

【8】

氏 名	さ さ き まさる 佐々木 優
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第668号
学位授与の日付	平成28年3月9日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (生体構築学)
学位論文題目	Pivotal role of duct epithelia in salivary gland GVHD (唾液腺GVHDにおける導管上皮の中心的役割)
論文審査委員	(主査) 教授 川 又 均 (副査) 教授 三 谷 絹 子 教授 小 端 哲 二

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

移植片対宿主病 (graft versus host disease : GVHD) では、消化管、皮膚などのほかに唾液腺が標的器官となるが、唾液腺の病態形成の機序に関する詳細な検討は少ない。これまでヒト患者において、口腔粘膜生検を用いた口腔の小唾液腺の組織学的報告はあるが、大唾液腺を用いた唾液腺導管上皮細胞の動態とT細胞との相互作用についての詳細な報告は少ない。

我々は予備実験で導管上皮細胞がII型主要組織適合遺伝子複合体 (MHCII) を発現することを認めた。MHCIIは一般的には樹状細胞等の抗原提示細胞に発現し抗原をT細胞に提示するために使われるため、導管上皮細胞のMHCII発現はT細胞を活性化しアロ反応を増強、GVHDを悪化させることを想起させる。我々は導管上皮細胞がGVHDでの唾液腺の破壊を悪化させる可能性について検討した。

【目 的】

本研究の目的は、ラットの唾液腺GVHDモデルを用いて、唾液腺導管上皮のMHCII発現、ケモカインの発現およびドナー細胞の浸潤と組織破壊を経時的に検討し、病態の形成メカニズムを解明することである。

【対象と方法】

本研究は、獨協医科大学動物実験委員会の承認を得て、指針に従って行った。ラットGVHDモデ

ルとして、レシピエントラットとして8週齢のLewisラットに3 + 3Gyの非致死量の放射線を照射して免疫抑制をかけ、ドナーとして10週齢のDAラットの胸管から採集したリンパ球 (5×10^7 個) を移入して、GVHDを発症させた。移入から2、4、6、8、10日後、屠殺1時間前に5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) を静注、屠殺後、唾液腺 (顎下腺・舌下腺・耳下腺) 組織を採取した。放射線のみを照射し、リンパ球を移入しなかった群を対照群とした。

免疫組織化学的解析のため、得られた組織は新鮮凍結またはPeriodate-lysine-para- formaldehyde (PLP) で固定後凍結をおこなった。染色には、MHCIIを染色するためのレシピエント特異的rat MHC II (OX3)、腺房を判別するためのkeratin 5、ドナー細胞を判別するためのDAラット特異的MHC I (MN₄₋₉₁₋₆)、ケモカインとしてCXCL9、CXCL10、CCL5、ケモカインレセプターとしてCXCR3、CCR5、細胞の増殖を判別するためのBrdUに対する抗体を一次抗体とし、それぞれ適切な二次抗体と基質を用いて発色させた。さらに組織形態を明瞭にするため、Type IV collagen抗体を用いて、多重免疫染色をおこなった。組織写真はMicrophot-FXとDP26デジタルカメラを使用して撮影した。組織の面積や浸潤細胞の数は撮影した写真からPhotoshopを用いて計測した。統計学的分析には、Student t-testを用いた。

DNAマイクロアレイ・定量PCRのため、新鮮凍結切片よりISOGEN (Nippon Gene) を用いてRNAを抽出した。抽出したRNAを用いて、DNAマイクロアレイはGeneChip[®] Rat Gene 2.0 ST ArrayとGeneChip scanner 3000 (Affymetrix) を用いて行った。定量PCRはHokkaido System Scienceで作成されたプライマーとUniversal Probe (Roche) を用い、StepOne[™]Realtime PCR system (Thermo Fisher Scientific) で行った。

【結 果】

まず顎下腺、舌下腺、耳下腺の三種類の大唾液腺のGVHDによる損傷について評価した。GVHD群においては、細胞移入から6日目以降、顎下腺と耳下腺で腺房組織の破壊とそれに伴う間質の増加がみられたが、舌下腺の破壊は少なかった。顎下腺と耳下腺の導管では移入4～6日後よりMHCIIの発現が見られ、移入8日後には100%の導管がMHCIIを発現していた。これはドナー細胞の浸潤に1～2日先行した。舌下腺ではMHCIIの発現はそれより遅れていた。また、舌下腺ではそもそも導管の割合 (切片上で導管が占める面積) が小さかった。

ドナー細胞の浸潤は絶対数では腺房、導管ごとの差はなかったが、面積で割り密度を算出すると、導管で最もドナー細胞の密度が高かった。これは組織破壊の少ない舌下腺でも観察された。

マイクロアレイと定量PCRによる計測では、GVHDを発症した顎下腺では対照群に比べTh1ケモカイン (CXCR3、CCR5、CCR6のリガンド) のmRNAの発現が亢進することが示された。ケモカインタンパクの免疫染色では、GVHD群、対象群ともに抗CXCL9抗体、抗CXCL10抗体、抗CCL5抗体で導管が染色され、ケモカイン発現においても導管が中心となることが明らかとなった。一部GVHD発症と関わりなくconstitutiveなケモカイン発現があったが、GVHD群の8日後ではCXCL9とCXCL10は点状に強く染まり、マイクロアレイや定量PCRで見られたmRNAの発現上昇と関連することが示唆された。また導管に浸潤した細胞は抗CXCR3抗体、抗CCR5抗体で染色可能であった。

【考 察】

今回の検索で以下のことが明らかになった。1. MHCII分子はGVHDにおいて顎下腺・耳下腺・舌下腺の導管上皮に発現する。2. MHCIIの発現は腺房の破壊とドナー細胞の浸潤に先行する。3. ドナー細胞は最初に導管に浸潤する。4. 導管上皮にはMHCIIと同様にTh1ケモカインが発現する。5. 導管に浸潤するドナーT細胞はTh1ケモカインレセプターを発現する。

今回の病態モデルにおいて、MHCII発現がドナー細胞の浸潤に先行することは、MHCIIを発現した導管細胞がドナー細胞浸潤を促進することを示唆する。また、組織破壊がほとんど起こらなかった舌下腺や涙腺は導管の数が少ないこと、舌下腺ですらドナー細胞浸潤は導管で主としておこることも導管が唾液腺破壊に重要な役割を持つことを支持する。

Th1型ケモカインも、導管を中心とした発現が認められ、そのケモカインに対応するレセプターを浸潤ドナー細胞が発現していたことは、MHCIIに加え、ケモカインも介して導管がドナー細胞浸潤を促進することを示唆した。

【結 論】

GVHDの唾液腺の病態形成に関する導管上皮の役割についていくつかの知見を明らかにした。この結果がさらなるGVHDの病態の解明につながると考えられる。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

移植片対宿主病（graft-versus-host disease：GVHD）では、皮膚、腸管などに加え、唾液腺も傷害を受けるが、その機序に関する検討は立ち遅れてきた。申請論文では、予備実験にて唾液腺導管上皮細胞がII型主要組織適合遺伝子複合体（type II major histocompatibility complex：MHCII）を発現することに着想を得て、ラットGVHDモデルを用いてGVHDの唾液腺傷害に導管が及ぼす役割を検討したものである。検討の結果、顎下腺、耳下腺ではGVHDの進行に伴い次第にMHCIIが発現し、さらにその発現より1－2日遅れて腺房の破壊が進行するという病態を明らかにした。さらに、唾液腺へのドナー細胞の浸潤度を導管、腺房、ストローマごとに計測したところ、顕微鏡視野中の絶対数では有意差は認められなかったが、単位面積当たりの密度では顎下腺、耳下腺、舌下腺のすべてにおいて導管が最大となった。顎下腺内でのmRNA発現解析では、Th1型ケモカインの発現上昇が認められ、蛋白レベルでも組織上では導管にTh1ケモカインが発現していることが確認された。浸潤ドナー細胞にはこれらのケモカインに対応する受容体の発現が認められ、導管の内外に局在していた。以上の結果より、唾液腺導管はケモカインを通じてのドナーT細胞の浸潤の誘導と、MHCIIによる浸潤ドナーT細胞の再活性化を通じて唾液腺の障害を増強する可能性があるかと結論づけた。さらに組織破壊が少なかった舌下腺では他2つの大唾液腺に比べ導管の数が少ないことも、導管がGVHDの唾液腺傷害に関与することを示唆した。

【研究方法の妥当性】

申請論文では、モデルラットの病変部位の標本に高度な多重免疫染色を施し数多く観察した後、時

系列に沿った網羅的解析を行っている。得られた顕微鏡画像はブラインド化した客観的方法により面積、細胞数を数値化し、統計的に妥当な解析が加えられている。ケモカイン発現はqPCRとDNAマイクロアレイを併用したmRNAレベルの解析と、免疫染色によるタンパク質発現の確認が組み合わせられており、妥当なものである。

【研究結果の新奇性・独創性】

GVHDにおける唾液分泌の低下は臨床的によく知られているものの、そのメカニズムの解析はほとんど進んでいなかった。申請論文では、動物モデルを用い、それを高度な免疫染色の手法で導管、腺房といった「部位」ごとに分けてMHCII発現、細胞浸潤とケモカイン発現を証明している。さらに時系列の解析から、唾液腺GVHDにおいて導管が責任組織であることを強く示唆する結果を初めて示しており、本研究は新奇性・独創性に優れた研究と評価できる。

【結論の妥当性】

申請論文では、①導管のMHCII発現がドナー細胞浸潤に1-2日先行することと、②絶対数では導管または腺房に浸潤したドナー細胞数に差はないが、密度では導管の浸潤ドナー細胞密度が最も高くなり、しかも障害の少ない舌下腺でもその傾向が維持されること、③唾液腺のTh1型ケモカインの発現は導管に集中し、対応するレセプターを発現したドナー細胞が導管に浸潤していること、④三種類の大唾液腺の中で最も障害の少ない舌下腺では導管の数も少ないこと、の4点の根拠を揃え、導管がGVHDにおける唾液腺破壊に中心的役割を果たす可能性が高いと結論づけおり、妥当なものである。

【当該分野における位置付け】

申請論文は、これまで報告（探索）の少なかったGVHDにおける唾液腺傷害のメカニズムの解明を試みた研究である。また元来皮膚、腸管を含め、これら組織の上皮が移植前処置により受けるダメージにより放出された何らかの抗原や、ダメージに応答したサイトカイン・ケモカインの発現上昇が移植後のGVHDの発症の発端となるという仮説が立てられてきており、今回の唾液腺上皮細胞が唾液腺傷害の責任細胞であるという結果は、これら一般的なGVHDの発症メカニズムにも関連し、示唆を与える可能性がある。以上のことより、申請論文の当該分野における意義は深いと評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は、歯科口腔領域の臨床の豊富な経験を積んだ上で、移植免疫学及び組織学の知見および免疫組織化学、分子生物学的手法を用いて研究を立案遂行している。申請論文は当該領域の学術誌への掲載が承認されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士（医学）の学位授与に相応しいと判定した。

（主論文公表誌）

Archives of Histology and Cytology

76 : 9-21, 2016