

[別紙1]

論文の内容の要旨

論文題目 Graft-versus-Host Disease 腸炎マウスモデルを用いた
p38 Mitogen-Activated Protein Kinase の生体内における
機能とその病態への寄与に関する検討

指導教官 小俣 政男 教授
東京大学大学院医学系研究科
平成13年4月入学
医学博士課程
内科学専攻
氏名 大田 幹

研究の背景および目的

現在、骨髄移植療法は特に血液悪性疾患を中心に標準的な治療法の一つとして認知されているが、一方でこの移植治療には様々な合併症が存在するのも事実である。なかでも Graft-versus-Host Disease (GVHD) は、時に生命を脅かす重篤な合併症の一つである。GVHD は主としてドナー由来リンパ球が宿主の消化管・肝臓および皮膚などの標的臓器に組織障害をひきおこし、特に GVHD 腸炎は重篤化すると時に致死的であり、臨床における重要な課題となっている。

p38 MAP キナーゼ (p38) は、様々な細胞外刺激によって活性化され、免疫担当細胞においては炎症性サイトカイン発現や細胞増殖を制御していることから、免疫応答に中心的役割を果たす分子の一つであると考えられている。p38 はこれまでも抗炎症治療における標的分子の候補の一つとして注目されてきており、実際に p38 特異的阻害剤は、いくつかの炎症性疾患モデル等で有効性が報告されている。一方 GVHD もまた、様々な炎症性サイトカイン刺激に伴う免疫応答を介して進展・増悪する疾患であることが知られているが、p38 の GVHD の病態への関与について検討された報告はない。

本研究では p38 ヘテロマウス (p38^{+/-}) を用いた急性 GVHD 腸炎モデルを作成し、p38 の治療応用への可能性についても視野に入れて、p38 の生体内炎症反応における機能と、その GVHD 腸炎の病態に果たす役割について検討した。

方法

C57BL/6 マウス (B6)、B6D2F1 マウス (BDF1)、B6 を背景に持つ Green fluorescent

protein (GFP)トランスジェニックマウス(B6-GFP)、および B6 を背景に持つ p38 ヘテロマウス(B6-p38 $\alpha^{+/-}$)を用意した。GFP-Wild-type (GFP-WT)および GFP-p38 $\alpha^{+/-}$ マウスは、B6-GFP と B6-p38 $\alpha^{+/-}$ マウスを交配することにより作成された。急性 GVHD は BDF1 宿主マウスに致死量の放射線を全身照射した後に、B6 マウス由来のドナー脾細胞および骨髄細胞を移植することで誘発した。

移植マウスの腸管組織を用いてヘマトキシリン・エオジン染色および TUNEL 染色を施行した後に病理学的検討がされた。

腸管組織の TNF- α 濃度は Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)を用いて定量した。

Intestinal intraepithelial lymphocytes (IEL)は比重遠心法を用いて腸管組織より単離した。Mesenteric lymph nodes lymphocytes (MLNL)はナイロン・メッシュで単細胞に分離して回収した。IEL および MLNL の GFP、CD4、CD8 陽性分画をフローサイトメトリーを用いて解析した。

IEL および MLNL の サイトカイン 発現量を quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (QRT-PCR、定量的 RT-PCR)を用いて解析した。

IEL の *in vitro* 培養下における生存率をトリパンブルー染色によって検討した。また IEL の細胞死量を定量するために、培養上清を用いて lactose dehydrogenase Release Assay (LDH Assay)を施行した。

結果

移植マウス群の移植後の生存日数と体重変化について検討したところ、宿主マウスと同種同系(B6→B6)の脾臓リンパ球および骨髄細胞を移植した対照移植マウス群(Syn-WT、Syn-p38 $\alpha^{+/-}$)は、観察期間内では 100%の生存率であり、体重減少も認めなかったが、一方で同種異系(B6→BDF1)の脾臓リンパ球および骨髄細胞を移植した両 GVHD 誘発マウス群(Allo-WT、Allo-p38 $\alpha^{+/-}$)はともに 100%の致死率であり、生存期間中も体重減少の進行を認めた。両 GVHD 誘発マウス群の平均生存日数は Allo-WT 群で 30.8±2.7 日、Allo-p38 $\alpha^{+/-}$ 群で 19.5±1.5 日であり、Allo-p38 $\alpha^{+/-}$ 群で有意な生存期間の短縮を認めた。

移植第 21 日に腸管病理組織を評価したところ、Allo-p38 $\alpha^{+/-}$ 群の腸管組織では Allo-WT 群に比して、腸管上皮や固有層への著明なリンパ球の浸潤、陰窩組織の破壊等の GVHD 腸炎に認められる病理所見が明らかであった。TUNEL 染色を施行すると Allo-p38 $\alpha^{+/-}$ 群では Allo-WT 群に比して有意な腸管上皮のアポトーシス細胞数の増加を認め、Allo-p38 $\alpha^{+/-}$ 群での GVHD 腸炎の増悪が示唆された。

両 GVHD 誘発マウス群より経時的に IEL および MLNL を回収して、ドナー由来リン

パ球の浸潤細胞数を検討したところ、Allo-WT 群においてはドナー由来 IEL、MLNL 数ともに移植第 12 日にピークに達して、その後減少傾向にあることが観察された。特に IEL は移植第 12 日以降に大半がドナー由来 CD8 陽性リンパ球で構成されていることが確認された。一方 Allo-p38 $\alpha^{+/-}$ 群では、ドナー由来 MLNL 数は Allo-WT 群と同様に移植第 12 日をピークとするものの、いずれの時期においても Allo-WT 群に比して有意な細胞数の減少を認めなかったが、ドナー由来 IEL 数は Allo-WT 群と異なり、第 12 日以降の浸潤細胞数の減少を認めなかった。

両 GVHD 誘発マウス群の腸間膜リンパ節におけるサイトカイン発現量を QRT-PCR にて定量したところ、両 GVHD 誘発マウス群とも移植第 12 日には IFN- γ 発現量の著明な上昇、および IL-4 の発現低下を認めた。IFN- γ 発現量は両 GVHD マウス群で有意差を認めなかったが、IL-4 は Allo-p38 $\alpha^{+/-}$ 群で有意な発現低下をみた。また IL-12 と IL-18 の発現量も、移植第 12 日に Allo-WT 群で有意な上昇を認めたが、これらの発現量の上昇は Allo-p38 $\alpha^{+/-}$ 群で有意に抑制されていた。

移植第 21 日に両 GVHD 誘発マウス群から IEL を回収して、*in vitro* 培養下における生存率の検討をしたところ、48 時間培養後の Allo-p38 $\alpha^{+/-}$ 由来 IEL は WT 由来 IEL に比して有意な生存率の上昇を認めた。

移植第 21 日の腸管組織中の TNF- α 発現量を ELISA 法にて定量したところ、Allo-p38 $\alpha^{+/-}$ 群では Allo-WT 群に比して有意な TNF- α 濃度の上昇を認めた。両 GVHD 誘発マウス群から経時的に回収した IEL における TNF- α 発現量を QRT-PCR にて定量したところ、TNF- α 発現量は経時的に増加傾向にあることが示され、Allo-p38 $\alpha^{+/-}$ 由来 IEL では、特に移植後 12 日以降において Allo-WT 群に比しても有意に上昇していることが示された。

考察

本研究は、ドナー細胞の p38 α 低発現が、マウス GVHD 腸炎の臨床的、病理的重症度の増悪をひきおこすことを示した初めての報告である。

腸間膜リンパ節の検討からは、p38 α 低発現がドナー由来リンパ球数の減少に寄与することが示された。既報の如く p38 α が IL-12p40 や IL-18 といった Th1 系サイトカイン発現を制御していることが、本検討で用いられた GVHD 腸炎モデルにおいても確認され、これらサイトカインの発現量の減少が、GVH 反応に伴う活性リンパ球数の増殖抑制に寄与している可能性が考えられた。一方で腸管組織においては、p38 α 低発現がドナー由来 IEL の浸潤遷延をひきおこす可能性が示唆された。IEL の *in vitro* 培養の検討から、p38 α 低発現は IEL の生存率の上昇をもたらすことが示された。p38 が T 細胞の中でも特に CD8 陽性 T 細胞に特異的にアポトーシスを誘導して、細胞生存に重要な役割を持っていることが既に報告されている。IEL の大半が CD8 陽性細胞で構成されていることを考え合わせると、p38 α が GVHD 腸炎で浸潤した IEL において

も生存シグナルを負に制御する役割を果たしている可能性が考えられ、p38 α 発現低下による GVHD 腸炎でのドナー由来 IEL の浸潤遷延、さらには腸管組織障害の増悪を部分的に説明し得る現象と考えられた。

p38 α ^{+/-} 移植 GVHD 誘発マウス群の腸管組織中 TNF- α 濃度も、WT 移植群に比して有意な上昇を認めた。GVHD 腸炎において抗 TNF 療法がその重症度を軽減することは既に報告されており、TNF- α は GVHD 腸炎の増悪にかかわる主要なサイトカインのひとつと考えられている。TNF- α は、さらに回収したドナー由来浸潤 IEL においても p38 α ^{+/-} 移植 GVHD 誘発マウス群で有意に発現量が上昇していた。p38 α は GVHD 腸炎において TNF- α を負に制御することで、抗炎症的に作用している可能性も考えられた。

結語

マウス急性 GVHD モデルを用いた本研究の結果から、ドナー移植細胞の p38 α 発現低下が臨床的あるいは病理学的な腸炎の増悪をもたらすことが示された。p38 α 低発現は GVH 反応に伴う IL-12p40 や IL-18 の上昇を抑制し、ドナー由来 CD4 および CD8 リンパ球数の減少に寄与するが、一方で宿主腸管組織では IEL の浸潤遷延を認め、TNF- α 発現も上昇しており、p38 α 減少に伴う GVHD 腸炎の増悪の一因と推察された。現在 p38 は分子標的治療の候補の一つとしてその抗炎症作用が期待されているが、本研究の結果からは、p38 α は GVHD 腸炎の進展・増悪に対しては単に炎症反応を誘導・促進するのみならず、抗炎症作用としての役割を併せ持っている可能性が示され、疾患によって p38 α の抑制による抗炎症効果が一様に表現されないことが示唆された。