



## Dendritic cells are involved in pulmonary granuloma formation elicited by BCG in rats

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 土屋, 智義 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1163">http://hdl.handle.net/10271/1163</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 310号	学位授与年月日	平成12年 3月27日
氏名	土屋智義		
論文題目	Dendritic cells are involved in pulmonary granuloma formation elicited by BCG in rats (ラット BCG 肺肉芽腫形成における樹状細胞の関与の検討)		

博士(医学) 土屋 智 義

## 論文題目

Dendritic cells are involved in pulmonary granuloma formation elicited by BCG in rats

(ラットBCG肺肉芽腫形成における樹状細胞の関与の検討)

## 論文の内容の要旨

[はじめに]

Dendritic cell (DC)は生体で最も強力な抗原提示細胞(APC)であり、近年の報告では肺においても気道や間質に広く分布し、細胞マクロファージに代わって肺のAPCとして主役を演じていることが明らかになってきている。しかし現在までのところ、肉芽腫を形成する疾患において、DCが病態に関わっているか否かについては全く明らかになっていない。我々は、強力なAPCであるDCが肉芽腫形成過程にも関与している可能性を明らかにするため、Bacillus Calmette-Guérin (BCG)死菌によるラット肺肉芽腫モデルを作製し、肉芽腫形成過程におけるDCの分布や役割について検討した。

[材料ならびに方法]

1. 動物は、Lewis Rat (RT1<sup>a</sup>) 8週齢、雄を用い、初回感作として加熱BCG死菌 1 mg/ml Freund's incomplete adjuvant、0.1ml/bodyを陰茎背静脈より静注し、初回感作から3週間後、二次感作として加熱BCG死菌0.5mgを陰茎背静脈より静注した。
2. 二次感作より3、7、14、21、28日後にラットを脱血死させ、左肺をホルマリン固定し、右肺を凍結ブロックとした。
3. 左肺より作製したホルマリン固定標本はHE染色を行い、肉芽腫の大きさの検討に用い、右肺より作製した凍結ブロックはラットDCの特異抗体であるOX62を用い免疫染色を行った。
4. 肉芽腫の大きさの解析はCCDカメラにより顕微鏡画像を取り込み後、画像解析ソフト(NIH image)を用いて肉芽腫1個あたりの平均面積を測定し経時的に算出した。
5. 凍結標本における免疫染色陽性細胞数の解析は、肉芽腫一個あたりの陽性細胞数を数え、平均値を算出し経時的に検討した。
6. OX62陽性細胞のphenotypeを解析するため、二次感作後14日目の肉芽腫を用い、OX6 (抗MHC Class II)、OX52 (抗pan-T細胞)、V65 (抗 $\gamma\delta$ -T細胞)、OX8 (抗cytotoxic T細胞)、ED2 (抗マクロファージ)を用いて二重染色を行った。
7. OX62陽性細胞のさらに詳しい超微形態、phenotype、抗原提示能などを検討するため、OX62陽性細胞を肉芽腫肺から酵素処理、bovine serum albuminを用いた密度分離、OX62抗体でのmagnetic cell separation (MACS)によって単離した。
8. 単離したOX62陽性細胞をglutaraldehydeで固定、標本作製し、透過型電子顕微鏡で形態を観察した。
9. 単離したOX62陽性細胞にfluorescein isothiocyanate標識のOX62抗体と、phycoerythrin標識のMHC-class II、B7-1、B7-2抗体を反応させ、two-color flow cytometryを用いて表面抗原の発現を検討した。
10. 単離したOX62陽性細胞に2000radのradiationを行い、DA rat (RT1<sup>a</sup>)の脾臓からT細胞を精製し、OX62陽性細胞をstimulator、DA ratのT細胞をresponderとしたallogeneic mixed lymphocyte reaction (allogeneic

MLR)を行なった。

11. 単離したOX62陽性細胞のIL-12 p40のmRNAの発現をreverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)法を用いて検討した。

#### [結果]

1. 加熱BCG死菌を用いた肉芽腫の実験動物モデルでは、二次感作後14日目をピークとして肺内に肉芽腫が形成され以後消退していったが、28日目でも肉芽腫は残存していた。
2. 肉芽腫周囲には多数の大型のOX62陽性細胞が存在し、その数は肉芽腫の成熟変化にしたがって増減していた。
3. 肉芽腫周囲に存在する大型のOX62陽性細胞はOX6が強陽性であったが、OX52、V65、OX8、ED2は陰性であった。また、これらのOX62陽性細胞は肉芽腫周囲に浸潤したT細胞と密接に関連して存在していた。
4. 肉芽腫肺より単離したOX62陽性細胞は超微形態的に、DCに特徴的な細胞周囲の樹枝状の突起および分葉状の核を持っており、ライソゾーム、バーベック顆粒は認められなかった。
5. 単離OX62陽性細胞は、flow cytometryで95%以上がOX62とMHC class IIのdouble positiveであり、B7-1、B7-2の接着分子をいずれも95%以上と強く発現していた。
6. Allogeneic MLRにおいて強いT細胞の増殖が認められ、強力な抗原提示能を持つことが確認された。
7. RT-PCR法で、単離OX62陽性細胞はIL-12 p40のmRNAを強く発現していた。

#### [考察]

BCG感作により作製された実験的肺肉芽腫モデルにおいて、肉芽腫周囲には多くのOX62陽性細胞が存在していた。これらの細胞を単離したところDCに特徴的な超微形態を呈し、MHC class II、B7-1、B7-2を強く発現し、強力な抗原提示能を示しており、肉芽腫周囲に集積した大型のOX62陽性細胞はDCであると考えられた。また、DCの数の増減が肉芽腫の成熟と平行であること、その分布がT細胞に近接していること、単離したDCがMHC class IIや接着因子を強く発現し強力な抗原提示能を持つことなどから、DCは肉芽腫周囲に存在するT細胞を活性化していることが推測された。

#### [結論]

以上の結果より、DCは強力な抗原提示能を介して、肉芽腫周囲に浸潤したT細胞を活性化し、肉芽腫形成に積極的に関与している可能性があるかと推定される。

### 論文審査の結果の要旨

樹状細胞(Dendritic cell; DC)は広く生体に分布する骨髄由来の細胞で、末梢組織中では未成熟DCとして抗原捕捉をおこなうが、その過程でサイトカインを含むさまざまな刺激により強力な抗原提示機能をもつ成熟DCへと分化する。肺においてもDCは気道や間質に広く分布し、抗原提示細胞(APC)として主役を演じている。結核、サルコイドーシス、肺真菌症など肺に肉芽腫を形成する疾患はたくさんあるが、この過程においてDCがどのように病態に関わっているかについては全く明らかになっていない。

申請者らはラット肺に実験的肉芽腫モデルを作製し、肉芽腫形成過程におけるDCの分布や役割につい

て経時的に検討した。この研究の特徴は、Bacillus Calmette-Guérin (BCG) 死菌を血管内に注入することにより従来から作成が困難であるとされた肺肉芽腫をきわめて効率良く誘導した点である。

Lewisラットに加熱BCG死菌とFreund不完全アジュバントを3週間間隔で2回感作することにより肺に肉芽腫を作製した。2回目の感作後、28日目まで経時的に肺を切除し、通常の病理組織と各種抗体を用いた免疫染色で浸潤細胞を調べ、さらに肺から単離したDCの機能を免疫学的に検索した。ラットDCは特異抗体であるOX62を用いて同定した。肉芽腫の形成は3日目からみられ、その周囲にはOX62陽性DCが浸潤していた。DCの数は肉芽腫の成熟の変化にしたがって増減していた。肉芽腫の形成は感作後14日目が最も強く、DCは肉芽腫の周囲に浸潤したT細胞と密接に接触して存在し、その数もピークに達した。この大型のOX62陽性細胞はOX 6 (抗MHCクラスII抗体)が強陽性であったが、OX52 (抗pan-T細胞抗体)、V65 (抗 $\gamma$   $\delta$ -T細胞抗体)、OX 8 (抗細胞障害性T細胞抗体)、ED 2 (抗マクロファージ抗体)とは反応しなかった。次に、OX62陽性細胞を肉芽腫肺から酵素処理、密度分離、OX62抗体によるmagnetic cell separationによって単離し、超微形態、flow cytometryによる表面形質、allogeneic mixed lymphocyte reaction (allogeneic MLR)による抗原提示能、reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)によるIL-12p40のmRNAの発現を検討した。単離OX62陽性細胞はDCに特徴的な細胞質突起をもち、flow cytometryでMHCクラスII、B7-1、B7-2を95%以上に発現していた。また、allogeneic MLRにおいて強力な抗原提示能をもち、RT-PCRにてIL-12p40のmRNAを発現していた。

これらを総合すると、DCの数の増減が肉芽腫の成熟とパラレルであること、その分布がT細胞に近接していること、単離したDCがMHCクラスIIや接着分子を強く発現し、強力な抗原提示能を持つことなどから、DCは肉芽腫周囲に存在するT細胞を活性化しつつ、肉芽腫形成に関与していることが推測され、肺肉芽腫形成におけるDCの機能を解明する上で示唆に富む所見であると、高く評価された。

この発表の際、申請者に対して以下のような質問がなされた。

- 1) Lewisラットを用いた理由
- 2) なぜ抗原を静脈注射したのか、アジュバントを用いたのか、2回感作したのか
- 3) この肉芽腫モデルはヒトのどのような疾患に対応するのか
- 4) DC出現とT細胞浸潤の時間的な関係
- 5) 正常肺よりのDC単離の可能性
- 6) RT-PCRの方法
- 7) MLRでラットの種を変えればどうなるか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 瀧川 雅 浩  
副査 山下 昭 副査 馬場 聡