

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670300

研究課題名(和文) Fas/FasLと放射線ないしはGVHによる細胞傷害によって引き起こされる皮膚炎

研究課題名(英文) Dermatitis caused by Fas/FasL and irradiation or cytotoxicity by GVH

研究代表者

鈴木 治彦 (Suzuki, Haruhiko)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90283431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：私が提唱するFas欠損もしくはFasL欠損マウスへの放射線照射+骨髄移植による皮膚炎発症モデルは、GVH(移植片対宿主)反応によるものであることを皮膚組織の病理学的検査により確定した。

lprもしくはgldと野生型(WT)との間で種々の組み合わせ(lpr>lpr、WT>lpr、lpr>WT、gld>gld、WT>gld、gld>WT)で骨髄移植を行い、宿主のみ、あるいは移植片のみがFas/FasLに変異の入った場合に、皮膚炎その他の免疫異常を検討した。

宿主をRAG-2KOマウスとし、骨髄細胞をgldマウスの骨髄とWT(5.1)マウスのミックスとして骨髄移植を行い、その後の病態変化を調べた。

研究成果の概要(英文)：We confirmed that the dermatitis model induced by irradiation and Bone Marrow transplantation (BMT) to Fas- or FasL-deficient mice as I proposed is caused by graft versus host reaction (GVH).

BMT was performed between any possible combinations of lpr, gld, and wild type (WT) (lpr>lpr, WT>lpr, lpr>WT, gld>gld, WT>gld, gld>WT) and we discussed about immune disorders including dermatitis observed in the cases of either only host or only graft has mutation in Fas/FasL.

When the host mice were RAG-2KO, the bone marrow was reconstituted with the mixture of that of gld mice and WT (5.1) mice and their condition was followed up.

研究分野：免疫学

キーワード：regulatory T cells CD8+ cells Fas/FasL

1. 研究開始当初の背景

(1) 免疫応答には何らかの「制御」が必要であり、それが破綻した場合には免疫系の暴走によって時には死に至るほどの重篤な病態が引き起こされることがわかってきた。これは、免疫系の異常によって起こる自己免疫疾患やアレルギー性疾患の様相から察知されることではあったが、数多くのノックアウトマウスが作られて特定の分子の生体全般における重要性がわかり、また *in vitro* 培養技術の進歩に伴ってより詳細な解析も加えられ、以前よりもさらに免疫系の重要性とそれに歯止めが効かなくなった場合の恐ろしさが理解されるようになった。このような状況で免疫制御というテーマに関わった特筆すべき業績は、坂口志文博士を中心とする研究チームによってなされた CD4+CD25+Foxp3+制御性 T 細胞の同定とそれに続く一連の研究であろう。しかし、もちろんこの細胞だけが免疫制御のすべてを請け負っているわけではない。CD4+細胞と並ぶもう一方の T 細胞中の主たる細胞集団として CD8+細胞があるが、CD4+CD25+Foxp3+制御性 T 細胞の発見以前には、むしろ CD8+細胞の中に制御性細胞としての働きを求める声があった。しかし、その当時の細胞や遺伝子の解析技術は甘く、実験の再現性がとれない、あるいは絶対的「モノ」が無いために基準がとれない、等の理由により研究が信用性を無くした。その時に CD4+の制御性細胞として登場したのが CD4+CD25+制御性 T 細胞であるが、さらにその細胞の研究が飛躍的に発展したのは、間違いなく Foxp3 の発見 (Foxp3 そのものは新規の遺伝子ではないが、それが発現することが CD4+制御性細胞と恐ろしいほどに一致する。) であろう。

(2) このような状況下で、当該研究の代表者らは CD8+D122+制御性 T 細胞を同定し、その制御作用のメカニズムを解き明かす努力を続けている。CD8+D122+制御性 T 細胞を同定後 2～3 年の間は実験も順調に動き、各データの再現も可能であったため、比較的容易に論文を書くだけのデータを揃えることができた。この時点での大きな進歩は、同制御性 T 細胞は IL-10 を出し、その IL-10 が同制御性 T 細胞の制御作用を担っているのではないかということであった。この IL-10 産生を軸とした CD8+制御性細胞の研究はかなり高い評価を得ることができ、またいくつかの学術論文にも発表することができた。しかし、その後、実験系が思うように動かない、あるいはかつてのような実験結果が出せない、といったトラブルが相次ぎ、研究の進捗が著しく滞ってしまった。そのような事態に陥った要因を一つずつ調べて検討していく過程において、IL-10 は必ずしも CD8+CD122+の主要な作用制御因子では無い可能性が浮上してきた。そこで、もう一度原点に立ち返って実験を行ったところ、IL-10 は抑制作用発揮分子として否定はできないが、それよりも

CD8+制御性 T 細胞の場合は細胞傷害反応により、生体にとって好ましくない T 細胞すなわち自己反応性の T 細胞や反応が終了してもう必要の無くなった T 細胞を殺して消去する働きが重要であることがわかってきた。そして、CD8+CD122+細胞はさらに CD49d の発現によって CD49d^{high} の細胞と CD49d^{low} の細胞に分かれるが、そのうちの CD49d^{low} 細胞のほうがこの細胞傷害能力が強いことがわかり、その殺傷能力によって要らない T 細胞を除去する形で効果を発揮する CD8+の制御性 T 細胞であることがわかった。(以上論文投稿中)

(3) このような CD8+CD122+制御性 T 細胞のさらなる絞り込み、制御作用機構の解明ということに加えて、骨髄移植の実験とその際に起こる GVH 様の症状発現について解析していたが、移植のドナー細胞に *gld* マウス由来の骨髄細胞を用いると酷い皮膚病変が起こって来るものが高頻度に認められた。何故皮膚にそのような酷い症状が現れてくるのか、当初は見当がつかなかったが、実験を重ねるうちにその皮膚病変は GVHD の一端として現れている可能性が高いことが分かった。そこで、全身にわたって組織検査等を徹底的に行い、Fas/FasL と GVHD の関係を明らかにしたいと考え本研究を計画したのが、この研究の出発点である。

2. 研究の目的

この研究の目的は、移植医療において高頻度に観察される GVHD ないしは GVHD 様の病変について、その皮膚症状をとりあげて指標にし、Fas および FasL の関与を明らかにすることにある。

3. 研究の方法

(1) マウスに骨髄移植を行い、その後一定期間後にマウスを殺処分し、その脾臓細胞、リンパ節細胞、胸腺細胞、パイエル板、扁桃などにおいてドナー骨髄由来の T 細胞がどうなっているか、数、活性化の度合い、サイトカイン産生などをフローサイトメトリー、ELISA、イムノプロット等の方法を駆使して詳細に渡って解析を行う。必要であれば、細胞を *in vitro* で培養し、その中の細胞数の変化を追うとともに、その上清中のサイトカインや抗体などの定量を行う。

(2) 骨髄移植を施したマウスについては、できる限り 1 ケージ内に 1 匹で飼育することとするが、全体のスペースの問題から、雌であれば 1 ケージ内に複数のマウスを飼うこともみとめる。雄については、1 匹飼を原則とする。(雄は複数匹を 1 ケージ内に入れるとほぼ確実に喧嘩して背部その他に傷ができ、自発的にできる皮膚病変との違いを判断するのが非常に難しくなる。)

(3) 骨髄移植を施したマウスについては、定期的に殺処分しその主要臓器から病理組織切片を作製し、適宜染色のうえ顕微鏡下察す

る。特に観察すべき点としては実質性臓器（肝臓、腎臓、膵臓など）、体外とのバリエーを形成する粘膜上皮組織（消化管および気管支、肺）などに重点を置き、リンパ球を含めた炎症性細胞の浸潤があるかなどを精査する。

(4) 骨髄移植に使用するホストマウスとドナーマウスの組み合わせとして、野生型マウス (WT)、Fas 変異マウス (lpr)、FasL 欠失マウス (gld) を用意し、全ての考えられる生み合わせて骨髄移植を行う。また、IL-10 ノックアウトマウスや Itk ノックアウトマウス、RAG ノックアウトマウス、CD122 ノックアウトマウス順次組上に乗せ、GVHD 様症状 (所見) を呈するかどうかを調べる。

4. 研究成果

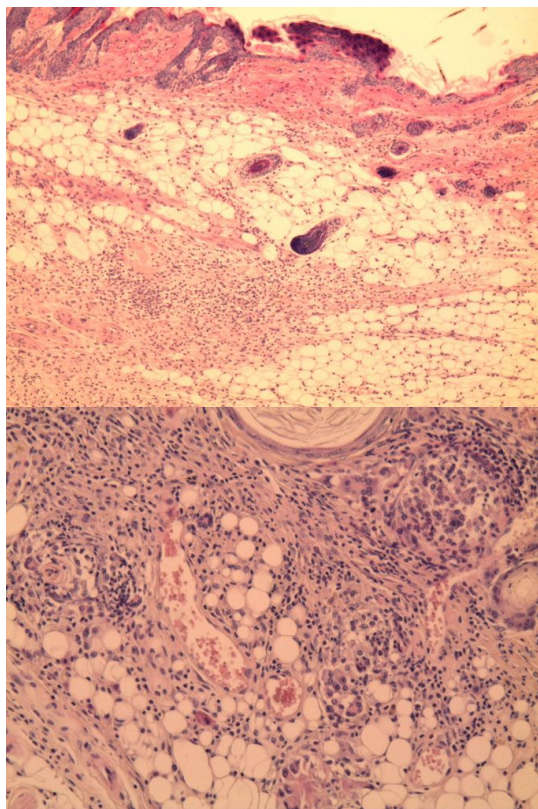
(1) WT、lpr、gld の 3 者のマウスをいろいろ組み合わせて骨髄移植を行った結果では、皮膚病変を含めた GVHD 様症状の発生にはドナー骨髄が gld もしくは lpr マウス由来である必要があった。ドナー骨髄が Fas もしくは FasL の異常系統由来である場合、ホストが gld マウスの時には 9 割方、ホストが WT マウスの時でも 6 割ほどが GVH 症状を呈して来るが、ドナーが WT 由来であれば GVHD 様症状を呈して来ることは全くない。これに対し、ホストマウス側の条件はそれほど重要ではなく、gld マウスや lpr マウスであっても WT マウスであっても GVHD 様症状は発生する。なお、これらの実験では、全てマウスは 遺伝的 C57BL/6 背景のマウスを用いている。これらの結果から、ドナー由来すなわち何らかの血球系の細胞 (おそらくは T 細胞) の働きがこの GVHD 様症状の発生に必須であり、それは単純な遺伝的抗原性の不一致 (使用したマウスは全て 10 代以上 C57BL/6 マウスへの戻し交配を経ているが、それでもマイナー抗原の一部が一致していない可能性はある。) によるものではないことがうかがわれる。なぜなら、もしそのような遺伝的背景の不一致による反応だとすれば、WT 骨髄を lpr ホストもしくは gld ホストに移植した場合にも GVHD 様症状は起こって来ると考えられるからである。

(2) このような GVHD 様病変の発症に放射線照射の影響はあるのかどうかを調べるため、マウスの下半身に鉛のカバーをして遮蔽しておいて X 線照射を行った。この場合、骨髄細胞の移植はあえて行わず、放射線照射だけの影響をみたわけであるが、マウスには何の異変も起こらなかった。すなわち、X 線照射だけでは GVHD 様症状は起こらず、その発症に X 線照射が絡んでいないという証明はできないが、骨髄細胞の移入、血球の置き換わりというイベントが必須であることは証明された。

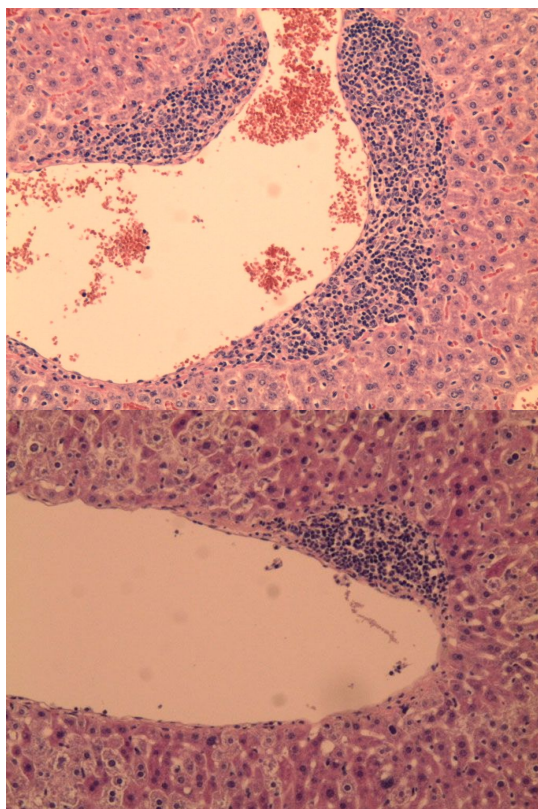
(3) 骨髄移植後に GVHD 様病変を呈したマウスのあらゆる臓器の組織切片を作製し、通常の HE 染色を行い顕微鏡による観察を行った。

以下にその代表的な結果を示して行く。

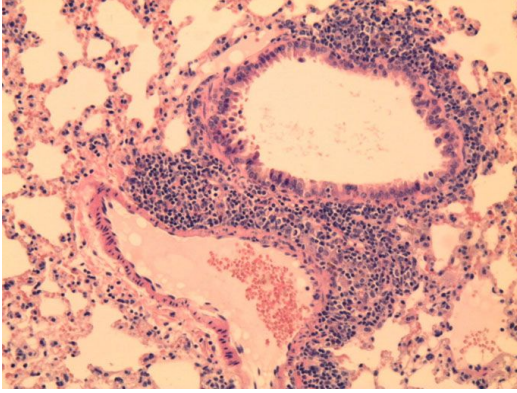
皮膚



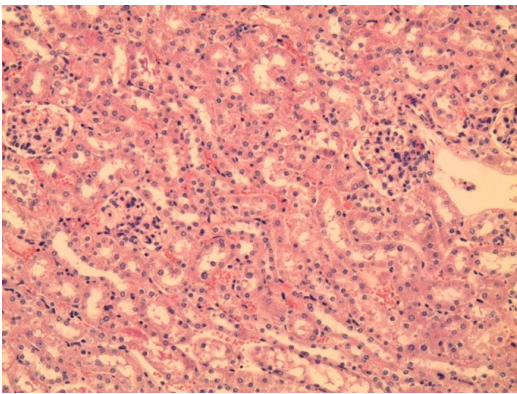
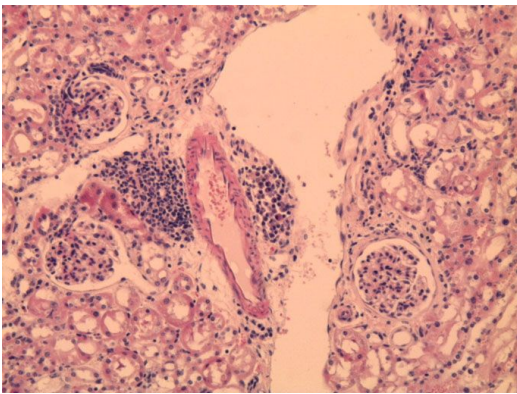
肝臓



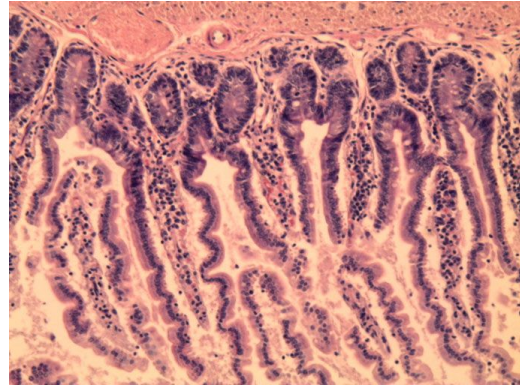
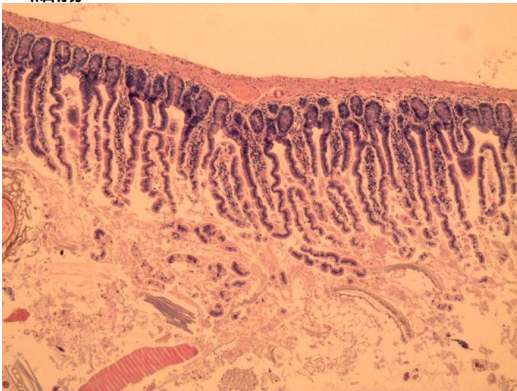
肺



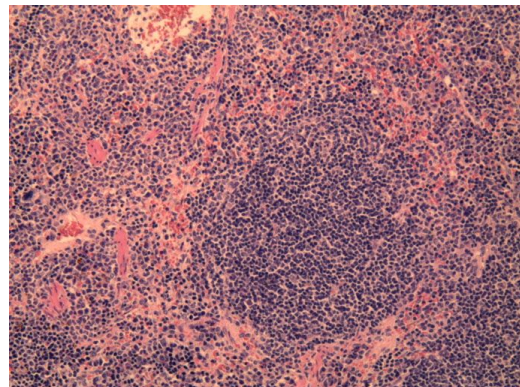
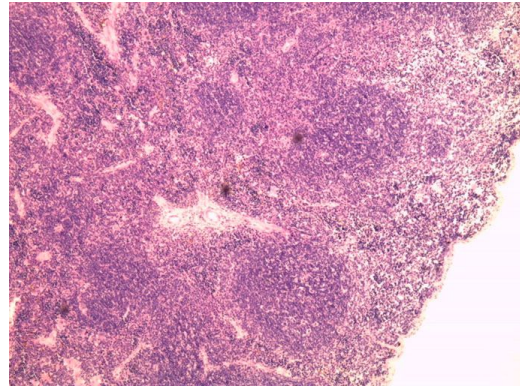
腎臓



結腸



脾臓



所見

皮膚（皮下組織）肝臓、肺で集簇したリンパ球の浸潤が認められる。特に肺では著明であり、このマウスの予後が悪いことと関係があるかもしれない。腎臓と結腸にもところどころにリンパ球と見られる細胞の浸潤を認めるが、程度は軽い。脾臓には何ら異常は認められない。

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 2 件)

鈴木治彦、CD8⁺CD122⁺レギュラトリ
ーT細胞の作用機序、臨床免疫・アレルギー科、査読無し、62巻、2014、376-383

鈴木治彦、CD8⁺CD122⁺レギュラトリ

ーT 細胞、トレーサー (名古屋大学ア
イソトープ総合センター) 査読無、56
巻、2014、11-17

[学会発表](計 1 件)

赤根和之,鈴木治彦、Fas/FasL signaling
of CD8+ regulatory T cells, 第 43 回
日本免疫学会学術集会 2014 年 12 月 12
日, 国立京都国際会館 (京都府京都市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 治彦 (Suzuki Haruhiko)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号 : 90283431