

学位論文題名

骨髄移植キメラマウスモデルの急性移植片対宿主病に
おけるマクロファージ遊走阻止因子の影響

学位論文内容の要旨

【緒言】

同種造血幹細胞移植における移植片対宿主病 (graft-versus-host disease:GVHD) は患者の生命予後に関わる合併症の一つであり、発症機序は腸管などの標的臓器において、ドナーT細胞がレシピエントに特異的に存在する抗原に対する免疫応答を契機として、T細胞、単球およびマクロファージ等から種々の炎症性サイトカインが産生されドナー由来T細胞が活性化され臓器障害を引き起こすものと考えられている。マクロファージ遊走阻止因子(Macrophage migration inhibitory factor:MIF) はT細胞及びマクロファージなど種々の細胞に広く発現しており、炎症反応、免疫応答や細胞の分化・増殖能促進作用など多岐多彩な作用を持つサイトカインである。これまで骨髄移植においても同種免疫反応の出現部位に浸潤しているマクロファージやT細胞が局所的にMIFを産生していることが報告されており、GVHDの発症において重要な役割を果たしていることが示唆されるが、不明な点も多い。本研究では骨髄移植キメラマウスモデルにおいて、MIFノックアウトマウスを用いて骨髄移植後の急性GVHDにおけるMIFの影響を検討したので報告する。

【材料と方法】

1. 実験動物

実験にはともに雌の8-16週齢で野生型C57BL/6N、野生型BALB/c及びBALB/cを背景にMIF遺伝子をノックアウトしたマウス(MIF KO)を使用した。MIF KOマウスは成長及び発達も野生型と同じであり、臓器障害も認められなかった。実験は北海道大学医学部動物実験施設に関する指針に従って行った。

2. 同種骨髄移植法

レシピエントがBALB/c野生型及びMIF KOマウスの場合には、前処置として全身放射線照射(TBI)を8.0Gy、C57BL/6N野生型の場合にはTBI 10.0Gyを照射し、照射後24時間以内にドナー細胞を尾静脈注射した。移植骨髄細胞数はすべてのマウスで 1×10^7 の骨髄細胞を移植したが、脾臓細胞の輸注数は、レシピエントがBALB/c野生型及びMIF KOマウスの場合には 2×10^6 を、C57BL/6N野生型の場合には 1×10^7 を輸注した。ドナー細胞の生着確認はレシピエントがBALB/c野生型及びMIF KOマウスの場合にはH-2K^b陽性細胞を、C57BL/6N野生型の場合にはH-2K^d陽性細胞をフローサイトメトリー法にて測定した。臨床的GVHDの評価方法はCookeらにより提唱されたスコアリングシステムを用いて行った。尚、血清MIF濃度測定はMIF特異的抗体を用いてELISA法で行った。

3. フローサイトメトリー法

移植前および移植後の脾臓細胞分画測定はFITC結合抗ラットIgG_{2b}, κ, FITC結合抗H-2K^b, FITC結合抗H-2K^d及びFITC結合抗CD3, PE結合抗CD4, PE結合抗CD8, PE結合抗NK1.1抗体(全てBD Biosciences, San Jose, CA)を用い、FACSキャリブラー(Becton Dickinson, San Jose, CA)で解析しCell Quest (BD Biosciences, San Jose, CA)で行った。

5.統計学的検討

生存曲線は Kaplan-Meier 法を用いて解析した。血清 MIF 濃度及びキメリズム等の細胞表面抗原解析には Mann Whitney U test または t 検定を用い、 $p < 0.05$ を統計学的有意差とした。

【結果】

- 1) フローサイトメトリー法を用いて BALB/c 野生型と MIF KO マウスにおける脾臓細胞の T 細胞分画 ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$) 及び NK 細胞分画 (NK1.1⁺) の測定を行った結果、MIF KO マウスにおける各細胞亜分画は野生型と明らかな有意差を認めなかった。
- 2) レシピエントにおける MIF の影響を BALB/c 野生型及び MIF KO マウスをレシピエントに用いて検討した。このレシピエントマウスにおける MIF の GVHD 重症度及び生存率における影響は、同種移植で脾臓細胞を輸注された群でどちらも同様の GVHD 重症度と生存率を呈していることから、有意な影響がないものと考えられた。血清 MIF 濃度は MIF KO マウスをレシピエントとした同種及び同系移植群 (骨髄移植群及び骨髄+脾臓細胞移植群) で移植前値と移植 1 週間後には他の移植系に比較して有意に低値を示したものの、移植 2 週間後には有意差を認めなかった。キメリズム解析では移植後 7 日目には全ての同種移植系で完全キメラ型 (ドナータイプ 90%以上) であった。
- 3) ドナー由来の MIF 産生細胞が移植された場合の急性 GVHD の発症への影響を BALB/c 野生型及び MIF KO マウスをドナーとして検討した結果、脾臓細胞を移植された実験系において生存率では有意差は認めなかったが、GVHD スコアに関しては GVHD スコアが低い傾向であった。しかし、血清 MIF 濃度に関しては両群で有意差は認められなかった。キメリズム解析では移植後 7 日目では MIF KO マウスから骨髄を移植された群のキメリズムが 78.3% と他の移植群に比較して低かったが、移植後 14 日目には全ての移植群で完全キメラ型であった。

【考察】

レシピエントが野生型及び MIF KO マウスである場合には MIF の急性 GVHD に対する影響は認められなかった。また、MIF KO マウスをレシピエントとした場合、移植 1 週間後の血清 MIF はほとんど検出されなかったものの、その時点では骨髄のみ移植した群と骨髄と脾臓細胞を移植した群の両方とも急性 GVHD は認められず、この実験系では MIF の関与を見出すことはできなかった。MIF KO マウスをレシピエントとした移植群では、移植 2 週間後には血清 MIF 濃度の増加が認められたが、これは移植されたドナー由来の種々の細胞がレシピエントにおいて MIF を産生し得ることを示唆している。

一方、ドナーに MIF KO マウス由来の造血幹細胞及び脾臓細胞を使用した実験移植群では、急性 GVHD は BALB/c 野生型をドナーとした群と比較すると生存率では有意差を認めないものの、GVHD スコアは BALB/c 野生型より低かった。これはドナーにおける MIF の発現が急性 GVHD に生存率で寄与できるほどの影響ではないが、何らかの影響を与えている可能性がある。これを検証するためには今後実験動物数を増やして検証を行う必要があると考える。血清 MIF 濃度においては野生型及び MIF KO マウスをドナーにした移植群では、同系及び同種移植でも有意差は認めなかった。したがって、持続的な MIF の低下を誘導できる実験系、すなわち MIF KO マウス同士の同種移植系を構築することや安定した力価の抗 MIF 抗体を利用する必要性があり、これらを使用して、血清 MIF 濃度を完全に抑制することができたならば、かなり正確な相関関係を導き出せ得る可能性があるものと考えられた。

【結語】

1. レシピエントを MIF KO マウスにして実験を行った場合は野生型と比較して MIF と急性 GVHD 発症との関連は少ないと考えられた。
2. ドナーを MIF KO マウスにした場合、骨髄細胞のみ移植すると移植後早期のキメリズムの回復が脾臓細胞を移植した場合に比較して有意に遅れた。

- ドナーを MIF KO マウスにした場合に骨髄細胞と脾臓細胞を一緒に輸注すると BALB/c 野生型を用いた同様の実験と比較すると生存率には寄与しないが、移植後早期の急性 GVHD を軽減する可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 秋 田 弘 俊

副 査 教 授 小 野 江 和 則

副 査 教 授 今 村 雅 寛

学 位 論 文 題 名

骨髄移植キメラマウスモデルの急性移植片対宿主病におけるマクロファージ遊走阻止因子の影響

マクロファージ遊走阻止因子(Macrophage migration inhibitory factor: MIF)はT細胞及びマクロファージなど種々の細胞に広く発現しており、炎症反応、免疫応答や細胞の分化・増殖能促進作用など多岐多彩な作用を持つサイトカインである。これまで骨髄移植においても同種免疫反応の出現部位に浸潤しているマクロファージやT細胞が局所的にMIFを産生していることが報告されており、移植片対宿主病(graft-versus-host-disease: GVHD)の発症において重要な役割を果たしていることが示唆されるが、不明な点も多い。申請者は本研究において、骨髄移植キメラマウスモデルを作成し、MIFノックアウト(MIF KO)マウスを用いて骨髄移植後の急性GVHDにおけるMIFの影響を検討した。

実験にはともに雌の8-16週齢で野生型C57BL/6N、野生型BALB/c及びBALB/cを背景にMIF遺伝子をノックアウトしたマウスを使用した。レシピエントがBALB/c野生型及びMIF KOマウスの場合には、前処置として全身放射線照射(TBI)を8.0Gy、C57BL/6N野生型の場合にはTBI 10.0Gyを照射し、照射後24時間以内にドナー細胞を尾静脈注射した。移植骨髄細胞数はすべてのマウスで 1×10^7 個の骨髄細胞を移植したが、脾臓細胞の輸注数は、レシピエントがBALB/c野生型及びMIF KOマウスの場合には 2×10^6 個を、C57BL/6N野生型の場合には 1×10^7 個を輸注した。臨床的GVHDの評価方法はCookeらにより提唱されたスコアリングシステムを用いて行った。尚、血清MIF値測定はMIF特異的抗体を用いてELISA法で行った。ドナーをC57BL/6N野生型、レシピエントをBALB/c野生型及びMIF KOマウスを用いて移植実験を行った結果、骨髄細胞のほかに脾細胞を移植されると双方のGVHDスコア、肝臓組織及び生存曲線に明らかなGVHDが認められた。尚、血清MIF値はMIF KOレシピエントで移植前及び移植1週間後において有意に野生型に比べて低いものの、2週間後には回復を認めたことより、レシピエントにおけるMIFの存在はGVHDに大きな影響を与えていないことが示唆された。一方、ドナーをBALB/c野生型及びMIF KOマウス、レシピエントをC57BL/6N野生型を用いて移植実験を行った結果、GVHDスコア及び生存曲線においてはドナーをMIF KOマウスにして骨髄細胞と脾細胞を移植した群では、BALB/c野生型の同群と比較して有意に移植後早期のGVHDスコアの

低下を認めた。また、肝臓組織上も GVHD の軽減が認められ、MIF KO マウスをドナーにした場合には MIF 陰性のリンパ球浸潤が認められた。しかし、生存曲線及び血清 MIF 値においては有意差を認めなかった。したがって、局所の免疫担当細胞におけるドナー由来の MIF が GVHD の発症に関与している可能性が示唆された。

公開発表にあたって、副査小野江和則教授から、本実験における C57BL/6N マウスを選択した理由、造血細胞以外の主な MIF の産生細胞、ドナーが MIF KO マウスの場合には GVHD 抑制効果があるのに、レシピエントを MIF KO マウスにした場合に血清 MIF 値は低値であるにもかかわらず、GVHD 抑制効果を認めない点、MIF の炎症促進因子としての可能性についての質問があった。申請者は、C57BL/6N マウスは通常頻用されていること、MIF は造血細胞以外にも肺胞上皮や肝細胞及び下垂体前葉で多いこと、レシピエントを MIF KO マウスにした場合でも GVHD が重症化したのはドナー由来の MIF 産生が亢進するとともに、GVHD の重症度には血清値よりも局所の発現が重要であること、MIF は炎症促進因子となり得ると回答した。次いで、副査今村雅寛教授より局所と全身の MIF 値の差が GVHD に及ぼす影響、マウス移植実験での局所の MIF 発現程度と GVHD との関係、接着分子以外の組織障害に関与する因子、移植モデルにおける GVHD 出現の差異、免疫抑制剤と血清 MIF 値との関連についての質問があった。申請者は、既報の論文を参考に全身の MIF 値が必ずしも GVHD の重症度に反映せず、むしろ局所の濃度が重要であること、マウスの移植モデルにおける報告はなく、ヒトの場合と同様に局所での発現が大きな要因になり得ること、TNF- α 等のサイトカインも組織障害に関与している可能性があること、MHC を一致させた実験系で行った場合には MIF の影響をより明確にできる可能性があること、および申請者はヒトの検体での MIF の測定も試みたが、免疫抑制剤による差を認めなかったことについて回答した。最後に、主査秋田弘俊教授より、MIF KO マウスをドナーとして移植した場合の肝臓組織の破壊機序、MIF KO マウスを移植した場合の生着、GVHD の病理組織における MIF 免疫染色での細胞内の MIF の局在、今後の臨床応用の可能性についての質問があった。申請者は、MIF により上皮細胞の ICAM-1 や VCAM-1 が発現亢進し炎症が惹起されることから、MIF KO マウスのリンパ球を移植した場合にはそれらの接着分子の発現が低下する可能性があること、生着は MIF KO マウスの骨髓細胞のみ移植した場合には遅れ、その理由として MIF が細胞増殖に関与していること、浸潤リンパ球には細胞質及び細胞核のそれぞれに MIF が局在している細胞があること、抗 MIF 抗体の投与により GVHD を軽減できる可能性があることを回答した。

本研究は、MIF KO マウスをドナーに用いた移植実験により、局所の免疫担当細胞におけるドナー由来の MIF が GVHD の発症に関与している可能性を示唆し、MIF を抑制することで新たな GVHD 治療の可能性が期待されることを明らかにした。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。