

氏 名 (本籍)	おう 王 英 歌 (中 国)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 5471 号
学位授与年月日	平成 22 年 3 月 25 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	人間総合科学研究科
学 位 論 文 題 目	<b>Laser microdissection-based analysis of renal-infiltrating T cells in lupus nephritis.</b> (Laser microdissection (LMD) 法によるループス腎炎浸潤 T 細胞の解析に関する研究)
主 査	筑波大学教授 医学博士 川 上 康
副 査	筑波大学教授 医学博士 二 宮 治 彦
副 査	筑波大学准教授 医学博士 坂 本 透
副 査	筑波大学准教授 博士 (医学) 楊 景 堯

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus ; SLE) は自己免疫疾患-膠原病の一種であり、厚生労働省認定難治性疾患でもある。その腎病変であるループス腎炎は、生命予後に関する重篤な臓器障害の一つである。ループス腎炎は、腎糸球体に、主に T 細胞の浸潤と免疫複合体の沈着を特徴とする。この免疫複合体の形成には、自己抗体-抗 DNA 抗体などが関与し、さらに T 細胞により産生されたサイトカインにより誘導されると考えられる。これまでに病変浸潤している T 細胞は、モデルマウス (MRL/lpr) では Th1 タイプに偏っていることが報告されていたが、ヒトループス腎炎では Th1 という報告と Th2 という報告が混在し、その発症メカニズムも明らかでない。近年、Laser microdissection (LMD) のシステムが開発され、組織切片から特定の細胞を採取できるようになった。本研究はヒトループス腎炎とモデルマウスの発症メカニズムを理解するために、この手法を活用し、病変局所に浸潤している T 細胞のサイトカイン産生を個別に解析する事を目的とした。

### (対象と方法)

#### I. ループス腎炎モデルマウスについての研究

糸球体腎炎、血管周囲炎を発症した 10 匹の雌 MRL/lpr マウスを解析した。

1) LMD を細胞の採集：糸球体腎炎、血管周囲炎を発症した MRL/lpr マウスの腎標本を作成した。LMD 法で糸球体、糸球体周囲の浸潤細胞をくりぬきプールした (糸球体 5-10 ケまた、血管周囲炎においても同じサイズでカットを行った)。2) mRNA レベルの解析：LMD 法で採集した細胞から total RNA を抽出し、cDNA を合成した。その後にサイトカイン (IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-4、IL-10、IL-13、IL-17 など) 遺伝子発現を行った。3) 蛋白レベルの解析 (免疫組織化学的評価)：マウスの腎組織で凍結切片を作製し、Thy1、B220、Mac-1、CD4、CD8 について、免疫組織染色で腎内浸潤した T 細胞の局在を確認した。

#### II. ヒトループス腎炎におけるサイトカインバランスの研究

SLE 患者 15 例の腎生検検体で検討した。これらは ISN/RPS 分類で、Ⅲ型 3 例、Ⅲ + V 型 1 例 (Ⅲ型主体群)、Ⅳ型 2 例、Ⅳ + V 型 5 例 (Ⅳ型主体群)、V 型 4 例 (V 型群) であった。

1) LMD を細胞の採集：ループス腎炎患者の腎生検検体を用意し、LMD 法で腎糸球体、および間質に浸潤した細胞を単細胞レベルで採取した。 2) mRNA レベルの解析：LMD 法で採取した single cell より total RNA を抽出し、cDNA を合成した。その後 RT-PCR 法でサイトカイン (IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-4、IL-10、IL-13、IL-17) 遺伝子発現を行った。 3) 蛋白レベルの解析 (免疫組織化学的評価)：腎生検検体を用いて、凍結切片を作製し、染色法測定による腎内浸潤した T 細胞のサイトカイン (IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10、IL-13、IL-17) を検討する。 4) 臨床指標の解析：蛋白尿、血尿、BUN、s-Cr、Ccr など臨床指標を測定し、これらの臨床指標とサイトカインの相関性を検討した。

## (結果)

### I. ループスモデルマウスでの研究：

1) RT-PCR で、糸球体では、Thy1 + 細胞：100%、B220 + 細胞：92.5%、CD4 + 細胞：22.5%、CD8 + 細胞：35%であり、糸球体周囲では、Thy1 + 細胞：91.7%、B220 + 細胞：41.7%、CD4 + 細胞：12.5%、CD8 + 細胞：25%であった。血管周囲では、Thy1 + 細胞：100%、B220 + 細胞：100%、CD4 + 細胞：65%、CD8 + 細胞：42.5%であった。 2) 糸球体におけるサイトカイン遺伝子発現は、糸球体：IFN- $\gamma$ ：75%、IL-2：12.5%、IL-4 陰性、IL-10：7.5%、IL-13：87.5%、IL-17：35%であり、糸球体周囲：IFN- $\gamma$ ：68.8%、IL-2：25%、IL-4 と IL-10 は陰性、IL-13：81.3%、IL-17：62.5%、血管周囲では、IFN- $\gamma$ ：62.5%、IL-2：5%、IL-4：2.5%、IL-10：60%、IL-13：70%、IL-17：30%であった。 3) 免疫組織染色では、Thy1、B220、Mac-1 は糸球体、糸球体周囲、血管周囲すべてに存在していたが、Thy1 陽性細胞、Mac-1 陽性細胞は主に糸球体周囲に存在し、B220 陽性細胞は主に糸球体内に存在していた。CD4、CD8 陽性細胞は糸球体、糸球体周囲、血管周囲すべてに認めたが、特に糸球体周囲に多かった。

### II. ヒトループス腎炎での研究：

1) RT-PCR で、全例の腎糸球体と間質浸潤 T 細胞において IL-2、IL-4、IL-10、IL-13、IL-17 が認められた。しかし、IFN- $\gamma$  はⅢ型主体群と V 型群の糸球体のみで発現していた。 2) IL-17 は、Ⅳ型主体群と V 型群の糸球体において、またⅣ型主体群の間質で、Ⅲ型主体群より有意に高発現していた。 3) 免疫組織染色で、細胞内の TCR- $\beta$ 、IL-4、IL-10、IL-13、IL-17 産生が確認された。 4) IL-17 の陽性率は蛋白尿、血尿、BUN、s-Cr、SLEDAI などと positive な、Ccr との negative な相関が認められた。

## (考察)

### I. ループスモデルマウスでの研究：

MRL/lpr マウスの糸球体内浸潤 T 細胞、糸球体周囲の浸潤細胞は、double negative (CD4 陰性 CD8 陰性) T 細胞が多く、一方、血管周囲では CD4 陽性あるいは CD8 陽性 T 細胞が多かった。サイトカインバランスでは、従来報告されている IFN- $\gamma$  のみならず、IL-13 などの Th2 サイトカイン、また IL-17 が産生されていることが明らかになった。しかし、IL-10 は血管周囲でのみ高頻度に発現しており、糸球体腎炎と血管周囲炎の発症機序は異なる可能性が示唆された。

### II. ヒトループス腎炎での研究：

1) ループス腎炎浸潤 T 細胞では、IL-4、IL-10、IL-13 と IL-17 の発現が優位に認められ、Th-2 および Th-17 細胞として機能していると考えられた。 2) Ⅲ型主体群、V 型群のループス腎炎糸球体での T 細胞は、IFN- $\gamma$  を発現していたが、Ⅳ型主体群の糸球体では認められず、組織型によりサイトカインバランスが異なる可能性が考えられた。 3) IL-17 はヒトループス腎炎を増悪させている可能性が考えられた。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では、ヒトループス腎炎とそのモデルマウスの研究で、LMD と RT-PCR を用いて腎内浸潤 T 細胞のサイトカインバランスを解析する手法を確立し、マウス、ヒトともに、腎炎の発症に IFN- $\gamma$ 、IL-13、IL-17 が関与している可能性を明らかにした。また、マウスを用いた実験系での IL-10 産生結果から血管周囲炎と糸球体腎炎の発症機序が異なることを示唆し得た。さらにヒトループス腎炎の組織型によりサイトカインバランスが異なる可能性と IL-17 が腎炎を悪化させていることを明らかにし、研究手法の確立とともに、マウス、ヒト組織を用いた実験系で腎炎発症に関連する新知見を明らかにした。腎炎発症メカニズムを理解するにあたり、本研究は重要な成果をあげ膠原病に関する領域の研究として高く評価できる。

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。