

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790995

研究課題名（和文）重症筋無力症患者胸腺における制御性 T 細胞ならびにハッサル小体の役割
 研究課題名（英文）Regulatory T cells and Hassall's corpuscles in myasthenia gravis patients thymus

研究代表者 松井尚子 (MATSUI NAOKO)
 徳島大学・病院・診療支援医師
 研究者番号：10547954

研究成果の概要（和文）：

胸腺の髄質は自己反応性 T 細胞の負の選択による除去と、制御性 T 細胞（regulatory T cells, Treg）の産生という少なくとも 2 つの点で、自己寛容の成立に重要な役割を担っている。我々は、重症筋無力症（Myasthenia Gravis, MG）患者の胸腺内 Treg の産生は減少していないとする研究結果を報告した。そこで、ハッサル小体に着眼したところ、MG 患者胸腺でもとりわけ過形成胸腺において、Involucrin 陽性のハッサル小体が増加していることを見出した（論文投稿予定）。ヒトやマウスのハッサル小体は、髄質上皮細胞の最終分化において、特徴的な分子 Involucrin を発現することがすでに報告されている。また MG 患者の過形成胸腺で CCL21 の過剰発現も認めた。MG 患者胸腺においては、胸腺髄質上皮細胞の最終分化が変調し、自己反応性 T 細胞の産生に関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Myasthenia gravis (MG) is a neurological autoimmune disease caused by autoantibodies against components of the neuromuscular junction. The thymus is implicated as a site that triggers autoimmunity in MG. The medulla of the thymus provides central self-tolerance in terms of the deletion of autoreactive T cells and the generation of regulatory T cells (Treg). However, our previous study showed that the cellularity of Treg in the thymus and the circulation was not diminished in MG patients. Hassall's corpuscles (HCs) are assumed to represent the terminal differentiated stage of thymic epithelial cells (mTECs). We examined the HCs in the thymus. Multicolor immunohistofluorescence analysis of involucrin, CD4, and CD8 was performed in the thymic sections obtained from MG(+) (n=27) and MG (-) patients (n=24). HCs were identified to be involucrin (+) concentric cellular clusters. The number of HCs per medullary area was significantly elevated in the thymus of MG patients who exhibited the thymic hyperplasia. CCL21 expression was also increased in the thymus of those patients. We speculate that altered differentiation of mTECs may be associated with thymic hyperplasia and the onset of MG.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経病態免疫学

1. 研究開始当初の背景

| 重症筋無力症（Myasthenia Gravis, MG）は

神経筋接合部のアセチルコリン受容体に対する抗体によってひきおこされる自己免疫疾患である¹。MGでは胸腺腫や過形成などの胸腺異常を合併することが多い。胸腺は分化途上のT細胞系である胸腺細胞と、それらを取り囲む胸腺ストロマ細胞からなり、胸腺ストロマ細胞には皮質上皮細胞、髄質上皮細胞などが含まれ、胸腺微小環境が形成されている。胸腺微小環境は胸腺の形態を形作るだけでなく、胸腺細胞の分化、選択を制御することで、細胞の産生を維持し、獲得免疫系の成立にきわめて重要な役割を担っている²。

CD4+T細胞サブセットのうち制御性T細胞(regulatory T cells, Treg)は、自己反応性T細胞を抑制することで免疫寛容の確立に重要な役割を果たす細胞である³。ところが、我々は、MG患者の胸腺内Tregの産生は減少していないという研究結果を得た⁴。

ハッサル小体はヒトの胸腺髄質において、胸腺上皮細胞が同心円状に配列した構造物で、古くからその存在が報告されているものの、どういった役割を果たしているのかはわかっていない。我々は当院でMG患者の診療を精力的に行っており、治療的に摘出した胸腺を保管してきた。また過去に患者胸腺を用いた臨床研究を行っており、免疫組織学的手法を同時に確立してきた。

文献)

- (1) Vincent A. Unravelling the pathogenesis of myasthenia gravis. *Nat Rev Immunol* 2002;2:797-804
- (2) Nitta T, et al. Thymic environments for T-cell repertoire formation. *Adv Immunol* 2008;99:59-94
- (3) Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, et al. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008;133:775-787
- (4) Matsui N, et al. Undiminished Regulatory T Cells in the Thymus of Myasthenia Gravis Patients *Neurology* 2010 (74) 816-820

2. 研究の目的

これまで“MG患者の胸腺内では、何らかの理由により、自己のアセチルコリン受容体様構造に反応するT細胞の排除や制御の確立に不全がある”との説が提唱されているが、その病態は十分に解明されていない。そこで我々はMG患者胸腺において自己寛容がいかにして破綻するのか、制御性T細胞

(regulatory T cells, Treg)と胸腺微小環境のひとつであるハッサル小体に着眼し、MGの発症や病態にどのように関与しているか検討する。

3. 研究の方法

コントロールとMG患者の胸腺を集め、免疫組織学的・分子生物学的実験と解析を行う。対象：コントロール患者(重症筋無力症でない)24人、MG患者27人
コントロールの胸腺は心疾患を有するため、開胸術を必要とした患者で、術上摘出されたもので、MG患者の胸腺は、治療のため胸腺摘出術を必要としたものである。さらに研究同意の得られた者に対して、胸腺細胞や胸腺組織の解析を施行する。

(1) 胸腺の免疫組織染色：胸腺組織の凍結切片を作成し、HE染色を行いハッサル小体の確認を行う。

また連続切片を用いTSLPとFoxp3の免疫染色を行い、ハッサル小体とTregの位置関係の確認を行う。またInvolucrinがハッサル小体に発現しているか、確認の上、CD4ならびにCD8に対する抗体と組み合わせ多重染色を行う。共焦点レーザー顕微鏡で、皮髄構築の確認の上、ひとつの髄質におけるハッサル小体の数を測定し、ImageJを用いて定量化する。さらに過形成胸腺のサンプルについては、CD19とCD38の免疫染色を行い、胚中心の確認を行う。

(2) 胸腺組織のRT-PCR解析：胸腺組織よりRNAを抽出後、逆転写反応を行い、cDNAを作成する。次にリアルタイムPCR法にて目的分子(CCL19、CCL21、CHRNA1、GAPDH)の発現を確認する。さらにGAPDHで補正したmRNA発現量を確認する。

これら(1)(2)のデータは統計解析ソフトを用いてグループ間で比較検討する。

4. 研究成果

TSLP/Foxp3の2重染色では、ハッサル小体周辺の髄質にFoxp3陽性細胞(=Treg)を認めた。TSLP、Involucrinともにハッサル小体に一致して発現を認められたが、TSLPはハッサル小体以外の髄質部分にも発現を認めた。

よってInvolucrinをハッサル小体のマーカーとして用いた。CD4/CD8/Involucrinの3重染色を行い、CD4(+)/CD8(+)部分(シアングリーン色)を皮質、その内側を髄質と、皮髄構築を確認した(図1)。

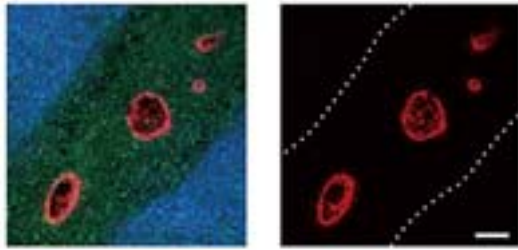


図1 小児胸腺の免疫組織染色
 左 CD4(緑)/CD8(青)/Involutrin(赤)
 右 Involutrin (赤)
 点線：皮質・髄質境界域
 scale bar=100 μm

ひとつの髄質あたりのハッサル小体の数、ハッサル小体の面積を測定し、各群間で比較検討したところ、MG患者の過形成胸腺で1髄質あたりのハッサル小体の数が有意に増加していた(図2)。

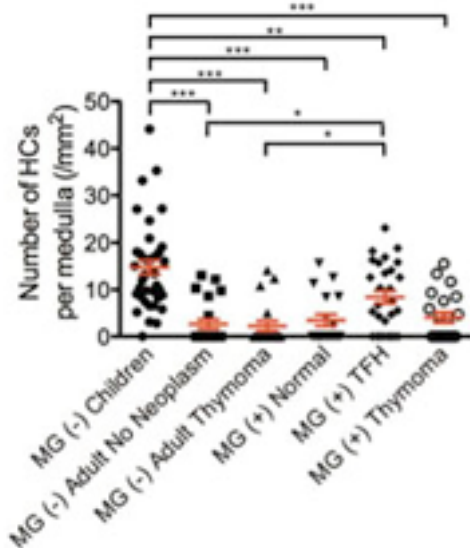


図2 ひとつの髄質あたりのハッサル小体の数の比較検討

なおハッサル小体の大きさには有意差を認めなかった。
 胸腺組織のmRNA解析では、MG患者の過形成胸腺において、CCL21の増加を認めた。

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7件)

① Miyashiro A, Matsui N, Shimatani Y, et al.

Are multifocal motor neuropathy patients underdiagnosed? An epidemiological survey in Japan. *Muscle Nerve* 2013, in press

(査読あり)

② Matsui N, Miyashiro A, Shimatani Y, et al. Diagnostic spectrum of multifocal motor neuropathy. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 2013, in press (査読あり)

③ 松井尚子、宮城愛、梶龍兒
 特集：免疫性神経疾患 多巣性運動ニューロパチー：疫学と治療の実態 *日本臨床* 2013;71(5);861-864 (査読なし)

④ 松井尚子
 多巣性運動ニューロパチー：疫学と治療の実態 *臨床神経学* 2012;25(11);13-16 (査読なし)

⑤ 松井尚子、梶龍兒
 知っておきたい内科症候群
 スティッフパーソン(全身硬直)症候群 *内科* 2012;109(6);957-958 (査読なし)

⑥ 山中千尋、江川麻理子、松井尚子他
 抗アクアポリン4抗体陽性視神経炎の臨床像 *臨床眼科* 2011;65(4);521-526 (査読なし)

⑦ 松井尚子、新田剛、高浜洋介
 胸腺と免疫系形成
Brain and Nerve 2011(63);679-684 (査読なし)

[学会発表] (計8件)

① Matsui N, Ohigashi I, Kondo K, et al. Increased Hassall's corpuscles in myasthenia gravis patients carrying thymic hyperplasia. November 5, 2012 11th International Congress of Neuroimmunology Westin Copley Center (Boston, USA)

② 松井尚子、大東いずみ、近藤和也他
 重症筋無力症の過形成胸腺ではハッサル小体が増加している 2012年9月20日 第24回日本神経免疫学会学術集会 軽井沢プリンスホテル(長野県)

③ 松井尚子、古川貴大、藤田浩司他
 MMN および ALS におけるサイトカイン・プロファイル 2012年9月20日 第24回日本神経免疫学会学術集会 軽井沢プリンスホテル(長野県)

④ 松井尚子
 免疫性末梢神経障害 Update
 多巣性運動ニューロパチー：疫学と治療の実

態 2012年5月23日 第53回日本神経学会
学術大会 東京国際フォーラム（東京都）

⑤ 酒井和香、松井尚子、寺澤由佳他
50歳以上発症重症筋無力症における臨床像
64歳迄 vs 65歳以上 2012年5月23日 第
53回日本神経学会学術大会 東京国際フ
ォーラム（東京都）

⑥ Matsui N, Ohigashi I, Nomura Y, et al.
Increased Hassall's corpuscles in thymic
hyperplasia of myasthenia gravis patients.
November 16, 2011 20th World Congress
of Neurology Palais des Congres
(Marrakesh, Morocco)

⑦ 松井尚子、宮城愛、大東いずみ他
重症筋無力症患者胸腺における制御性T細胞
ならびハッサル小体の役割
2011年5月19日 第52回日本神経学会学
術大会
名古屋国際会議場（愛知県）

⑧ 古川貴大、島谷佳光、松井尚子他
視神経脊髄炎における視覚誘発電位の検討
2011年5月18日 第52回日本神経学会学
術大会
名古屋国際会議場（愛知県）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 尚子 (MATSUI NAOKO)
徳島大学・病院・診療支援医師
研究者番号：10547954

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：