



Title	Role of MOG-stimulated Th1 type "light-up" (GFP+) CD4+ T cells for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)
Author(s)	由良, 守
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43726
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名 由 良 守
 博士の専攻分野の名称 博士(医学)
 学位記番号 第 16508 号
 学位授与年月日 平成13年9月25日
 学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
 医学系研究科病理系専攻
 学位論文名 Role of MOG-stimulated Th1 type "light-up" (GFP⁺) CD4⁺T cells for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)
 (EAE発症におけるMOG特異的Th1型GFP⁺CD4⁺T細胞の役割と免疫調節物質コレラトキシンの経鼻投与によるEAE治療に関する研究)

論文審査委員 (主査)
 教授 清野 宏
 (副査)
 教授 松澤 佑次 教授 菊谷 仁

論文内容の要旨

【目的】

代表的な自己免疫病モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) は、実験動物を脳由来のミエリンタンパクで感作することによって尾や四肢の麻痺が生じる中枢神経系 (CNS) の疾患である。本研究では、EAE発症の新しい実験モデルとして、発光オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) 由来の緑色蛍光蛋白 (GFP) を遺伝子導入した GFP トランスジェニック (GFP-tg) マウスをドナーとして用いた T 細胞移入実験系を開発し、EAEの発症機構を解析することを試みた。さらに粘膜免疫調節物質として知られているコレラトキシン (CT) の EAE 用治療型ワクチンへの応用についての検討をおこなった。

【方法ならびに成績】

EAE発症の自己抗原としてミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク (MOG) を用い、GFP-tg マウス 1匹あたりに 150 μg を完全 Freund アジュバント (CFA) との油中水型乳剤として皮下投与し、感作した (MOG+CFA)。陰性対照群マウスはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) と CFA の油中水型乳剤で感作した (PBS+CFA)。感作21日後に脾臓細胞懸濁液を分離調製し、MOG 共存下で試験管内で 3 日間共培養した後、1 × 10⁶ 個の単核球を γ 照射 (300rad) レシピエント C57BL/6 マウスに経静脈的に移入した。EAEの重症度は Suen らの記載に従い、尾の麻痺から始まる上行性の症状を 6 段階にて評価し、尾の完全麻痺のみが認められる重症度 1 をもって EAE が発症したと判定した。その結果、MOG+CFA にて感作されたドナー (GFP-tg) マウスから細胞を移入された全てのマウスで EAE が発症した。共焦点レーザー顕微鏡による臓器別の解析では、EAE 発症マウスの脾臓および脊髄神経に GFP 陽性細胞の浸潤が見られた。しかし、PBS+CFA にて感作されたドナーマウスから細胞移入された対照群では EAE の発症は認めず、組織学的にも脾臓にのみ、GFP 陽性細胞の定着を認めた。フローサイトメトリーによる解析では、EAE 発症マウスの CNS に浸潤した GFP 陽性細胞はその殆どが CD4⁺T 細胞であった。定量 reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法による解析では、EAE 発症マウスの CNS に浸潤した GFP⁺CD4⁺T 細胞は自発的に高レベルのインターフェロン (IFN)-γ を産生していることが明らかとなった。以上の結果より、IFN-γ を主とする Th1 型優位の MOG 特異的な CD4⁺T 細胞が CNS に浸潤し、EAE の発症に深く関与していることが示された。

そこで Th2 型の反応を誘導する免疫調節物質 CT を併用すれば、EAE における Th1 型優位の環境を早期に Th2

型優位に変換し、症状軽減が期待できるのではないかと考え、MOG 感作後に CT を経鼻投与し、病態に及ぼす影響を検討した。本実験に供したマウスは MOG と CFA の油中水型乳剤で感作し、直後と 2 日後に百日咳毒素を腹腔内投与する一般的な発症プロトコールを用いて、直接、EAE を誘導した。感作 7 日後に $32 \mu\text{g}$ の CT を 1 回経鼻投与し、経過観察した。対照群には PBS を経鼻投与した。その結果、感作 19 日後における EAE に起因する平均死亡率は PBS 群 34%、CT 群 17% であり、CT 投与群で有意な低下を認めた。処置マウスを屠殺し、CNS と脾臓細胞の培養上清中の各種サイトカインを enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を用いて解析したところ、CT 投与群で PBS 投与群と比べて CNS 由来単核細胞群の Th1 型関連サイトカイン [IFN- γ 、インターロイキン (IL)-12] の産生が有意に抑制されていることが明らかとなった。

【総括】

GFP-tg マウスを用いた新しい自己免疫疾患モデルにより、中枢神経系に浸潤した MOG 特異的 Th1 型の CD4⁺T 細胞が EAE の発症に深く関与していることが示された。次に病態形成に深く関わっている Th1 型優位の環境を Th2 型優位に変換する目的で Th2 誘導型免疫調節物質である CT を経鼻的に投与したところ、重症度および EAE に起因する死亡率の軽減が認められた。その機序として CT の特異な生物学的免疫調節活性により、IL-12 を介した病態形成性 Th1 型 T 細胞からの IFN- γ の産生が抑制されたためと考えられた。

論文審査の結果の要旨

実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) は中枢神経系の代表的な自己免疫病動物モデルであるが、その発症、抑制の解明には病態形成性 T 細胞の解析が不可欠である。本論文は発光オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) 由来の緑色蛍光蛋白 (GFP) を遺伝子導入した GFP トランスジェニックマウスをドナーに用いた移入実験により、病態形成性 T 細胞による EAE の解析を行なったユニークなものである。その視覚にも訴える結果は、Th1 型の CD4 陽性 T 細胞が優位に中枢神経系に浸潤し、EAE の発症に深く関与していることを明らかにした。直接的に病態形成性 Th1 型 CD4⁺T 細胞の動向を中枢神経系で解析できる同システムは EAE の発症、抑制のメカニズムを詳細に解明する上でこれから応用が大いに期待できるものである。また、Th2 型の反応を誘導する免疫調節物質としての作用を持つコレラトキシンを、経鼻的に投与すれば、嗅神経を経由して大脳に送達することができる。本研究では Th1 型優位の環境を Th2 型優位にシフトさせて EAE を抑制するというアイデアに基づき、コレラトキシンを EAE 発症前に経鼻的に投与した。その結果、コレラトキシン投与群において EAE の症状の軽減、死亡率の低下が認められ、その機序として中枢神経系における Interleukin-12 を介した Interferon- γ の抑制が示唆された。コレラトキシンによる EAE の治療はこれまでの方法とは一線を画したユニークなものであり、この発想は他の自己免疫疾患にも応用できる可能性を秘めている。

本研究は EAE の病態解明と治療に関する二つの新しいモデルを作製し、共に今後の応用が期待されるものであり、学位の授与に値すると考えられる。