The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	実験的大腸炎におけるγδ型T細胞の役割
Author(s)	土屋, 孝弘
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/2121
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【6】

氏　　名	土屋孝弘（つちや たかひろ）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学 位 記 番 号	第　16959　号
学位授与年月日	平成14年 3 月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学 位 論 文 名	**実験的大腸炎におけるγδ型T細胞の役割**
論 文 審 査 委 員	（主査） 教 授　山元　弘 （副査） 教 授　八木　清仁　　教 授　真弓　忠範　　教 授　東　純一

論 文 内 容 の 要 旨

γδ型T細胞は，脾臓やリンパ節にはほとんど存在しないが、腸管や皮膚の上皮層には多数存在するT細胞サブセットである。γδ型T細胞は、非ペプチド抗原やMHC非拘束性に外来抗原を認識したり、あるいはストレスにより発現が増加する自己抗原を認識するなど、様々な抗原を認識すると報告されている。また細菌、ウィルス、寄生虫などによる感染に対してγδ型T細胞は細胞障害活性により感染細胞や細胞内の細菌を殺し、またIFN-γなどのTh1タイプのサイトカインを産生することで、マクロファージ活性化と肉芽腫の形成を促し、感染に防御的に働くと考えられている。また、γδ型T細胞は腸管の腸管上皮細胞間に多数存在し、腸管のホメオスタシスに非常に重要であると考えられている。しかしγδ型T細胞の生体内での役割は未だ不明な点が多く残されている。

近年、クローン病（Crohn's disease；CD）や潰瘍性大腸炎（Ulcerative colitis；UC）を代表とする炎症性腸疾患（Inflammatory Bowel Disease；IBD）の発症に、γδ型T細胞の関与を示した報告が数多くある。IBDは、消化管における免疫応答の過剰によって引き起こされると考えられている。そこで筆者は、γδ型T細胞によって、消化管における免疫応答が調節されていると推測し、炎症性腸疾患モデルマウスを用いて腸管での炎症におけるγδ型T細胞の機能について検討した。

炎症性腸疾患のモデルマウスの作製には、硫酸多糖体であるdextran sulfate sodium（DSS）を用いた。DSSをマウスに自由摂取させると実験的炎症性腸疾患（Experimental Colitis：EC）を誘導することができる。これはヒト潰瘍性大腸炎のモデルの一つともいわれている。これらの疾患の発症機序は現在のところはっきりとはわかってはいないが、腸管粘膜免疫機能が破綻した結果起こると考えられている。

このモデルマウスを用いて、炎症時における腸管でのγδ型T細胞の役割について検討した。

本研究においてαβ型T細胞、γδ型T細胞をいずれも欠損したマウスでは、ECから回復できないということが明らかとなった。特にγδ型T細胞を欠損した、C.B-17*scid*マウス、IL-7R$^{-/-}$マウス、TCR-δ$^{-/-}$マウス及びTCR-β$^{-/-}$δ$^{-/-}$マウスにおいて、回復できないマウスが数多く見られた。またこれらのマウスでは、炎症部位に顆粒球がほとんど浸潤しておらず、主としてマクロファージが多く浸潤していた。

一方αβ型T細胞を欠損したTCR-β$^{-/-}$マウスでは、回復できないマウスが多少いたが、炎症部位には、WT同様、顆粒球の浸潤が数多く見られた。浸潤細胞の多くがマクロファージであるγδ型T細胞を欠損したマウスの方が、浸潤細胞の多くが好中球であるWTマウスやαβ型T細胞を欠損したマウスに比べて強い症状を示したことから、γ

δ型T細胞の有無は、これら両細胞群の浸潤の違いを決めていることが示唆された。

ECを誘導したTCR-$\delta^{+/-}$マウス及びTCR-$\delta^{-/-}$マウス末梢血中の好中球の変動について測定したところ、TCR-$\delta^{+/-}$マウスではDSS投与開始3日目より末梢血中での好中球の増加がみられ、7日目頃からは、リンパ球の増加に伴い好中球の割合は減少した。しかしTCR-$\delta^{-/-}$マウスでは、DSS投与開始後7日目から好中球の増加が始まり、その後増加した状態が持続された。

これらの結果より、TCR-$\delta^{-/-}$マウスでは、TCR-$\delta^{+/-}$マウスと比較して、好中球の産生が遅れ、さらに炎症局所への遊走能が劣っているために末梢血中に好中球の割合が増加したと考えられた。

そこでTCR-$\delta^{-/-}$マウスとTCR-$\delta^{+/-}$マウスにおいて炎症局所で分泌されている様々な因子に違いがあるのではないかと考え、好中球の遊走能について*in vitro*で検討した。

DSSを投与していない、TCR-$\delta^{+/-}$マウスとTCR-$\delta^{-/-}$マウスの大腸培養上清では，好中球の遊走に変化は見られなかった。DSSによりECを誘導したTCR-$\delta^{+/-}$マウスの大腸培養上清では、好中球の遊走が有意に増加したが、TCR-$\delta^{-/-}$マウスの大腸培養上清では、ほとんど変化がなかった。

そこで、炎症を起こしている大腸上皮層のどの細胞が、どのようなケモカインを産生しているのかを大腸上皮層より、li-IEL及びli-IECを採取し、RT-PCR法によって好中球を遊走させる種々のケモカインについてその発現を調べた。

TCR-$\delta^{+/-}$マウスとTCR-$\delta^{-/-}$マウスいずれにおいても、0日目でIEL及びIECでGRO-1とMIFの発現が認められた。また、MIP-2の発現はIELでのみわずかに認められた。GRO-1の発現は、TCR-$\delta^{+/-}$マウスのIELでは、3日目にわずかに減少しており、TCR-$\delta^{-/-}$マウスのIELでは3日目、7日目に減少しているものの、大きな変化は認められなかった。また、TCR-$\delta^{+/-}$マウスのIECでは、ほとんど発現の変化はなかった。しかし、TCR-$\delta^{-/-}$マウスのIECでは、3日目、7日目に大きく減少していた。MIFの発現はIEL、IECとも変化は見られなかった。また、LIXは発現が認められなかった。

*in vitro*の遊走能評価実験の結果より、γδ型T細胞が炎症時に直接的あるいは間接的に好中球を遊走させる可溶性の因子を分泌することが示唆された。RT-PCRの結果より、GRO-1は、DSS投与3日目と7日目にTCR-$\delta^{-/-}$マウスのIEL及びIECでの発現が減少しており、γδ型T細胞が炎症時に直接的あるいは間接的に好中球を遊走させる可溶性の因子がGRO-1である可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

γδ型T細胞は、腸管や皮膚の上皮層に多数存在するT細胞サブセットであり、非ペプチド抗原やMHC非拘束性に外来抗原を認識するなど、αβ型T細胞とは異なった組織分布・機能を有する。また消化管上皮の恒常性に関わることも知られているが、生体内での役割は未だ不明な点が多い。近年クローン病や潰瘍性大腸炎を代表とする炎症性腸疾患（IBD）の発症にγδ型T細胞の関与を示唆する報告があり、消化管上皮の恒常性との関連を考慮しても興味深い。そこで本研究では、dextran sulfate sodium（DSS）で誘導される実験的大腸炎（EC）モデルマウスを用いて、炎症時における腸管でのγδ型T細胞の役割について検討した。

(1)正常マウスではDSS投与を中止するとIBD症状は消失するが、*scid*、IL-7R$^{-/-}$、TC-$\beta^{-/-}\delta^{-/-}$マウスでは、DSS投与を中止してもほとんど回復できなかった。

(2)DSSを投与した正常マウスでは、炎症部位への浸潤細胞のほとんどが顆粒球であるのに対し、回復できないマウスではマクロファージが主であった。

(3)TCR-$\delta^{-/-}$とTCR-$\beta^{-/-}$を比較すると、いずれも過半数のマウスはDSS投与を中止しても回復しなかったが、両者の浸潤細胞の種類は異なっており、TCR-$\delta^{-/-}$マウスではマクロファージが、一方TCR-$\beta^{-/-}$マウスでは顆粒球の浸潤が主であった。このことから、γδ型T細胞の有無が浸潤細胞の種類を決めていることが示唆された。

(4)TCR-$\delta^{+/-}$とTCR-$\delta^{-/-}$マウスでの炎症局所の生理活性因子について検索したところ、ECを誘導したTCR-$\delta^{-/-}$マウス大腸培養上清中に好中球の遊走活性が認められた。

(5)EC 誘導腸管上皮間リンパ球と上皮細胞を単離して、RT-PCR 法によってケモカイン発現量を調べたところ、TCR-$\delta^{-/-}$マウスの上皮細胞に GRO-1 の発現を認めた。

以上デキストラン硫酸誘発実験的大腸炎モデルマウスにおいて、リンパ球、特に$\gamma\delta$型T細胞の有無が炎症部位への浸潤細胞の種類を決めていること、また$\gamma\delta$型T細胞が直接的あるいは間接的に好中球を遊走させる因子、GRO-1を産生している可能性を示した。これらの成果は、炎症性腸疾患の病態形成における免疫系の役割の解明に寄与するのみならず、医薬品開発やその臨床的意義に重要な情報を与えるものであり、薬学博士の学位を授与するにふさわしいものと考える。