

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月30日現在

機関番号： 87302
研究種目： 挑戦的萌芽研究
研究期間： 2009 ～ 2011
課題番号： 21659223
研究課題名（和文） 重症筋無力症患者胸腺における免疫系の恒常性維持の解析
研究課題名（英文） Analysis of immune homeostasis in thymus in patients with myasthenia gravis
研究代表者
中根 俊成 (NAKANE SHUNYA)
独立行政法人国立病院機構長崎川棚医療センター（臨床研究部）
研究者番号 70398022

研究成果の概要（和文）：

新しいT細胞のサブセットが重症筋無力症（MG）と胸腺病変にどのように関わっているかを検討するのが本研究の主目的である。MG患者胸腺（胸腺腫、胸腺過形成、正常胸腺）、非MG胸腺腫、正常対照胸腺を用いて、そのFoxP3, ROR γ t, IL-17の発現を免疫組織化学、分子生物学的手法によって確認する。本研究では制御性T細胞について定量的な評価を行い、MG患者胸腺ではその減少はなく、免疫恒常性の破綻とそれによる自己免疫疾患の発症につながる可能性は低いと考えた。

研究成果の概要（英文）：

The thymus has been implicated as a possible site of origin that triggers autoimmunity in myasthenia gravis (MG). Although several groups have suggested that the decrease in the number of regulatory T (Treg) cells contributes to the onset of MG, the exact role of Treg cells in MG remains unclear. To address this point, we examined the number and distribution of Treg cells in a large number of patients with MG. Immunohistofluorescence analysis of Foxp3 along with CD4 and CD8 was performed in thymic sections of MG (+) and MG (-) patients. Foxp3 CD4 CD8 cells were predominantly found in the thymic medulla and their number declined with age. There was no significant difference in the number or the distribution of Foxp3 CD4 CD8 cells in the thymus between MG (+) and MG (-) patients. The cellularity of Treg cells in the thymus and circulation is not diminished in patients with myasthenia gravis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,500,000	0	1,500,000
22年度	800,000	0	800,000
23年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	240,000	3,340,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード： 重症筋無力症、胸腺、制御性T細胞、IL-17

1. 研究開始当初の背景

重症筋無力症 (Myasthenia Gravis, MG) は神経筋接合部を標的とする自己免疫疾患である。神経筋接合部の病態とともに、MGでは胸腺腫や胸腺過形成などの胸腺異常を高頻度に合併することが報告されている。このことから胸腺異常が抗アセチルコリン受容体抗体の産生を介してMGの発症に関与している可能性が高い。多くの自己免疫疾患の治療のなかで胸腺摘出術が治療のオプションとして選択されるのはMGのほかに存在しないことから何らかの特異的な胸腺異常が存在すると考えられる。

胸腺はTリンパ球の分化成熟を司っているが、これまでの研究動向としてはMGにおける胸腺は1) 自己抗体を産生するB細胞の供給源、2) ヘルパーT細胞の供給源、3) 抗原提示細胞の供給源などの病因的意義を持つ、とされている。しかしT細胞の分化成熟と抗アセチルコリン受容体抗体の誘導の関連、さらに胸腺病変がいかんしてMG発症もしくはその病態に影響しているか、より詳細な検討が必要である。

これらの解明を目指すことは胸腺摘出術が真に有効な中核的治療法たり得るかを検証する作業でもあり、これが有効であると結論した場合にはいかんして治療効果を発揮しているかの機序考察にもつながるであろう。

2. 研究の目的

ヘルパーT細胞の4つあるサブセットのうち制御性T細胞 (regulatory T cell, Treg) とTh17 (IL-17を産生するCD4⁺T細胞) に着目した研究計画を立案し、その新しい視点からMG発症の機転を検討し、その病態への関与を検討したい。Tregは抑制機能を持つように特化した細胞として胸腺で産生され、末梢において自己反応性T細胞レパトアを抑制することで免疫自己寛容の維持に重要な役割を果たしている。動物モデルでこの細胞集団を除去した場合、種々の臓器特異的自己免疫疾患を発症することが知られている。ヒト自己免疫疾患においてもTregによる抑制とエフェクターT細胞による病的な自己反応のバランスが崩れていること

(数的減少、機能不全のいずれか、もしくは両方)を示唆する報告がなされており、MGにおいてもTregの機能不全を指摘した報告がある。しかし、ヒトMGにおいてTh17について検討した報告はいまだない。これと相反する働きをするTh17は自己免疫誘導において重要な役割を担っているが、これらTregとTh17の分化経路はreciprocalであることが報告され、両方を検討することが重要である。

胸腺組織サンプルを入手し、冷凍保存する。それらの内訳は

- ・ MG患者で胸腺摘出術を施行された症例: 組織型としては胸腺腫、胸腺過形成、正常胸腺に分類。

- ・ 非MG胸腺腫

- ・ 正常対照胸腺: 胸部外科手術(心臓血管外科を含む)の際に得られる胸腺を正常対照胸腺とする。

に分けられている。施行された胸腺摘出術によって得られた胸腺組織を用いる。

本研究計画ではこれらをもとに下記の免疫組織染色、分子生物学的手法によってFoxP3, RORγ tとIL-17の発現解析を行う。

1) 免疫組織染色: 上記に示した胸腺組織にてCD4, CD8染色に加え、FoxP3, RORγ t, IL-17のいずれかを加えた三重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で局在、発現について確認する。発現に関してはImageJによる面積測定および発現量のカウントにより定量化する。

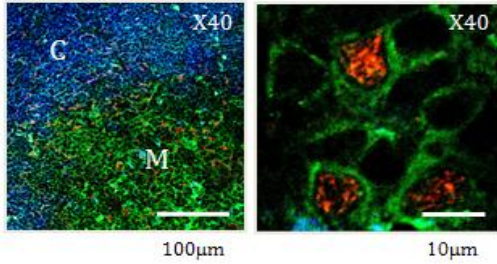
2) 分子生物学的手法: 胸腺組織より分離したthymocyteよりRNAを抽出する。標的遺伝子はFoxP3, RORγ t, IL-17であり、これらについてリアルタイム定量的RT-PCRを行い、発現の程度を確認する。

4. 研究成果

Foxp3の局在については胸腺中における発現はMG群と非MG群では有意な差はなく、当初予想されたようなMG患者胸腺におけるFoxp3発現の減少は認められなかった。また末梢血リンパ球においても制御性T細胞に関する解析を行ったが、両群間ではその数の差を認めなかった。そしてその研究成果はNeurology誌に報告したとおりである。同様の手法を用いてRORγ tとIL-17についての解析を行う予定であった。この両者と制御性T細胞は互いに免疫学的均衡をコントロールするペアであり、免疫恒常性を考慮する上で重要である。本症発症の一因として、疾患増悪の一因として免疫恒常性の均衡が崩れていることが推察されることから、細胞性免疫・液性免疫に関する検討も予定していたが、今回の期間内の成果を得ることはできなかった。今回の研究で得られた成果については次頁にて詳細に解説する。

3. 研究の方法

newborn thymus CD4/CD8/Foxp3



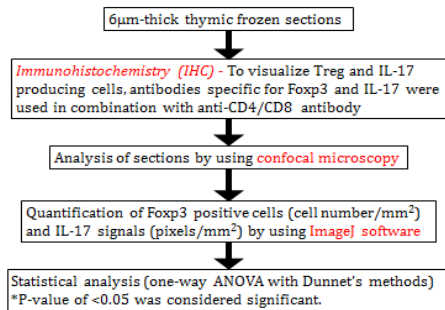
胸腺組織にてCD4, CD8染色にFoxP3を加えた三重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で局在、発現について確認した。

研究対象となった胸腺については下記の通りであり、MG群と非MG群に大別される。

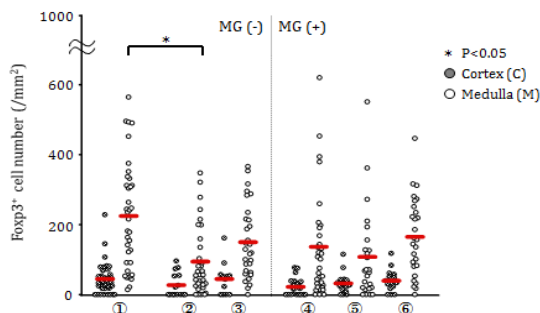
	n	sex(M:F)	age, yr (median)	Abs (nmol/l)
MG (-) groups (n=26)				
children (①)	7	2:5	0-3 (1.0)	
adult	19	9:10	31-73 (54)	
no-neoplasm (②)	10	6:4	31-73 (60)	
thymoma (③)	9	3:6	31-69 (46)	
MG (+) groups (n=24)	24	6:18	14-76 (44)	
no-TFH and no-neoplasm (④)	10	4:6	22-59 (44)	37.5 ± 27.4
TFH (⑤)	6	0:6	14-56 (34)	74.7 ± 87.9
thymoma (⑥)	8	2:6	29-76 (52)	26.6 ± 17.7

- In thymoma groups, we used nonneoplastic thymic tissues adjacent to thymoma.
- TFH=thymic follicular hyperplasia
- Abs=acetylcholine receptor (AChR) antibodies (normal <0.2 nmol/l)

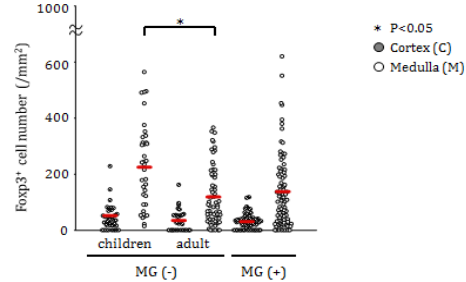
胸腺の免疫組織学的解析を下記に示す。



それぞれの群におけるFoxp3陽性細胞数を下に示す。いずれの群においてもcortexに多い傾向がある。各群比較では非MG群で小児と成人の胸腺皮質でのFoxp3陽性細胞数に有意差はあるものの、他の比較では統計学的有意差はない。



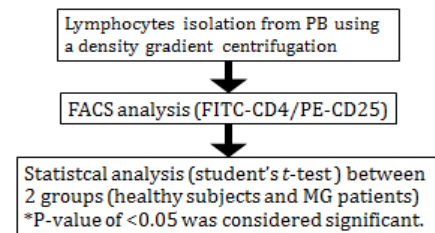
Foxp3陽性細胞数をMG群と非MG群で比較しても両者間に有意差はない。やはり非MG群の小児と成人では統計学的に有意差を認めた。



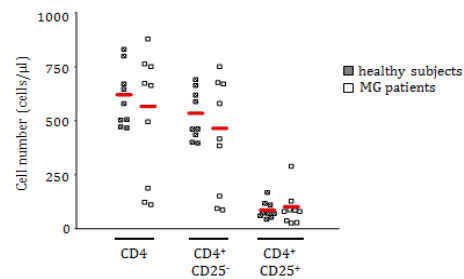
末梢血リンパ球研究の対象となった症例は下記の通りである。

	n	sex (M:F)	age, yr (median)	Abs (nmol/l)
healthy subjects	9	1:8	25-81 (55)	-
MG patients	9	1:8	40-82 (60)	25.1 ± 17.5

末梢血リンパ球の免疫染色の方法を下記に示す。

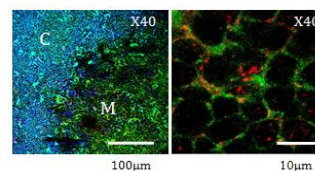


このうちCD4およびCD25陽性細胞が制御性T細胞であるが、その数は健康者群とMG患者群では有意な差を認めない。



免疫学的均衡を維持する、制御性T細胞のペアであるTh17についてはIL-17シグナルの染色設定を行った。

newborn thymus CD4/CD8/IL-17



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

①Matsui N.Undiminished regulatory T cells in the thymus of patients with myasthenia gravis.Neurology.査読有.74(10).2010.816-820.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中根 俊成 (NAKANE SHUNYA)

独立行政法人国立病院機構長崎川棚医療センター・臨床研究部・部長

研究者番号 : 70398022

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :