OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Local IL-17 Production and a Decrease in Peripheral Blood Regulatory T cells in an Animal Model of Bronchiolitis Obliterans
Author(s)	中桐, 伴行
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/54100
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

【96】

氏名	中桐伴行（なかぎりともゆき）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第　23665　号
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系臨床医学専攻
学位論文名	Local IL-17 Production and a Decrease in Peripheral Blood Regulatory T cells in an Animal Model of Bronchiolitis Obliterans （閉塞性細気管支炎動物モデルにおける局所のIL-17産生と循環血中制御性T細胞の減少）
論文審査委員	（主査） 教授　奥村明之進 （副査） 教授　竹田　潔　教授　奥山　明彦

論文内容の要旨

〔　目　的　〕

肺移植後の慢性拒絶は、その長期予後に大きく関与している。肺移植後の慢性拒絶の病理像は、閉塞性細気管支炎(Bronchiolitis Obliterans, BO)の像を呈するが、その発生機序は不明である。近年、Th17という新しいヘルパーT細胞が発見され、心および腎移植後の同種移植片拒絶に関与していることが報告された。Th17は、線維芽細胞を誘導するIL-17を特異的に産生するエフェクター分画であり、Naïve T細胞にTGFβとIL-6が作用することにより分化誘導されることが知られている。興味深いことに、同じNaïve T細胞にTGFβ単独で作用させた場合は、移植後の免疫寛容をつかさどる制御性T細胞(Treg)に誘導されることが知られており、これらの分化誘導はIL-6の有無に依存している。

一方、マウスの気管内腔の径は、ヒトの細気管支の同程度であり、これを皮下に異系移植するとBO様の組織を生ずることが知られている。免疫学的にも急性拒絶と慢性拒絶が混在する変化が生じ、BOの動物モデルとされている。

本研究では、このBOモデルを用いてTh17とTregおよびIL-6の末梢血中および局所における変化を観察した。また、IL-6の中和によるTh17の分化誘導の抑制が、BO形成に与える影響を検証した。

〔　方法　〕

1，B6マウス由来の気管をC3Hマウスの皮下に移植し、術後1週間目、2週間目、および4週間目に組織学的評価を行った。線維芽細胞およびIL-6の免疫染色を行い、BOの閉塞の原因およびIL-6の局在を調べた。

2，移植片のIL-6およびIL-17のmRNAをRT-PCR法で測定し、局所でのTh17の分化誘導を調べた。

3，同時に、末梢血を採取し、リンパ球の表面マーカーCD4、CD8、CD25、CD28、CD127、CD152、および細胞内のFoxp3、IL-4、IL-6、IL-17、IFNγを染色し、フローサイトメトリーにて解析した。

4，同様の異系移植モデルを作成し、IL-6を中和抗体にてブロックしたものと、コントロールとしてIgGを投与したものを2週目に比較した。

〔　成績　〕

1，同系移植片(B6→B6)では組織学的変化を認めなかったが、異系移植片(B6→C3H)は組織学的にBO様変化が起きていることを確認した。

2，免疫染色にて閉塞の原因の一つが線維芽細胞の増殖であることが確認された。

3，免疫染色にて移植片中の血管内皮や浸潤リンパ球中にIL-6を認めた。同系移植群ではIL-6はほとんど検出されなかった。

4，移植片のIL-6のmRNAは、異系移植群では1週目で154910±137187 units、2週目1503074±600498 units、4週目545126±58784 unitsであったのに対し、同系移植群では1週目603±326 units、2週目24980±13948 units、4週目1634±372 unitsであり、いずれも有意差を認めた(1週目p=0.055、2週目p=0.008、4週目 p=0.024)。同様に移植片中のIL-17のmRNAは、異系移植群では1週目で738.7±154.5 units、2週目1835.0±246.9 units、4週目603.7±1.7 unitsであったのに対し、同系移植群では1週目46.0±28.3 units、2週目454.9±287.3 units、4週目76.1±57.3 unitsであり、いずれも有意差を認めた(1週目 p=0.001、2週目 p=0.0002、4週目 p=0.002)。

5，末梢血中の細胞障害性T細胞($CD8^+$リンパ球)の割合および活性型リンパ球($CD28^+$リンパ球)の割合はC3H→C3Hの同系移植群と有意差を認めなかった。ヘルパーT細胞($CD4^+$リンパ球)中、急性拒絶にてその割合が上昇するTh1 (IFNγ産生リンパ球)は異系移植群で1週目15.54 ±8.6%であり、同系移植群では3.39±2.39%と有意差を認めた(p=0.03)。また、Tregの特異的マーカーと言われるヘルパーT細胞中の$CD25^{high}$および$Foxp3^+$のヘルパーT細胞の割合は異系移植群では1週目で2.08 ±0.33% および 3.16±0.18%、2週目では3.39±0.77% および 3.36±0.81%であり、同系移植群で1週目3.60±0.95% および 4.96±0.96%、2週目5.97±1.06% および 5.81±1.94%であり、異系移植群で有意に減少していた($CD25^{high}$: 1週目p=0.010、2週目p=0.008; $Foxp3^+$: 1週目p=0.013、2週目p=0.045)。しかし、IL-6およびTh17(IL-17産生ヘルパーT細胞)の割合では有意差を認めなかった。

6，IL-6の中和抗体モデルでは、組織学的はリンパ球の浸潤を認めるものの内腔の閉鎖を認めず、線維組織の沈着も認めなかった。また局所のIL-17のmRNA量はIL-6投与群で11.73±11.06 units、IgG投与群(コントロール群)では1046.67±355.72 units と IL-6投与群で有意に減少しており(p=0.004)、浸潤リンパ球はTh17でないことが示唆された。

〔　総　括　〕

マウスBOモデルにおいて、異系移植群では末梢血中のTregが減少しており、局所において

マウスBOモデルにおいて、異系移植群では末梢血中のTregが減少しており、局所においてIL-6により誘導されるTh17がBOの発症に関与することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

【背景】肺移植において、慢性拒絶はその予後を左右する重要な因子である。近年、ナイーブヘルパーT細胞からIL-6の刺激下に分化誘導されるTh17が発見され、移植後拒絶への関与が示唆されている。【目的】肺移植後慢性拒絶の病理像である閉塞性細気管支炎(BO)にTh17が関与しているか、マウスBOモデルを用いて検討した。【方法】Donorから採取した気管をRecipientの皮下に移植。術後1、2および4週目に移植片および末梢血を採取した。移植片の組織像の評価とIL-6およびIL-17のmRNAをRT-PCR法にて定量した。末梢血リンパ球の表面マーカーと細胞内サイトカインをFACSにて解析し、血清中のIL-6はELISAにて解析した。IL-6中和抗体投与にて、同様の項目について解析した。【結果】移植片局所のIL-6およびIL-17のmRNAの発現量は異系移植群で優位に上昇していた。末梢血FACS解析、ELISAではTh17およびIL-6に変化を認めなかった。IL-6中和群では移植気管のIL-17の発現が低下し、内腔の閉塞が緩和していた。【結語】マウス異所性気管移植モデルにおいて、局所でのIL-6産生とTh17の誘導がBOの変化に関与していることが示唆された。本研究は肺移植の拒絶反応におけるTh17の関与を明らかにするものであり学位に値する。