

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	玉木陽穂
<p>学位論文題目</p> <p>Repeated administrations of Concanavalin A induce Th1 to Th2 cytokine shift and tolerance against liver injury in mice.</p> <p>(Concanavalin A 繰り返し投与によるTh1-Th2サイトカインシフト及び、Con A肝障害に対する寛容の誘導に関する研究)</p> <p>共著者名 米田政志、佐藤啓介、羽田勝計、中村公英 未公表</p> <p>研究目的</p> <p>種々の外来抗原の繰り返し投与により抗原特異的あるいは非特異的な免疫寛容状態が誘導され、その機序について報告がなされてきた。</p> <p>近年、マウスにConcanavalin A (Con A)を静脈内投与することにより、T細胞を活性化し、IFN-γ、TNF-αなどのサイトカイン産生亢進を介した免疫学的肝障害モデル (Con A肝障害モデル)が見出された (引用文献1)。我々は、Con A単回投与による肝細胞障害機序について検討を行ってきたが、その過程でCon A繰り返し投与によりCon A肝障害が減弱されることを見出した。</p> <p>Con A繰り返し投与モデルに関しては、これまでに2つの先行する研究が報告されており、Con A繰り返し投与により、IL-10、TGF-β産生が亢進し、肝線維化が誘導されると報告されている (引用文献2, 3)。しかし、肝障害に対する寛容状態の誘導についての詳細な検討はなされていない。そこで、我々は、Con A繰り返し投与によるCon A肝障害の抑制機序についてTh1、Th2サイトカイン産生の面から検討を行った。</p> <p>材料・方法</p> <p>(1) 動物 7週齢雌性BALB/cマウスを用いて検討を行った。</p> <p>(2) In vivoでの検討 Con A 20mg/kgBWを生理食塩水に溶解し、尾静脈から週1回、計6週間投与した (Con A繰り返し投与群)。対照群には生理食塩水のみを投与した。繰り返し投与の肝障害への影響を検討するため、毎回Con A投与後8時間後に開腹下に下大静脈より採血を行い、血中ALT値を酵素法で測定した。</p> <p>次にCon A繰り返し投与後の免疫寛容状態の検討のため、Con Aを計6回投与後</p>			

10、17、24、31日目にCon Aを再投与し、8時間後の血中ALT値を酵素法で測定した。また、17日目にCon Aを再投与し、2、4、8時間後の血中TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-10値をELISA法で測定した。

さらに末梢のT細胞における免疫寛容状態が誘導されているか否かを確認するため、Con A繰り返し投与後17日目のマウスより取り出した脾臓から脾細胞を調整し、7週齢の無処置マウスに尾静脈から注入した。24時間後にCon Aを投与し、8時間後の血中ALT値を酵素法で測定した。

(3) In vitroでの検討

末梢のリンパ球のサイトカイン産生能を検討するため、Con A繰り返し投与後17日目のマウスから脾臓を取り出し、Ficcoll液を用いて単核球を分離した。分離した脾細胞をCon A刺激下に24時間培養後、培養上清中のサイトカイン濃度をELISA法で測定した。

また、同様に採取した細胞をCD4-FITC、CD8-PEによる2重染色を行い、フローサイトメトリーでCD4/CD8比を測定した。

成 績

(1) Con A繰り返し投与による肝障害の抑制

Con A繰り返し投与によりCon A投与8時間後の血中ALT値は段階的に低下し、6回目の投与後には肝障害は著明に抑制された。

(2) Con A繰り返し投与後の持続的肝障害の抑制

Con A繰り返し投与によりCon A再投与後の血中ALT値の抑制は少なくとも31日目まで持続した。組織学的にもCon A繰り返し投与群では対照群に比べ中心静脈域における肝細胞障害は著明に抑制されていた。

(3) Con A再投与後の血中サイトカイン

Con A繰り返し投与群ではCon A再投与後2、4、8時間の血中TNF- α 濃度とIFN- γ 濃度の上昇は有意に抑制された。一方、2、4、8時間後の血中IL-4濃度及び2、4時間後の血中IL-10濃度は有意に上昇した。

(4) Con A繰り返し投与後の脾細胞におけるサイトカイン産生

Con A刺激下に脾細胞を24時間培養すると、Con A繰り返し投与群から採取した脾細胞では対照群から採取した脾細胞に比べTNF- α とIFN- γ の産生は低下し、IL-4とIL-10の産生は亢進していた。

(5) Con A繰り返し投与後のCD4/CD8比

脾細胞のCD4/CD8比は、Con A繰り返し投与群と対照群との間で有意差は認めなかった。

(6) 移入した脾細胞のCon A肝障害への影響

Con A繰り返し投与群から採取した脾細胞を移入した群では、対照群から採取した脾細胞を移入した群に比べCon A投与8時間後の血中ALT値は有意に抑制された。

考 案

Con A単回投与によりマウスに肝障害を惹起できるが、その機序としてCon AがCD4陽性T細胞を活性化させ、IFN- γ やTNF- α などの炎症性サイトカインを多量に産生することが重要と考えられている。T細胞の他にもKupffer細胞や好中球が肝障害の進展に重要であることが明らかにされ、Con A単回投与に関しては、これまでに数多くの研究がなされてきた。一方、Con A繰り返し投与による肝障害誘導についての研究はほとんどなされていなかった。

本研究において、我々は、Con A繰り返し投与により肝障害が徐々に軽減し、6回目の投与後には肝障害が著明に抑制され、その抑制効果は少なくとも31日目まで続くことを初めて明らかにした。同様の現象は、他の多くの外来抗原の繰り返し投与でも報告されているが、Con A繰り返し投与により、Con Aに対する免疫学的寛容が誘導されることが示唆された。さらに、本研究では、Con A繰り返し投与により、血中のTh2サイトカインであるIL-4とIL-10が上昇し、Th1サイトカインであるIFN- γ とTNF- α が抑制されることが肝障害抑制に関与することを明らかにした。Con A繰り返し投与を行ったマウスの脾細胞のCon A刺激下での培養でもTh2サイトカイン分泌亢進と、Th1サイトカイン分泌低下が明らかになり、Con A繰り返し投与により末梢Tリンパ球においてTh1優位な環境からTh2優位な環境へ偏向することが明らかとされ、Th1/Th2サイトカインバランスがCon A肝障害に対する免疫学的寛容に重要であることが示唆された。

抗原特異的クローンの除去も他の免疫学的寛容モデルでは重要と考えられているが、本研究におけるフローサイトメトリーによるCD4/CD8比の検討では、クローン除去による可能性は低いと考えられた。また、最近、免疫学的寛容の誘導に重要とされる制御性T細胞の関与については、Con A繰り返し投与マウスの少数の脾細胞を無処置マウスに移入することにより、Con A肝障害の軽減が認められたことから、Con A肝障害に対する寛容の誘導に制御性T細胞が関与している可能性も示唆された。

結 論

Con A繰り返し投与により持続的なCon A肝障害抑制が誘導され、本現象にはTh1-Th2サイトカインシフトによる末梢のT細胞性免疫寛容の誘導が関与していることが示唆された。

引用文献

1. Tiegs G, Hentschel J, Wandel A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by Concanavalin A. *J Clin Invest* 1992;90:196-203.
2. Kimura K, Ando K, Ohnishi H, Ishikawa T, Kakumu S, Takemura M, et al. Immunopathogenesis of hepatic fibrosis in chronic liver injury induced by repeatedly administered concanavalin A. *Inter Immunol* 1999;11:1491-1500.
3. Louis H, Moine AL, Quertinmont E, Peny MO, Geerts A, Goldman M, et al. Repeated concanavalin A challenge in mice induces an interleukin 10-producing phenotype and liver fibrosis. *Hepatology* 2000;31:381-390.

参考論文

1. Nakamura K, Yokohama S, Yoneda M, Okamoto S, Tamaki Y, Ito T, et al. High, but not low, molecular weight hyaluronan prevents T-cell-mediated liver injury by reducing proinflammatory cytokines in mice. *J Gastroenterol* 2004;39:346-354.
2. 横浜吏郎、玉木陽穂、岡本聡、伊藤拓、岡田充巧、麻生和信、他. インターフェロン投与を契機として急性腎不全を発症したC型肝炎の1例. *肝臓* 2004;45:295-302.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	玉木 陽徳
<p>審査委員長 立野正敏 ㊟</p> <p>審査委員 若宮伸隆 ㊟</p> <p>審査委員 羽田勝計 ㊟</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Repeated administrations of Concanavalin A induce Th1 to Th2 cytokine shift and tolerance against liver injury in mice.</p> <p>(Concanavalin A 繰り返し投与によるTh1-Th2サイトカインシフト及び、Con A肝障害に対する寛容の誘導に関する研究)</p>			
<p>ナタマメ由来のレクチンであるConcanavalin A (Con A) は、マイトジェン作用を有し、その静脈内投与によるマウス免疫学的肝障害モデルが報告されている。Con Aによる肝障害の発症には、CD4陽性細胞の活性化によるIFN-γ、TNF-αの産生が重要であることが知られており、サイトカインを介した肝障害モデル(劇症肝炎モデル)を提供すると考えられている。一方、Con Aの繰り返し投与による免疫学的肝障害の機序についての報告はほとんどなされていなかった。</p> <p>論文提出者らは、7週齢雌性BALB/cマウスにCon A 20mg/kg体重</p>			

を繰り返し投与することにより、当初生じたCon A肝障害が次第に減弱されることを見出し、その減弱機序についてin vivo、in vitroで検討を行った。

その結果、(1) Con A 20mg/kg体重を6回繰り返し投与することによりCon A肝障害は抑制され、少なくとも31日間持続していた。(2) Con A繰り返し投与マウスではCon A投与後の血中IFN- γ 、TNF- α 濃度は抑制され、血中IL-4、IL-10濃度は上昇しており、脾細胞培養でも同様であった。(3) 脾細胞におけるCD4/CD8比はCon A繰り返し投与により変化していなかった。(4) Con A繰り返し投与マウス脾細胞を無処置マウスに移入すると、無処置マウスにCon A投を行っても肝障害は抑制された。

以上の結果は、Con A繰り返し投与によりCon A肝障害の抑制が誘導され、サイトカインがTh2にシフトすることによる末梢のT細胞性免疫寛容の誘導が関与していることを示唆するものである。さらに、論文提出者らは、細胞移入実験により制御性T細胞が誘導されている可能性についても示している。本論文は、Con A繰り返し投与モデルが今後の免疫寛容の誘導機序の解明に有用であること、さらに劇症肝炎の治療モデルの可能性を示しており、この分野の研究の発展に寄与するものと考えられる。

なお、本論文および関連領域についての試問に対して適切な応答が得られ、十分な知識と学力を有することが示され、本論文は学位論文に値するものと判定した。