

|             |  |
|-------------|--|
| 氏 名(本 籍)    | 伊 藤 進 一 (東 京 都)                          |
| 学 位 の 種 類   | 博 士 (医 学)                                |
| 学 位 記 番 号   | 博 甲 第 1,928 号                            |
| 学位授与年月日     | 平成 10 年 3 月 23 日                         |
| 学位授与の要件     | 学位規則第 4 条第 1 項該当                         |
| 審 査 研 究 科   | 医 学 研 究 科                                |
| 学 位 論 文 題 目 | 動物モデルを用いた原発性胆汁性肝硬変の免疫学的発症機序と病変制御機構に関する検討 |
| 主 査         | 筑波大学教授 医学博士 中 内 啓 光                      |
| 副 査         | 筑波大学教授 医学博士 大 川 治 夫                      |
| 副 査         | 筑波大学教授 医学博士 深 尾 立                        |
| 副 査         | 筑波大学助教授 医学博士 山 根 一 秀                     |
| 副 査         | 筑波大学助教授 医学博士 野 村 文 夫                     |

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

原発性胆汁性肝硬変 (PBC) はリンパ球による進行性の小葉間胆管の破壊を特徴とし、最終的には肝硬変に至る原因不明の疾患である。しかし、種々の状況証拠から、PBCの病因には自己免疫的機序が関与していると考えられている。更にPBCにともなう所見が骨髄移植後等で発症してくる移植片対宿主病 (GVHD) においても見られることから、PBCとGVHDには共通した病因背景の存在が示唆されている。実際、B6マウスのCD4<sup>+</sup>細胞を主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) class II 抗原が異なるB6.C-H-2<sup>bm12</sup>マウスに移入してGVHDを発症させたところ、血中に高γグロブリン、抗ミトコンドリア抗体 (AMA) 産生といった自己免疫的機序を示唆する所見に加え、肝においてもPBCの初期病変と類似した所見が観察されることから、この系がPBCの動物モデルとして利用されるようになった。そこで本研究においては、以上の事象を背景とし、GVHDによるPBCの動物モデルを用いて、1) PBC様肝病変の誘導から完成までの肝浸潤CD4<sup>+</sup>T細胞のサイトカインプロファイルがどのように変動するか。2) CD4<sup>+</sup>T細胞の病変への定着、活性化に重要な役割を果たす接着分子VLA4およびVCAM1はPBC動物モデルの肝において発現が上昇するか否か、さらにこれらの接着分子に対する抗体を投与することで病変の進展を抑制することができるか否か、を明らかにすることを目的とした。

### (対象と方法)

1) C57BL/6 (B6) マウスとI-A領域に変異のあるB6.C-H-2<sup>bm12</sup>マウスを交配したF1マウスに、ナイロンウールカラムで分離したB6マウス脾臓T細胞を1-2×10<sup>7</sup>個移入したのち、経時的にマウスを屠殺し肝臓を摘出し、免疫組織化学や組織等の解析に用いた。肝臓から分離したリンパ球はフローサイトメトリーで解析し、Thy-1.2<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞を分離したのち、RNAを抽出し各種サイトカインに特異的なプライマーを用いてRT-PCRを行った。

2) 接着分子に対する抗体投与の影響を解析するため、抗VLA-4抗体と抗VCAM-1抗体の両者もしくはいずれか一方を腹腔内に細胞移植の前後に10回に分けて投与した。マウスは細胞移入後14日で屠殺し、肝病変を組織学的に検討した。また、肝浸潤CD4<sup>+</sup>T細胞を分離してサイトカインプロファイルの変動を検討した。更に各群の血清AMA抗体価をELISAにて検討した。

### (結果)

1) 細胞移入してから5日目(day 5)に肝門脈域でCD4<sup>+</sup>T細胞を主体とした細胞浸潤がみられるようになり、day14に病変は最大となった。Day14での浸潤細胞にはCD4<sup>+</sup>T細胞のみならず、CD8<sup>+</sup>T細胞、B220<sup>+</sup>細胞、Mac-1<sup>+</sup>細胞も認められた。肝浸潤CD4<sup>+</sup>T細胞のサイトカイン産生の変動を検討すると、IFN- $\gamma$  mRNA (Th1) 発現の上昇が病早期(day 3)に認められ、その傾向はday14まで持続した。IL-10 mRNA (Th2) はday14になって発現の上昇を認めた。更に抗ミトコンドリア抗体はday14になり、controlとday 5に比べ有意にその血清抗体価の上昇をみた。また、IL-2やIL-4に関してはnested PCRによりCD4<sup>+</sup>T細胞がその産生源であることが明らかとなった。

2) 本モデルにおいて胆管上皮細胞にVCAM-1、門脈域浸潤リンパ球にVLA-4の発現を認めた。抗VLA-4抗体を投与することにより、浸潤の程度が抑制されることを見出した。免疫組織学的検討では抗体投与群は抗体非投与群と同様、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、B220<sup>+</sup>、Mac-1<sup>+</sup>細胞が検出され、量的な浸潤抑制はあるものの、質的には変動がないことが明らかとなった。さらに、抗体投与群と抗体非投与群で肝浸潤CD4<sup>+</sup>T細胞のIL2、IFN $\gamma$ 、IL 4、IL10のmRNAの発現量にも変動がないことが明らかとなった。

#### (考察)

病変形成以前から完成まで一貫してTh1サイトカインであるIFN- $\gamma$  mRNAの発現上昇が認められることより、Th1が本モデルにおいて重要な役割を果たしていることが示唆された。遅れて産生されてきたIL-10はTh2サイトカインとしてB細胞を刺激し抗ミトコンドリア抗体産生を促すと同時に、肝局所においてTh1に傾いたサイトカインバランスを是正するために分泌されてきたと推測された。一方、抗VLA-4抗体投与により病変が抑制されることが示されたが、CD4<sup>+</sup>細胞のサイトカインプロファイルには変動がないことから、Th1とTh2のサイトカインバランス非依存性に病変を抑制していることが示唆された。抗接着分子抗体による肝病変の抑制は、今後治療に応用が期待できる可能性を示唆するものである。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文で著者は、MHC class II分子のみに相違のあるF1マウスに親由来のT細胞を移入することで発症してくるGVH反応を利用したPBCモデルマウスを作製し、病変部に浸潤してくるCD4<sup>+</sup>T細胞のサイトカインプロファイルを解析した。その結果、Th1タイプのT細胞が本病変に重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、本モデルにおいて胆管上皮細胞にVCAM-1、門脈域浸潤リンパ球にVLA-4が発現しており、VLA-4に対する抗体を投与することによって肝病変が抑制できることを示し、接着分子が病変部位へのリンパ球浸潤に関与していること、および接着分子に対する抗体投与が治療に使える可能性があることを明らかにした。限定された抗原に対するGVH反応による再現性の高いモデル動物を利用して、病変部位に浸潤するT細胞のTh1、Th2サブタイプと病態への接着因子の関与を明らかにした意欲的な研究で、今後のさらなる展開が期待できる優れた論文である。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。