

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	青 木 信 裕
論文題目	Dysregulated generation of follicular helper T cells in the spleen triggers fatal autoimmune hepatitis in mice (脾臓における脱制御下での濾胞ヘルパーT 細胞分化誘導がマウスの致死性自己免疫性肝炎を引き起こす)		
(論文内容の要旨)			
【背景】 ヒト自己免疫性肝炎 (autoimmune hepatitis: AIH)は、臓器特異的な自己反応性T細胞による自己免疫応答がその病態の発症に関与していると考えられているが、高ガンマグロブリン血症と抗核抗体などの血中自己抗体の出現を伴うことを特徴とする。そして、その治療にはステロイドが著効することが多いが、中止によりしばしば再燃し難治性であり、また、慢性肝炎から劇症肝炎まで多彩な経過をとることが知られている。しかし、このような特異なAIHの病態の解析が可能な自然発症型の動物モデルが構築されておらず、その発症機序は明らかではなかった。一方、CD4+CD25+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、また、リンパ球に発現する抑制性共刺激分子PD-1 も、自己免疫応答の制御分子として重要である。そこで、BALB/c系統のPD-1 遺伝子欠損 (PD-1^{-/-})マウスにTreg除去目的に新生仔期胸腺摘除(NTx)を施行することで、ヒトAIHに類似した、高ガンマグロブリン血症と高度の抗核抗体産生を伴う重度のAIHが発症することが最近明らかとなった。しかし、このAIHモデルマウス(NTx-PD-1^{-/-})での発症機序は解明されていない。 【目的】 AIH モデルマウスでは、ほぼ全例約2週齢で肝炎を発症し、CD4+T 細胞と CD8+T 細胞による肝組織障害から約4週齢で致死に至るため、その発症過程が経時的に解析可能であることに着目し、AIH の発症を誘導する T 細胞サブセットの同定と局在を明らかにし、その活性化と移行に関与する分子機構を解明することを目的に解析を行った。 【方法】 AIH モデルマウスにおいて、肝臓・脾臓の組織学的解析と、免疫担当細胞についての免疫染色、フローサイトメトリーによる解析を行った。また、血清ガンマグロブリンと抗核抗体は ELISA 法にて解析した。さらに、肝臓・脾臓の T 細胞を精製し発現分子の解析を行い、脾摘、細胞移入、中和抗体の <i>in vivo</i> 投与を行い免疫学的に解析し検証した。 【結果】 NTx-PD-1^{-/-}マウスでの重症肝炎では、CD4+T細胞よりCD8+T細胞が肝組織に広範に浸潤していた。抗CD4 投与にてCD4+T細胞を除去するとCD8+T細胞の肝浸潤含め肝炎が消失するが、抗CD8 抗体にてCD8+T細胞を除去すると致死的な肝障害は抑制されるがCD4+T細胞による肝浸潤は抑制できなかった。また、発症時より脾腫が存在し、新生仔期脾臓摘除を行うと肝炎の発症が抑制できた。これらのことから、脾臓でのCD4+T細胞の活性化が発症に関与すると考え、免疫染色にて発症時期の脾臓CD4+T細胞の局在を観察するとCD4+T細胞は胚中心をもったB細胞が形成する濾胞内に局在していた。また、このT細胞を精製分離し解析するとBc16+ICOS+IL-21+IL-21R+の形質をもつ濾胞ヘルパーT細胞 (T_{fh}細胞)であった。さらに、免疫不全マウスへの精製したT_{fh}細胞の移入にてAIHが発症し、一方で、T_{fh}細胞の分化と機能を抑制可能な抗IL-21 抗体や抗ICOS 抗体投与にて、脾臓の濾胞での胚中心形成、ガンマグロブリンと抗核抗体の産生が抑制され、肝炎も発症しなくなった。そして、AIH発症時期の脾臓ではケモカイン受容体CCR6 を発現したCD4+T細胞が増加し、肝臓ではそのリガンドであるCCL20 の発現上昇を認め、抗CCL20 中和抗体投与にて、脾臓の濾胞からのT_{fh}細胞の移行が抑制され、肝炎の発症も抑制された。 【結論】 AIHモデルマウスでは、脾臓における脱制御下でのT_{fh}細胞分化誘導と、CCR6-CCL20 系に依存したT_{fh}細胞の脾から肝への移行が肝炎発症に必須であることが明らかとなった。			

(論文審査の結果の要旨)
自己免疫性肝炎(autoimmune hepatitis; AIH)は、血清immunoglobulin G(IgG)上昇と抗核抗体などの自己抗体の出現を伴う臓器特異的な自己免疫性疾患であるが、その発症機序は明らかではない。その一因は発症機序が解析可能な自然発症動物モデルがないことにあったが、最近、抑制性共刺激分子PD-1 を欠損したマウスにCD25 ⁺ CD4 ⁺ 制御性T細胞(Treg)除去目的に新生仔期胸腺摘除を施行することで、ヒトAIHに類似して血清IgGの上昇と高度の抗核抗体産生を伴い、約4週齢で死に至る重度のAIHが発症することが明らかとなった。そこで本研究で申請者は、AIHの発症機序の解明を目指して、このAIHモデルマウスの <i>in vivo</i> での免疫学的解析を行った。
このAIH モデルでは、CD8 ⁺ T細胞は、CD4 ⁺ T細胞より肝組織に広範に浸潤し、致死的な肝細胞障害の誘導に必要であるのに対して、CD4 ⁺ T細胞は、そのCD8 ⁺ T細胞の肝浸潤誘導をも含むAIHの発症に必須であることが明らかとなった。また、AIH発症を誘導するCD4 ⁺ T細胞の活性化は脾臓で生じ、脾臓においてCD4 ⁺ T細胞は胚中心を持つリンパ濾胞に局在し、Bc16 ⁺ ICOS ⁺ IL-21 ⁺ IL-21R ⁺ の形質をもつ濾胞ヘルパーT細胞 (T _{fh} 細胞)であることが明らかとなった。そして、脾臓での脱制御下のT _{fh} 細胞分化は、B細胞活性化を介したIgG上昇と抗核抗体産生を誘導するとともに、CCR6-CCL20 系に依存した脾臓から肝臓への移行を惹起し、AIH発症に必須であることが明らかとなった。
以上の研究は、AIH の発症機序の解明に貢献し、ヒト AIH の病態形成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あるものと認める。
なお、本学位授与申請者は、平成23年2月25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。