

氏名(本籍)	相原 尚之(静岡県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	甲第 135 号
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 15 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 2 項該当
学位論文題名	<i>Capillaria hepatica</i> 実験感染マウスにおける II 型クリオグロブリン血症の病理発生機序の解明
論文審査委員	(主査) 代 田 欣 二 (副査) 阪 口 雅 弘 佐 原 弘 益

論 文 内 容 の 要 旨

第 1 章 緒言

クリオグロブリン (CG) 血症は、低温下で沈殿する血清中の免疫グロブリンの産生を特徴とし、多くは特定の感染症に関連して発症する。ヒトにおける CG 血症は、C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染に伴った II 型 CG 血症が最も多い。しかし、病原体感染に関連した CG 血症の実験動物モデルは確立されておらず、研究対象が発症後の患者検体の限られていることから、感染に起因する CG 血症の病理発生機序は、未だ解明されていない。

著者らは、げっ歯類を宿主とする線虫である *Capillaria hepatica* (*C. hepatica*) の感染により、マウスが CG 血症を高率に発症することを見出した。本研究は、*C. hepatica* 実験感染 CG 血症マウスモデルを確立し、本モデルにおける CG 血症発症のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

第 2 章 *C. hepatica* 実験感染 CG 血症マウスモデルの確立

C. hepatica の幼虫形成卵を ICR マウスに経口接種すると、全個体 (15/15 匹) において肝臓実質に虫体の感染が確認された。接種後 20 日の脾臓では、IgM κ 陽性 B リンパ球が増加し、接種後 20 日からは血清中に IgA および IgM κ からなる CG が全例で認められた。さらに、接種後 30 日の血清では、IgM 型 RF が有意に上昇していた。接種後 30 日の腎臓では糸球体がび漫性に腫大し、毛細血管腔を塞栓する IgM を含む硝子様物が観察された。以上の所見から、本病態がモノクローナルな IgM 型 RF とポリクローナルな IgA から構成される II 型 CG 血症であることが示された。従来、実験動物において感染した宿主に高率に CG 血症を発症させる病原体はなく、本モデルは、感染に起因して発症する II 型 CG 血症の初のモデルである。HCV 感染患者や既報の動物モデルにおいて解明することができなかった重要な課題は、病態の初期段階で起こる CG 産生細胞の選択的増殖のメカニズムであり、本モ

デルは、感染から CG 血症が発症するまでの過程を解析できることに最大の利点があると考えた。そこで、第 3 章では本モデルを使い、CG 血症発症初期段階における B リンパ球の選択的増殖過程を評価することとした。

第 3 章 クリオグロブリン血症発症初期段階における B リンパ球の選択的増殖のメカニズムの解明

本章では、*C. hepatica* 感染から CG 血症の発症までの病態において、1. CG を形成する IgM が認識する虫体特異抗原、2. IgM RF 産生細胞の性状、3. 病態進行の促進因子の解析を目的とし、以下の実験を行った。

3-1. CG を形成する IgM が認識する抗原の解析

CG を構成する IgM が認識する *C. hepatica* 抗原を明らかにするため、*C. hepatica* 虫体可溶性画分 (ChSF) を試料とし、感染マウス血清、CG 可溶化物を一次抗体として用いてウエスタンブロッティングを行った。また、血清及び CG の虫体への反応性を蛍光免疫染色により検出した。接種後 24 日の CG 中 IgM は、約 75kDa の虫体抗原に特異的に反応した。また、免疫染色で CG 中の IgM は、虫体の消化管に特異的に結合した。以上の結果から、本モデルの CG は、虫体特異抗原に対して特異的に結合する IgM で構成されることが示唆された。

3-2. IgM RF 産生細胞の性状解析

次に、IgM RF を産生する細胞の同定および性状解析を行った。CG 血症発症マウスの脾臓赤脾髄領域では、IgM κ 陽性細胞が優位に増加しており、フローサイトメトリー及び共焦点顕微鏡による解析から、増加する B 細胞は、 μ 鎖+ κ 鎖+CD45R/B220+CD5+ の B-1a 細胞であることが明らかとなった。CG が IgM κ から構成されることから、脾臓で増加するこの IgM+ κ + B-1a 細胞が IgM RF 産生細胞であると仮定した。そこで、ChSF が感染マウス脾臓 B-1a 細胞に与える影響を *in vitro* において評価した。

接種後 24 日の感染マウスから単離した脾臓 B-1a 細胞を ChSF で刺激すると、細胞増殖および IgM 産生が亢進した。産生された IgM は CG と同様に約 75kDa の虫体抗原に特異的に結合した。また、IgM 可変領域の RT-PCR では、ChSF 刺激により、約 1,100bp の可変領域 mRNA 発現が上昇した。発症マウス個体間で共通して、約 1,100bp の可変領域 mRNA 発現を認めた。

以上の結果から、ChSF による刺激で、B-1a 細胞の選択的な増殖が促進されており、この IgM+ κ + B-1a 細胞が CG 産生細胞であると考えられた。

3-3. 病態進行の促進因子の解析

CG 血症の進行には、宿主 Th1/Th2 応答性の違いが関与しているという仮説を立て、異なるマウス系統を用いて感染実験を行った。その結果、感染時の Th1/Th2 応答性は、BALB/c と C57BL/6 では異

なっており、Th2 に偏向した免疫応答が BALB/c では起こり、C57BL/6 では起こらなかった。また、感染した BALB/c マウスでは、全身性の好酸球増多症が起こっていた。このことから、CG 産生細胞である B-1a 細胞と好酸球の両方に対する増殖・活性化因子である IL5 に着目した。血清中 IL5 濃度は、BALB/c マウスで感染後 20 日に一過性に高度に上昇したが、C57BL/6 では顕著な上昇は見られなかった。また、C57BL/6 を遺伝的背景に持ち IL5 を過剰発現する、IL5tgC57BL/6 マウスを用い感染実験を行ったところ、IL5 の血中濃度は感染前から高値であり、感染後はさらに著しく上昇していた。次に、これら 3 系統の CG 血症の病態を比較した。BALB/c マウスでは、接種後 24 日に、CG の形成、血清中 IgM RF 濃度の上昇、糸球体への IgM の沈着を認めたが、C57BL/6 マウスではいずれも軽度であった。一方、IL5tgC57BL/6 マウスでは、BALB/c マウスに匹敵する CG 血症が惹起された。このことから、Th2 に偏向した免疫状態下で CG 血症の病態は促進され、それには IL5 が関与していることが示唆された。

感染により高度な CG 血症を発症した BALB/c マウスおよび IL5tgC57BL/6 マウスに ChSF を腹腔内投与したところ、IL5tgC57BL/6 マウスでのみ CG 血症が惹起された。ChSF 投与では、炎症反応は誘起されず、IL5 濃度に変化はなかった。このことから、感染による Th2 免疫応答は、IL5 を上昇させるために重要であり、CG 血症の進行に必須の因子は IL5 であることが示された。

以上の結果から、本モデルにおける CG 血症発症には、1. 脾臓 B-1a 細胞 (IgM RF 産生細胞として)、2. 特異抗原 (IgM RF 産生 B-1a 細胞の増殖、IgM 産生のトリガーとして)、3. IL5 (CG 血症の促進因子として) の 3 つの因子が必須であることが明らかになった。

第 4 章 IgM RF 産生 B-1a 細胞における増殖抑制因子 Stra13 発現解析

接種後 24 日は CG 血症の病態がピークの時期であるが、接種後 24 日で脾臓から単離した B1a 細胞を ChSF、IL5 および LPS で刺激すると、ChSF 刺激でのみ細胞増殖および IgM 産生が亢進し、IL5 および LPS 刺激には反応しなかった。この結果から、CG 血症の病態がピークに達する時期には、CG 産生細胞はすでに機能的に抑制状態にあると推察された。そこで、関与が示唆される B 細胞抑制因子 Stra13 発現を RT-PCR により調べた。その結果、非感染マウスの B-1a 細胞には Stra13 は発現していなかったが、接種後 24 日の B-1a 細胞には強い発現が認められた。脾臓単離リンパ球からは Stra13 の発現は検出されず、Stra13 発現が B-1a 細胞に限定していることが示唆された。ChSF 刺激により B-1a 細胞における Stra13 発現が低下し、細胞増殖、IgM 産生が亢進することから、この抑制機序が可逆的であることが示唆され、ChSF 中の特異抗原が Stra13 発現制御に関与していることが考えられた。また、B-1a 細胞は LPS 刺激により Stra13 発現が低下したものの、細胞増殖や IgM 産生が起こらないことから、Stra13 以外の抑制機序が存在することが示唆された。

第5章 総括

*C. hepatica*の実験感染により、高い再現性を持つII型CG血症マウスモデルを確立した。CG血症発症の初期段階には、IgM RF産生B-1a細胞の選択的増殖の過程があり、発症には、1. IgM RF産生細胞として脾臓B-1a細胞、2. IgM RF産生B-1a細胞の増殖、IgM産生のトリガーとしての特異抗原、3. CG血症の促進因子としてIL5の、3つの因子が必須であることが示された。急速に増殖したIgM RF産生細胞には、速やかにB細胞増殖抑制因子Stra13が発現することが示され、増殖に適した条件から逸脱した場合には、それらの細胞は速やかに不活性化状態になることが示唆された。本モデルは、CG血症において病態解析が困難であった発症初期の解析が可能である有用な動物モデルであり、本モデルで得られた知見は、病原体感染に起因するCG血症の病態解明につながることを期待される。

論文審査の結果の要旨

クリオグロブリン (Cryoglobuline, CG) 血症は、低温下で血清中に沈殿する免疫グロブリンの産生を特徴とする疾患で、ヒトのC型肝炎ウイルス感染症をはじめとして多くの感染症に随伴して発症する。しかし、感染からCG血症に至る病理発生機序の詳細は未だ解明されていない。これまでに感染症に起因したCG血症の実験動物モデルは確立されておらず、CG血症の病理研究対象は患者検体に限られていた。感染からCG産生に至る機序の解明は、CG血症の病理発生機序の解明に重要であり、感染に起因するCG血症の動物モデルの確立が求められている。*Capillaria hepatica* (*C. hepatica*) はげっ歯類を宿主とする線虫であり、感染により肝炎を引き起こす。著者はマウスが*C. hepatica*に感染するとCG血症が高率に発症することを見出した。本研究は*C. hepatica*感染に起因するマウスのCG血症の病理発生機序を解明し、ヒトおよび動物のCG血症の発生および進行機序の解明に資することを目的としている。本論文は、第1章緒言および第5章総括を含む5章から構成されている。

第2章では、*C. hepatica*実験感染CG血症マウスモデルの確立を目的として、ICRマウスを用いて*C. hepatica*の幼虫形成卵の経口接種を行い感染率、全身臓器の光学顕微鏡的变化、腎糸球体における超微形態学的変化、血清CGの検出(CG形成試験およびimmunoglobulinの γ 鎖、 α 鎖、 μ 鎖、 κ 鎖、 λ 鎖に対するwestern blotting)、血清リウマチ因子(Rheumatoid factor, RF)の検出を接種後30日まで経時的に検索した。その結果、*C. hepatica*の経口接種を受けた全例(15/15匹)のマウスの肝臓に感染が成立し、接種後20日で血清中にCGの形成を認めた。さらに、本病態がモノクローナルなIgM型RFとポリクローナルなIgAから構成されるII型CG血症であることを示し、感染に起因するII型CG血症の実験動物モデルを確立した。

第3章では、確立したモデルにおけるCG産生細胞の選択的増殖の機序を解明することを目的とし、1. CGを形成するIgMが認識する虫体特異抗原(感染マウス血清およびCGを用いた虫体抗原に対するwestern blottingおよび虫体標本を用いた免疫蛍光法)、2. IgM RF産生細胞の性状(リンパ球マー

カーを用いたフローサイトメトリ-および脾臓の免疫蛍光法、単離リンパ球に対する抗原刺激試験)、

3. CG 産生細胞の増殖促進因子 (血中サイトカインの ELISA、BALB/c と C57BL/6、IL-5 トランスジェニックマウスを用いた虫体抗原刺激実験)、の解析を行っている。その結果、接種後 24 日の CG 中 IgM は、約 75kDa の虫体抗原に特異的に反応し虫体の消化管に結合したことから、CG は虫体特異抗原に対して結合する IgM で構成されることが示された。また、脾臓赤脾髄で μ 鎖+ κ 鎖+CD45R/B220+CD5+の B-1a 細胞が増殖しており、単離 B-1a 細胞は虫体抗原刺激により約 1,100bp の IgM 可変領域 mRNA を発現する細胞群が増殖し、約 75kDa の虫体抗原に特異的に結合する IgM の産生を亢進したことから、虫体刺激によって選択的に増殖した脾臓の IgM+ κ + B-1a 細胞が CG 産生細胞であることが示唆された。さらに、感染後の CG 産生および血中 IgMRF 産生が C57BL/6 と比べ BALB/c マウスで血中 IL-5 の上昇を伴って優位に高値を示したことから、虫体抗原刺激によって IL-5 トランスジェニックマウスでのみ CG 血症が惹起されたことから、感染による Th2 免疫応答は、IL5 を上昇させるために重要であり、CG 血症の進行に必須の因子は IL5 であることが示された。

第 4 章では、本モデルでは虫卵接種後 24 日以降に血中 CG 量が減弱することから、IgM RF 産生 B-1a 細胞の増殖抑制機序に焦点をあて、増殖抑制因子である Stra13 の単離 B-1a 細胞における mRNA の RT-PCR を行った。その結果、非感染マウスの B-1a 細胞には Stra13 は発現していなかったが、接種後 24 日の B-1a 細胞には強い発現が認められた。また、虫体抗原刺激により B-1a 細胞における Stra13 発現が低下し、細胞増殖、IgM 産生が亢進することから、この抑制機序が可逆的であることが示唆され、虫体の特異抗原が Stra13 発現制御に関与していることが考えられた。

以上、著者は本論文において、*C. hepatica* の虫卵経口接種による新規の実験的 CG 血症マウスモデルを確立し、病理学的観察、血中 CG の性状解析、単離 B-1a 細胞を用いた *in vitro* 実験、異種系統マウスへの感染実験から虫体特異抗原および宿主免疫の観点から CG 血症の病理発生機序仮説を構築し、トランスジェニックマウスを用いた実験により仮説を実証した。本研究により、CG 血症発症の初期段階には、IgM RF 産生 B-1a 細胞の選択的増殖の過程があり、発症には、1) IgM RF 産生細胞として脾臓 B-1a 細胞、2) IgM RF 産生 B-1a 細胞の増殖、IgM 産生のトリガーとしての特異抗原、3) CG 血症の促進因子として IL5 が必須であることを新たに示した。

本研究は比較病理学研究において、CG 血症の発症メカニズムの解明に貴重な知見を提供しうるものであり、博士 (獣医) の学位を授与するのにふさわしい業績であると判定した。