

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 31日現在

機関番号：15501
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21580362
 研究課題名（和文） 自己免疫疾患の効果相における効果細胞・分子による Niche と標的細胞の破壊
 研究課題名（英文） Destruction of niche and target-cells in autoimmune diseases by effector cells and molecules
 研究代表者
 林 俊春（HAYASHI TOSHIHARU）
 山口大学・農学部・教授
 研究者番号：90111484

研究成果の概要（和文）：

本研究では、自己免疫疾患の病理発生の効果相における効果細胞・分子による標的細胞・組織の破壊は Niche(各組織における最適化された細胞外環境)の破壊（形態・機能変化）が免疫疾患において一義的、普遍的に必須であるという事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

One might expect that effector cells (and/or effector molecules) encounter firstly micro-environmental component (niche) before the destruction of target-cells in autoimmune diseases. However, there is a little attention of destruction of niche morphologically and functionally in the pathogenesis in immune diseases. During the analysis of autoimmune diseases the importance of niche concept in the pathogenesis of autoimmune diseases was clarified.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：自己免疫疾患 1型糖尿病 全身性エリテマトーデス シェーグレン症候群 モデル アレルギー性喘息 病理発生 Niche

1. 研究開始当初の背景

従来の研究方法は単純系による解析が中

心である。国内外にみられる自己免疫疾患の病態（病理発生）に関する研究においても、

効果細胞・分子(effector)と、それらによる標的細胞破壊という観点からの研究が中心である。しかし、病態発現に関する研究では、複雑系という視点からの研究が必要である。すなわち、免疫病態においては、生体の効果細胞・分子は、まず基底膜など標的細胞外の基質・構成細胞に遭遇し、ついで標的を破壊することになるにも関わらず、これらの視点から免疫疾患の病理発生を解析したものは殆どない。したがってこの観点から免疫疾患の病理発生について解析した。

2. 研究の目的

臓器特異的および全身性の自己免疫疾患の標的細胞・組織の傷害機序について、組織の微小環境は異なるが、共通するのはNicheの破壊が免疫疾患発病の前駆的eventとして必須の条件である可能性を明らかにする事を目的としていくつかの自己免疫疾患のモデル動物について調べた。さらに、この概念の普遍性について、免疫疾患に含まれるアレルギーについても比較検討した。

3. 研究の方法

ヒトの全身性エリテマトーデスでは、dsDNAをはじめ、多くの自己抗原に対する自己抗体が産生され、それらが循環血中で免疫複合体を形成し、それらが腎臓の糸球体に沈着し、その結果腎炎を発し、死に至る。この疾患の自然発症モデルである(NZBxNZWF₁)マウスあるいは人為的遅発型アレルギー性喘息モデルマウスを用いて局所病変の解析を行った。全身性エリテマトーデスにみられる(1)二次性シェーグレン症候群の唾液腺・涙腺の腺房炎発現と基底膜・筋上皮の破壊(病変)との関連、(2)サイトカインによる糸球体腎炎の発現機序と、Nicheの役割、(3)自己免疫性1型糖尿病における膵島構成要素(シュワン細胞・基底膜)の破壊とβ細胞の破壊に関する文献的考察、および(4)免疫疾患(アレルギー性喘息)における、アレルギー非暴露部腸の微小環境構成要素である細静脈病変について、免疫病理学的に検討した。

4. 研究成果

(1)二次性シェーグレン症候群ではT細胞と形質細胞が浸潤し、腺房炎が起こり、腺房上皮の

破壊が生じる。これらの変化に先行して、基底膜および筋上皮の破壊が生じる事を明らかにした。基底膜にはIgG2aと補体第3成分(C3)の顆粒状の沈着がある事、さらにinterferon(IFN)- γ ⁺ およびIgG2a⁺ のリンパ球の浸潤がみられるが、interleukin(IL)-4⁺、IL-5⁺、IL-13⁺およびIgG1⁺リンパ球がみられない事、さらに局所リンパ節ではIL-4 mRNAの発現に比べIFN- γ mRNAのつよい発現があることから、ヘルパーT(Th)細胞亜群のうちTh1細胞による腺房細胞の破壊が起ることを明らかにした(論文①)。一方、自己免疫的機序による標的細胞の破壊が、涙液や唾液の分泌障害などの臨床病態に繋がるが、シェーグレン症候群では、炎症がみられず、臨床症状を発現する症例が報告されている。この事は、Nicheを構成する基質や細胞に炎症を伴わず、機能変化が生じている可能性を示唆している。炎症反応に先行して、導管上皮、毛細血管内皮、基底膜、樹状細胞、末梢神経などのNicheを構成している細胞・組織成分が、本病の病理発生の過程で、自然免疫が発動し、それらの機能障害を招来する事の重要性を指摘した(論文②)。なお、これらの非免疫学的な機序によるNicheの機能障害をひき起す要因として、宿主遺伝子の主要組織適合抗原ハプロタイプやCCケモカインレセプター・リガンド-3-like 1(CCL3L1)などの発現異常、女性ホルモン・レトロウイルスの関与などを示唆した。なお全身性エリテマトーデスでは、全身性のTh1型の免疫反応が生じるが、唾液腺や涙腺などの局所においても、Th1優位の細胞反応が生じている事も明らかにした。

(2)全身性エリテマトーデスなどの難治性の自己免疫疾患の治療には、従来ステロイドホルモンを含めた免疫抑制剤が用いられている。これらは顕著な効果を示すものの、一方では、主要臓器障害などの副作用や病原体に対する感受性が増大する事から、それらに比べてより優れた患者に負担の少ない治療法の開発が世界的に模索されている。全身性エリテマトーデスでは、自己寛容の破綻や内分泌・環境・遺伝因子を背景に免疫反応の変調が生じる。そこで、各免疫反応の誘導および効果相に関与する免疫担当細胞や分子を標的とした治療が試みられている。しかし、それらの方法では、複雑な免疫異常の修復を図る事は難しく、さらには免疫を抑制する事による感染や癌発生が増大する危険性をはらんでいる。一方、本病態では生体内でのサイトカインバランスの変調についての多くの矛盾した報告がある。すなわち当初はIL-4などのTh2型のサイトが本病態の責任サイト

カインであるという報告が相次いだ。その後Th2型サイトカインに拮抗するIFN- γ などのTh1型のサイトカインが病態発現に関与する可能性について報告された。責任サイトカインを決定する事は治療への応用に極めて重要であり、我々のこれまでの研究成果から本病で死の原因となる腎糸球の免疫グロブリンTh1型サイトカインによりクラススイッチが起るIgG2aの沈着が多量である事を根拠に、本病態ではTh1型サイトカインが責任サイトカインであるという確信を基盤に、IL-4発現プラスミドによる遺伝子治療により、Th1型反応からTh2型反応によるパラダイムシフトによる糸球体腎炎の治療に有効である事を報告した。さらにこの方法は、生体の恒常性維持機構を正常化する事であり、臓器障害などの副作用がなく、さらに病原体に対する抵抗性を賦与できる可能性がある点などからも優れた治療法である事を示唆するとともに、Nicheを構成する寛容を誘導する未熟樹状細胞や調節性T細胞による治療の可能性を示唆した(論文⑤)。

(3) 糖尿病の分類に従うと、1型糖尿病は臓器特異的な自己免疫疾患に分類される。この疾患では、全身性エリテマトーデスと同様に、主要組織適合抗原遺伝子の欠失や変異、環境因子などが複合し、自己寛容の破綻を背景に自己反応性の効果細胞による膵臓の β 細胞破壊が生じ、インスリンの分泌低下が生じ、重度な糖尿病を発する。環境因子としては、食物・中毒物質・ホルモン・病原体が関与する。さらに、病原体では各種の細菌やウイルスが、本病態の引き金となっている事が示唆されている。ウイルス感染による β 細胞破壊はウイルスの直接的なこの細胞での増殖による破壊ではない。例えばコクサッキーウイルスが感染し、このウイルスの構成成分を認識した細胞傷害性T(Tc)細胞が、このウイルス構成蛋白を認識し、感染細胞を破壊する。一方、本ウイルスに対するTc細胞は β 細胞の自己抗原であるグルタミン脱炭酸酵素(標的分子)を分子相同性により、認識し交叉反応により、 β 細胞破壊を生じる。しかしながら、膵島という微小環境を構成するNicheであるシュワン細胞、毛細血管内皮細胞、基底膜の破壊や機能変化に注目した研究は数少ない。これらの観点から、例えばウイルス感染に引続いて細胞から産生されるIFN- α がNicheに機能変化をもたらす可能性を示唆した。さらに、膵島傷害に際し、シュワン細胞におけるニューロトロピン・レセプターp75の発現が重要である事、シュワン細胞から産生される神経細胞増殖因子(nerve growth

factor :NGF)が傷害を受けた膵島の修復に関与する事、 β 細胞破壊の前に、自己反応性のT細胞やB細胞がシュワン細胞のglial fibrillary acidic protein (GFAP)やS100を認識し、これらを破壊する事、 β 細胞の最も重要な機能であるグルコースに対する反応は細胞外基質であるI型およびIV型コラーゲンにより調節されている事を考察した。さらに、生体の末梢寛容維持機構に関与する調節性T細胞が膵島炎発現に重要である事を、文献を基に考察した(図書②)。

(4) 免疫疾患には自己免疫疾患とアレルギー疾患が含まれる。両者とも、その発症の背景には、遺伝因子や環境因子が関与するが、前者は自己寛容の破綻による自己成分に対する自己免疫反応であり、後者は通常無害な物質に対する生体の過剰な反応である。このように、両疾患は病態としては対局に位置する。本研究ではNicheの考え方から、アレルギー性疾患においても、この概念が適応できるか、より普遍的事象で有るかについて以下の検討を行った。アレルギーに感作されたアレルギー患者が、再度アレルギーに暴露されると数分以内にIgEと肥満細胞・好塩基球による反応が生じ、病態が発現する(即時型反応)。その後、数時間後に好酸球とTh2細胞により、再度アレルギー症状が発現する事がある(遅発型反応)。そこで、後者について検討するために、人為的に卵白アルブミンで、マウスに遅発型喘息モデルを作製した。アレルギー暴露部位である気管支には、多数の好酸球とTh2細胞が浸潤し、平滑筋の肥大・収縮がみられた。喘息を特徴づける杯細胞の化生・増数により、気管支内腔には、剥離上皮と多量の粘液の貯留がみられる。一方喘息などアレルギー性疾患では、感作個体におけるアレルギー非暴露部における病態が臨床的に問題となっているが、その機序は殆ど明らかにされていない。そこで、それらの点について、まず喘息(遅発型)の感作個体のアレルギー非暴露部における腸管病変をNicheの観点から調べた。本モデルでは、下痢などの症状は示さない。小腸の粘膜上皮の傷害はみられず、粘膜固有層の細静脈に炎症がみられた。この病変部にはIL-4⁺/IL-5⁺のリンパ球浸潤はみられなかった。したがって、腸管では気管支にみられるTh2細胞を介した遅発型反応は生じていないことが考えられた。さらに肥満細胞の浸潤もみられなかった。しかし、vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)が細静脈内皮に強く発現し、そのカウンターレセプターであるvery late activation antigen-4 (VLA-4)を発現した好酸球が内皮に接着し、血管壁を破壊する事

が示唆された。好酸球は血管外にでる事はなかった。これは、Th2細胞の浸潤が軽度であり、それらの細胞から産生されたサイトカインの刺激が充分ではなく、その結果腸管の粘膜上皮に好酸球を誘因するeotaxin-2が発現していなかった事と関連する事が示唆された。本モデルでは、アレルゲン非暴露部では、全身性のTh2反応が誘導され産生された循環血中のTh2サイトカインが全身の血管内皮を刺激し、病態が発現する事を示した(論文③)。なお、臨床症状を伴わない病変がある事を示したことから、ヒト喘息症例でも臨床症状を示さない腸病変がある可能性が示唆された。これらの成績は現在、多くの好酸球による発症機序が不明である疾患(好酸球性食道炎など)にも、外挿できる可能性が高い。さらに、以上の知見をもとに、遅発型喘息モデルのアレルゲン非暴露部の心臓についても検討した。心臓では、細静脈を中心に肥満細胞と好酸球による即時型アレルギー反応がみられた。心臓の血管周囲には、肥満細胞が正常状態で存在する。この事は、Nicheとの関連から、すでに存在する肥満細胞を中心に、循環血中のアレルゲンとIgEが反応し、即時型の病変が起る可能性を示した(論文④)。すなわち、自己免疫疾患ばかりではなく、アレルギー疾患でも、免疫反応により、病変が規定されるのではなく、Nicheが病変に先行して、あるいは病変形成においても重要な役割を果している事が示唆された。この事と関連し、即時型反応で、これらを媒介する抗体や細胞が同じであるにも関わらず、感作個体におけるアレルゲン暴露部局所とアレルゲン非暴露部の全身の血管における反応(アナフィラキシー)の違いについて、Nicheとの関連から考察した。免疫疾患の病理発生の解明は、従来獲得免疫に主眼が置かれてきた。近年自然免疫の重要性が指摘されている。これと関連して、免疫疾患に共通してNicheを構成する樹状細胞では、未熟なそれが、免疫寛容を誘導し、成熟したそれが極めて強い免疫誘導能を発揮し病態発現に関与する事、さらに樹状細胞は自然免疫と獲得免疫の両者に深く関わっている事を考察した。さらに、腸管というNicheの免疫機構について、末梢の寛容維持機構を担う調節性T細胞との関連から、免疫疾患の病理発生を考察した。これらは、自己免疫疾患ばかりではなくアレルギー性疾患の病態発現に関連している可能性がある。加えるに、アレルゲンが遭遇する粘膜上皮Nicheが病理発生に重要である事を考察した(図書①)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

① Hayashi T, Shimoyama N, Mizuno T.: Destruction of salivary and lacrimal glands by T1 polarized reaction in a model of secondary Sjögren's Syndrome in lupus-prone female NZBxNZWF₁ mice. Inflammation, 査読有, 2011, DOI: 10.1007/s10753-011-9356-y

② Hayashi T.: Dysfunction of lacrimal and salivary glands in Sjögren's syndrome: non-immunologic injury in pre-inflammatory phase and mouse. J Biomed Biotech, 査読有, 2011 DOI: 10.1155/2011/407031

③ Linh BK, Hayashi T, Nakasima T, T.Horii Y. : Eosinophilic venulitis of intestine in a mouse model of late allergic rhinitis. Inflammation, 査読有, 2011, 34, 499-508

④ Hayashi T.: Immunopathogenesis of distant manifestation in effector phase after a local airway allergy. Research Trends, 査読無, 2011, 12, 67-76

⑤ Hayashi T.: Therapeutic strategies for SLE involving cytokines: mechanism-oriented therapies especially IFN- γ targeting gene therapy. J Biomed Biotech, 査読有, 2010, DOI: 10.1155/2010/461641

[図書] (計2件)

① Hayashi T.: Molecular mechanisms in allergic rhinitis: modulation by microbes. In: Advances in Medicine and Biology, Vol. 40, Ed. LV Bernhard ISBN: 978-1-62100-421-9. Nova Sci Pub, NY, 2012, Vol. 40, pp. 59-90.

② Hayashi T.: Environmental factors and concepts in the induction of type 1 diabetes. In: Handbook of Type 1 Diabetes Mellitus. Ed. : T. Hayashi, Nova Sci. Publ, Inc. ISBN 978-1-60741-311-0, 2010, pp. 1-52

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 俊春 (HAYASHI TOSHIHARU)

山口大学・農学部・教授

研究者番号：90111484