

博士(医学) 林 下 尚 之

学位論文題名

肝 graft - versus - host disease における接着分子の発現

学位論文内容の要旨

目的

同種骨髄移植は造血器悪性腫瘍等に対する治療法として進歩、発展を遂げてきた。一方、その合併症として graft-versus-host disease(GVHD)があり、その発症機序について詳細な検討が望まれている。

GVHDの標的臓器として主に皮膚、消化管、肝臓などがある。今回、骨髄キメラマウスを作成し、これに脾細胞を混入させることにより強力なGVHDを誘導し、肝におけるGVHDの病態と接着分子の発現との関係を検討し、さらに recombinant mouseTNF α (rmTNF) を骨髄キメラマウスに投与して肝におけるGVHDに対するサイトカインの影響を検討した。

方法

1] 材料

6週齢の specific pathogen free(SPF) の BALB/c、C3H/He の雄性マウスを用いた。

2] 実験モデルの作成

880cGy の放射線照射をした C3H/He に BALB/c の骨髄細胞 1×10^7 個を 2mM L-glutamine、100units/ml penicillin、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin 含有、FCS を含まぬ培養液に浮遊し、その静注により骨髄キメラマウスを作成した。その際に、骨髄細胞に対し脾細胞を 1:1 または 1:1/2 の割合で添加した群 (SP/BM 群) と、移植後 1 日目から 12 日目まで 100U/mouse の rmTNF α を腹腔内投与する群 (rmTNF α 群) 、移植後 1 日目から 12 日目まで PBS を腹腔内投与する (PBS 群) の 3 群に分け、PBS 群を全体の対照とした。

3] 細胞学的検討

骨髄移植後 14 日目に各群から肝臓を摘出し、以下の検討を行った。

1) 光顯的観察

通常の病理組織標本は10%ホルマリン磷酸緩衝液にて固定の後、パラフィン包埋後薄切しヘマトキシリン-エオジン染色をし、光学顕微鏡で観察した。

2) 免疫組織化学的検討

4%PLP固定液で固定後、凍結薄切切片を作製し間接酵素抗体法を用いた。

a) リンパ球の性状

一次抗体は、ラット由来の抗Thy1.2抗体、抗L3T4抗体と抗Lyt2抗体を用い、二次抗体としてはペルオキシダーゼ標識された山羊の抗ラットIgG抗体を用いた。3,3'-Di-aminobenzide Tetrahydrochloride (DAB) にて発色し、1%メチルグリーンで核染色をした。光学顕微鏡下に、1視野内のリンパ球数、陽性細胞数ならびにその陽性率を比較した。

b) 接着分子の発現

ハムスター由来の抗マウスintercellular adhesion molecule-1(ICAM-1)抗体、ラット由来の抗マウスleukocyte function associated antigen-1(LFA-1)抗体、ラット由来の抗マウスcluster of differentiation-44(CD44)を用い、二次抗体としてはそれぞれペルオキシダーゼ標識された山羊由来の抗ハムスターIgG抗体、抗ラットIgG抗体を用い、DAB発色と核染色を同様に行った。

3) 電子顕微鏡による観察

肝を細切の後、2%グルタールアルデヒド固定、1%四酸化オスミウム後固定、さらに1%酢酸ウラン磷酸液で電子染色を行い、アルコール系列による脱水の後、Epon812に包埋した。薄切後、クエン酸鉛で染色を行い、透過型電子顕微鏡にて観察した。

4) 血液生化学検査

肝摘出時に採血を行い、glutamic-oxaloacetic transaminase(GOT)、glutamic-pyruvic transaminase(GPT)とlactate dehydrogenase (LDH)について測定した。

結果

1.光顯所見

SP/BM群では小葉間胆管周囲にリンパ球浸潤を認め、小葉内に散在性、一部巣状のリンパ球浸潤がみられ、肝細胞の壊死、脱落を認めた。rmTNF α 群では小葉間胆管周囲にリンパ球浸潤を認めず、小葉内にはマクロファージが散在性、一部巣状にみられたが、肝細胞の壊死、脱落は著明ではなかった。PBS群では小葉間胆管周囲、小葉内にリンパ球浸潤を認めなかった。

2.免疫組織化学的所見

a)肝組織内のリンパ球の性状について

SP/BM群において、PBS群と比較し、リンパ球数の増加とThy1.2,L3T4、およびLyt2の陽性細胞数の増加をみたが、陽性率に差はなかった。rmTNF α 群ではリンパ球数、陽性細胞数、陽性率にPBS群との間に差はなかった。

b) 肝における接着分子の発現

ICAM-1は、PBS群では類洞内皮細胞に弱くその発現をみ、SP/BM群では類洞内皮細胞に強くその発現をみ、小葉内の肝細胞壊死、脱落を伴うリンパ球浸潤部にもその発現が認められ、rmTNF α 群では類洞内皮細胞にその発現が強く認められた。小葉間胆管上皮にはICAM-1の発現は全ての群において認められなかった。

LFA-1とCD44とはほぼ同様の発現をみた。すなわち、PBS群ではマクロファージを中心にリンパ球も含めてその発現がみられ、SP/BM群ではリンパ球とマクロファージを主体に、それらを発現する細胞の増加を認め、rmTNF α 群ではマクロファージを主体にそれらを発現する細胞の増加が認められた。

3.電顕所見

SP/BM群では小葉間胆管の胆管上皮下へのリンパ球浸潤、胆管上皮の圧排、胞体の空胞化、絨毛の消失が認められた。小葉内ではリンパ球は類洞内で類洞内皮細胞や肝細胞と接していた。さらに肝細胞表面の絨毛の消失や胞体の

sheddingを認めた。rmTNF α 群では小葉内では類洞内に増大したマクロファージが認められ、類洞内皮細胞と接し、活性化したマクロファージが肝細胞と接している所見も認められた。

4.血液生化学検査

SP/BM群ではGOT、GPT、LDHは他の2群に比較して上昇していた。rmTNF α 群はPBS群と比較して、LDHの上昇が認められた。

考察

今回の研究では、脾細胞を混入させることにより強力にGVHDを誘導した骨髓キメラマウスにおいて肝ではリンパ球浸潤、肝細胞の壊死脱落、胆管上皮細胞の変性などがみられた。接着分子は浸潤リンパ球、マクロファージにLFA-1、CD44の発現を認め、類洞内皮細胞にICAM-1の発現の増強を認めた。この結果は肝GVHDにおいて接着分子の発現がその病態に深く関わっていることを示唆した。一方、TNF α の投与を受けた骨髓キメラマウスにおいて肝ではマクロファージの増加をみたが、明らかな肝細胞の壊死脱落、胆管上皮の

変性は認められなかった。接着分子はマクロファージを中心にLFA-1、CD44の発現をみ、類洞内皮細胞にICAM-1の発現の増強を認めた。この他にさらなる増悪因子が活性化されるとGVHDが顕性化すると考えられる。

したがって、今回の結果から、GVHDにおける接着分子の果たす役割の重要性が示唆され、その発現抑制または機能抑制はGVHDの発症予防、治療に有用であることが示唆された。

結語

重篤な肝GVHDにおいては接着分子の発現が病態に深く関わることが示唆された。一方、TNF α は接着分子の発現を通じて肝GVHDに関与することが示唆されたが、それのみでは強い肝GVHDをもたらさなかった。

学位論文審査の要旨

主査 教授 宮崎 保
副査 教授 小野江 和則
副査 教授 皆川 知紀

学位論文題名

肝 graft-versus-host disease における接着分子の発現

目的

同種骨髄移植の合併症としてGVHDがあり、その発症機序について詳細な検討が望まれている。今回、骨髄キメラマウスを作成し、これに脾細胞を混入させることにより強力なGVHDを誘導し、肝GVHDの病態と接着分子の発現との関係を検討し、さらに recombinant mouse TNF α (rmTNF α)を骨髄キメラマウスに投与して肝GVHDに対する影響を検討した。

方法

1] 材料

6週齢の specific pathogen free の BALB/c、C3H/He の雄性マウスを用いた。

2] 実験モデルの作成

880 cGy の放射線照射をした C3H/He に BALB/c の骨髄細胞 1×10^7 個を静注することにより骨髄キメラマウスを作成した。その際に、骨髄細胞に対し脾細胞を 1:1 または 1:1/2 の割合で添加した群 (SP/BM 群) と、移植後 1 日目から 12 日目まで 100 U の rmTNF α を腹腔内投与する群 (rmTNF α 群)、移植後 1 日目から 12 日目まで PBS を腹腔内投与する群 (PBS 群) に分け、PBS 群を全体の対照とした。

3] 組織学的検討

骨髄移植後 14 日目に各群から肝臓を摘出し、以下の検討を行った。

1) 光顯的観察

ホルマリン固定、パラフィン包埋後、薄切しへマトキシリン-エオジン染色にて観察した。

2) 免疫組織化学的検討

PLP 固定後、凍結薄切切片を作製し間接酵素抗体法を用いた。

a) リンパ球の性状

一次抗体は、ラット抗 Thy1.2 抗体、抗 L3T4 抗体と抗 Lyt2 抗体を、二次抗体はペルオキシダーゼ標識山羊抗ラット IgG 抗体を用いた。光学顕微鏡下に、1 視野内のリンパ球の陽性率を比較、検討した。

b) 接着分子の発現

ハムスター抗マウス intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) 抗体、ラット抗マウス leukocyte function associated antigen-1 (LFA-1) 抗体、ラット抗マウス cluster of differentiation-44 (CD44) 抗体を用い、二次抗体としてはペルオキシダーゼ標識山羊抗ハムスター IgG 抗体、抗ラット IgG 抗

体を用いた。

3) 電子顕微鏡による観察

グルタールアルデヒド、四酸化オスミウム固定、アルコール系列による脱水の後、樹脂包埋し、薄切後、透過型電子顕微鏡で観察した。

結果

1. 光顕所見

SP / BM 群では小葉間胆管周囲にリンパ球浸潤を認め、小葉内に散在性、一部巣状のリンパ球浸潤がみられ、肝細胞の壊死、脱落を認めた。rmTNF α 群では小葉間胆管周囲にリンパ球浸潤を認めず、小葉内に増大したマクロファージが散在性にみられたが、明らかな肝細胞の壊死、脱落はみられなかった。

2. 免疫組織化学的所見

a) 肝組織内のリンパ球の性状

それぞれの3群において Thy1.2、L3T4、Lyt2 の陽性率には有意の差を認めなかった。

b) 接着分子の発現

ICAM-1 は、PBS群では類洞内皮細胞に弱くその発現をみ、SP/BM群では類洞内皮細胞に強くその発現をみ、rmTNF α 群では類洞内皮細胞にその発現が強く認められた。小葉間胆管上皮にはICAM-1 の発現を全ての群において認めなかった。

PBS 群ではマクロファージを中心にリンパ球も含めて LFA-1 および CD44 の発現がみられ、SP / BM 群ではリンパ球とマクロファージを主体に、それらを発現する細胞の増加を認め、rmTNF α 群ではマクロファージを主体にそれらを発現する細胞の増加が認められた。

3. 電顕所見

SP / BM 群ではリンパ球は類洞内で類洞内皮細胞や肝細胞と接し、肝細胞の変性所見を認めた。rmTNF α 群では類洞内に増大したマクロファージをみ、類洞内皮細胞や肝細胞と接している所見が認められた。

考察および結語

1. SP / BM 群において肝細胞の壊死脱落を認め、類洞内皮細胞に ICAM-1 の発現をみ、浸潤リンパ球を中心に LFA-1 および CD44 の発現をみた。

2. rmTNF α 群において明らかな肝細胞の壊死脱落は認められなかった。類洞内皮細胞に ICAM-1 の発現の増強を認め、増加したマクロファージを中心に LFA-1、CD44 の発現がみられた。

これらの検討の結果、肝 GVHD の病態と接着分子の発現とが密接な関係にあることが示唆された。一方、TNF α の投与により接着分子の発現の増強ならびに発現細胞の増加はみられたものの、GVHDが顯在化しなかったことは、GVHDの顯在化には TNF α だけではなく、さらに他の因子の存在することが必要であることが示唆された。

以上より、本研究は博士（医学）の学位論文として妥当なものと判断される。