存在し、正常マウスおよび IFN- γ KO マウスの感染脾細胞のいずれかの移入により肉芽腫が形成した。以上の感染脾細胞の移入実験から、移入された T 細胞より NK 細胞から産生された IFN- γ は *R. aurantiacus* 感染肉芽腫形成にはより重要であることが明らかになった。さらに、移入された T 細胞は自ら産生した IFN- γ に依存せず、*R. aurantiacus* 感染肉芽腫形成において重要な役割を果たすことが示され、肉芽腫形成因子には IFN- γ 以外の因子の存在が示唆された。

IFN- γ KO マウスと同じく、正常マウスの感染脾細胞を移入した IFN- γ KO マウスにおいても肉芽腫が形成されないこと、一方 IFN- γ KO マウスの感染脾細胞を移入した正常マウスでは肉芽腫が減少したことから、IFN- γ KO マウスには肉芽腫形成を抑制する因子が存在する可能性が示唆された。事実、IFN- γ KO マウスでは、Th1/Th2 バランスは崩れ、Th2 細胞が増加し、正常マウスから移入された Th1 細胞を抑制することにより肉芽腫形成が抑制されていると考えられる。IFN- γ KO マウスでは IL-4 の増加が認められなかったが、IL-10 が大量に検出された。さらに、感染脾細胞移入実験では、IFN- γ KO マウスの感染脾細胞の移入により正常マウスの脾臓に IL-10 の産生が上昇し、肉芽腫の形成が減少した。IL-10 は主にマクロファージ系の細胞から産生され、肉芽腫抑制機構として重要であることが予想され、現在 IFN- γ KO マウスへの抗 IL-10 抗体投与の影響について検討中である。

マウスにおける *R. aurantiacus* 感染により誘導された肉芽腫形成には、NK 細胞から産生された IFN- γ および T 細胞が必須な因子であること、T 細胞は自ら産生した IFN- γ に依存せず別の役割を担っていること、逆に IFN- γ KO マウスには肉芽腫抑制機序が存在することが示された。これらの現象は、その後の TNF- α KO, IL-6KO, IL-10KO マウスを用いた実験からも支持された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 川 二 郎
副 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 皆 川 知 紀

学位論文題名

Role of T cells in granuloma formation induced by
Rhodococcus aurantiacus is independent of
their interferon-gamma production.

(*Rhodococcus aurantiacus* 感染により誘導された
肉芽腫形成における T 細胞の役割に関する研究)

本研究は、マウスを用いて *Rhodococcus aurantiacus* (*R. aurantiacus*) 菌感染における肉芽腫形成のメカニズムを解析したものである。正常マウスでは、*R. aurantiacus* 感染により誘導された肉芽腫は類上皮細胞よりなる非壊死性肉芽腫であり、Th1 サイトカインである IFN- γ 、TNF- α に依存的に発達する。肉芽腫形成因子としての IFN- γ は感染後 2 相性に検出されるが、感染初期の IFN- γ は NK 細胞より産生され、後期の IFN- γ は T 細胞より産生される。これらの IFN- γ の役割を解明するために、今回 IFN- γ ノックアウト (KO) マウスを用いて肉芽腫の形成と内在性サイトカインの産生との関係について検討した。IFN- γ KO マウスに *R. aurantiacus* 菌を感染させても肉芽腫は形成されない。また正常マウスの感染脾細胞を移入した IFN- γ KO マウスでは、IFN- γ 産生 T 細胞の存在にもかかわらず肉芽腫形成が回復しなかった。一方、*R. aurantiacus* 感染後肉芽腫形成の認められないヌードマウスに正常マウスおよび IFN- γ KO マウスの感染脾細胞の移入によって肉芽腫が形成された。以上のことから、移入された T 細胞から産生された IFN- γ よりも本来宿主に存在する NK 細胞から産生された IFN- γ が *R. aurantiacus* 感染肉芽腫形成には重要であることが明らかになった。また、移入された T 細胞は自ら産生した IFN- γ に依存せず、*R. aurantiacus* 感染肉芽腫形成に必須な役割を果たしていることが示された。一方、IFN- γ KO マウスでは肉芽腫が形成されないこと、IFN- γ KO マウスの感染脾細胞を移入した正常マウスでは肉芽腫が減少したことから、IFN- γ KO マウスには肉芽腫形成を抑制する因子が存在する可能性が示唆された。IFN- γ KO マウスでは IL-10 が大量に検出され、また IFN- γ KO マウスの感染脾

細胞の移入により正常マウスの脾臓に IL-10 の産生が上昇し、肉芽腫の形成が減少したことから、IL-10 は肉芽腫抑制に作用していることを明らかにした。

公開發表に際し、副査の長嶋教授から、正常マウスの感染脾細胞を IFN- γ KO マウスに移入すると、IL-10 の産生が減少した理由についての質問があった。次いで、副査の皆川教授から、TNF- α KO、IL-6 KO、IL-10 KO マウスを用いた実験から上記の結論を支持した結果についての追加を求め、最後に主査の有川教授から、*R. aurantiacus* はどんな病気を起こす微生物であるかについての質問および、感染初期に産生された IFN- γ にのみ、肉芽腫形成能がある理由についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は自身の実験結果と文献的考察をもとに落ち着いて概ね適切に回答し得た。

病理学的に肉芽腫性疾患は多く認められるが、サルコイドーシス症やクローン病などの原因が未だ不明である。この論文は、肉芽腫の形成機序や病態の解明に非常に参考になる実験モデルであり、審査委員に高く評価された。今後、本モデルを用いて肉芽腫形成のメカニズムに関する解析がさらに進展することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。