

京都大学	博士 (医学)	氏名	木戸 政博
論文題目	Fatal autoimmune hepatitis induced by concurrent loss of naturally arising regulatory T cells and PD-1-mediated signaling (自然発生する制御性 T 細胞と PD-1 を介するシグナルの同時欠損により致死的な自己免疫性肝炎が誘導される)		
(論文内容の要旨) 【背景】 肝臓は特異な免疫寛容機構を有するが、その破綻は自己免疫性肝炎 (AIH) をはじめとする自己免疫性肝疾患を引き起こす。しかし、肝免疫寛容機構解明に有用な、自然発症型の AIH モデル動物が未だ開発されておらず、AIH の病態形成メカニズムは十分には解明されていない。一方、Foxp3 分子の発現により、その分化と機能が制御されている CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞 (Treg) は、自己免疫応答を制御する重要な免疫担当細胞の一つであり、BALB/c マウスにおいて、新生仔期胸腺摘除法により胸腺由来の自然発生性の Treg を除去することで、多彩な臓器特異的自己免疫疾患が自然発症する。また、リンパ球に発現する抑制性共刺激分子 PD-1 は、自己免疫応答を制御する重要な分子の一つであり、そのリガンドである PD-L1 は肝臓に比較的良好に発現しており、これらが肝臓での免疫制御機構に関与している可能性がある。しかし、マウスにおいて、Treg ないし PD-L/PD-1 経路の単独異常での AIH 発症の報告はなく、AIH 発症抑制における、これらの免疫抑制機構の関与については十分に明らかではない。 【目的】 Treg と PD-L/PD-1 経路が同時に障害されることにより AIH の発症が誘導可能かを検証し、これによって新たに開発した自然発症型の AIH モデルマウスを用いて、その病態形成メカニズムを解析する。 【方法】 BALB/c 系統の PD-1 遺伝子欠損 (PD-1 ^{-/-}) マウスに新生仔期胸腺摘除法を用いて、Treg 除去 PD-1 ^{-/-} マウスを作製し、肝臓を含む各臓器について組織学的解析を行った。また、AIH の病態の特徴の一つである血清自己抗体出現については蛍光抗体法を用いて解析した。さらに、肝浸潤免疫担当細胞について、免疫組織学的解析およびフローサイトメトリーによる解析を行った。各免疫担当細胞の AIH 病態形成における役割や Treg による肝炎抑制能については細胞移入実験で検討した。 【結果】 PD-1 遺伝子欠損単独、または Treg 除去単独のマウスでは肝炎が発症しなかった。しかし、Treg 除去 PD-1 ^{-/-} マウスでは、高度の抗核抗体の産生を伴い、全マウスが 3 週齢をピークに死に至る、T 細胞の著明な浸潤と広範な肝細胞の lobular necrosis を特徴とする AIH が発症した。肝浸潤免疫担当細胞の解析から、CD4 陽性 T 細胞に比較して CD8 陽性 T 細胞がより多く浸潤し、また、肝浸潤 CD8 陽性 T 細胞は、より肝実質へ広範に浸潤し、IFN- γ や TNF- α といった炎症性サイトカインの高い産生能を有していた。Treg 除去 PD-1 ^{-/-} マウスの全脾細胞を RAG2 遺伝子欠損マウスに移入すると肝炎発症が誘導できるが、CD4 陽性 T 細胞を除去した脾細胞の移入では肝炎発症が抑制された。また、CD8 陽性 T 細胞を除去した脾細胞の移入では肝細胞障害が著明に低下していた。一方、Treg 移入による Treg 除去 PD-1 ^{-/-} マウスの AIH 発症抑制実験では、野生型マウス由来の Treg のみならず、PD-1 ^{-/-} マウス由来の Treg の細胞移入によっても AIH の発症抑制が可能であった。また、Treg 移入による AIH 治療実験では、発症抑制可能な数の Treg を移入しても十分な治療効果がなかったが、Treg の移入細胞の割合を相対的に増やすことで肝炎の治療が可能であることが示唆された。 【結論】 胸腺由来の自然発生性の Treg と PD-L/PD-1 経路が同時に障害されることで、自			

己反応性 T 細胞の活性化から致死的な AIH が発症することが示唆された。そして、自己反応性 CD4 陽性 T 細胞は AIH 発症に必要であり、一方で、CD8 陽性 T 細胞も高度の肝細胞障害性という致死性肝炎の病態形成には重要であると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

肝臓は特異な免疫寛容機構を有する一方で、臓器特異的な自己免疫性肝炎 (autoimmune hepatitis; AIH) を発症する。しかし、AIH の病態解明に有用な AIH 自然発症動物モデルは開発されていない。CD4⁺CD25⁺ 制御性 T 細胞 (Treg) は、自己免疫応答制御に重要であり、その除去により臓器特異的自己免疫疾患が発症する。また、抑制性共刺激分子 PD-1 は、そのリガンドである PD-L が肝で発現し、肝免疫制御に関与している可能性がある。そこで本研究で申請者は、PD-1 遺伝子欠損 (PD-1^{-/-}) マウスと野生型マウスに、Treg 除去目的に新生仔期胸腺摘除を施行し、Treg と PD-1 を介するシグナルの AIH 発症抑制への関与を *in vivo* で検証した。

Treg 非除去 PD-1^{-/-} マウスや Treg 除去野生型マウスと比較して、Treg 除去 PD-1^{-/-} マウスでのみ高度の抗核抗体産生と、著明な T 細胞浸潤と肝組織の広範壊死による致死的な肝炎が生じ、Treg と PD-1 を介するシグナルの同時欠損により致死的な AIH が発症することが明らかとなった。肝浸潤細胞のさらなる解析から、CD4⁺ T 細胞と比較して CD8⁺ T 細胞がより多く広範に肝実質に浸潤し、炎症性サイトカイン産生能も高いことが明らかとなった。また、AIH 発症マウスの脾細胞を用いた移入実験から、自己反応性 CD4⁺ T 細胞が発症に必須であること、CD8⁺ T 細胞が肝細胞障害に重要であること、さらに、Treg が肝炎発症後の治療に有用となりえることが示唆された。

以上の研究は、自己免疫性肝炎の病態解明に貢献し、広く肝免疫寛容機構に関する理解を深めるのに寄与するところが多い。したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値のあるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 21 年 2 月 17 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降