

論文の内容の要旨

1. 目的

急性移植片対宿主病 (GVHD) は同種造血幹細胞移植(Allogenic hematopoietic stem cell transplantaion: allo-HSCT)後の非再発死亡の主要因であり改善が必要である。急性 GVHD の病態への Toll-like receptor (TLR)や Nod-like receptor(NLR)等の自然免疫の関与が注目されている。自然免疫を司るマクロファージ(MΦ)は生体内で様々な活性化状態にある。単球からサイトカイン刺激により様々な活性化状態の MΦを誘導できることが知られており、これらのサイトカインと GVHD との関連が報告されていることから、MΦの活性化状態が急性 GVHD の病態に関与する可能性が示唆されるが、ヒト allo-HSCT の MΦの活性化状態と急性 GVHD との関連の詳細は不明である。本研究の目的は、ヒト単球よりサイトカインで誘導した MΦの遺伝子発現プロファイルをもとに各 MΦの機能について解析し、さらにヒト allo-HSCT 環境下の単球遺伝子発現プロファイルより、単球の活性化状態と急性 GVHD の病態との関連を明らかにするものである。

2. サイトカイン誘導 MΦモデルと allo-HSCT 患者単球の遺伝子発現プロファイル

1-1 研究材料と方法

健康人被験者 4 名の末梢血単球から IL-32γ および GM-CSF 添加により炎症性 MΦモデル(IL-32-MΦ, GM-MΦ)を、M-CSF および IL-34 添加により抗炎症性 MΦモデル(M-MΦ, IL-34-MΦ)を作成した。

2010 年 11 月から 2012 年 9 月の間に当科で allo-HSCT を施行した 9 名から移植幹細胞生着後に末梢血単球を採取した。

単球から分離した total RNA より Cy3 標識二重鎖 cDNA プローブを作成し、マイクロアレイにハイブリダイズ後スキャンし、GeneSpring および Gene set enrichment anaysis(GSEA)を用いて解析した。

1-2 サイトカイン誘導 MΦモデルの遺伝子発現変化

階層的クラスタリング解析により IL-32-MΦは M-MΦおよび IL-34-MΦから離れた遺伝子発現プロファイルを示し、GM-MΦは中間のプロファイルを示した。GSEA によるパスウェイ解析では、IL-32-MΦにおいて TLR および NLR signaling pathway が、NF-kappa-B,ERK,p38MAPK の発現の増加と、その下流での IL-8 等の炎症性サイトカインの発現増加を伴って enrich された。

1-3 Allo-HSCT 患者単球の遺伝子発現変化

Allo-HSCT 患者単球の遺伝子発現は TLR および NLR signaling pathway に含まれる遺伝子における階層的クラスタリング解析により、急性 GVHD の発症の有無でクラスタリングされた。急性 GVHD 発症患者単球では NF-kappa-B および MAPK signaling pathway に必須の kinase である TAK1 および炎症性サイトカインの発現の増加を認めた。単球における TAK1 の発現増加は、NF-kappa-B および MAPK signaling pathway の活性化、炎症

性サイトカインの産生亢進を通じて急性 GVHD の病態に関与する可能性を見出した。

3. 単球系細胞における TAK1 の機能解析

2-1 研究材料と方法

TAK1 kinase 阻害薬 5Z-7-Oxozeaenol (OZ) を用いて TAK1 の機能解析を行った。

2-2 サイトカインアレイ

LPS 刺激による健常人単球の上清中の IL-8, IL-6, IL-1 β 等の増加は OZ により抑制された。

2-3 リアルタイム RT-PCR

健常人 3 名の LPS 刺激下单球における TNF α および TAK1 の発現は OZ により低下した。

2-4 同種リンパ球混合試験

健常人ドナー単核球を MMC 処理後レシピエント単核球と混合培養し、³H チミジンの取り込みによりドナーリンパ球の活性化を評価した。レシピエント単核球との混合培養で、ドナーリンパ球の活性化は OZ により抑制された。レシピエント単核球から単球を除くとドナーリンパ球の活性化は抑制される一方で、OZ により抑制が軽減される傾向を認めた。ドナーリンパ球の活性化はレシピエント単球に依存することが示され、レシピエント単球の TAK1 阻害によりドナーリンパ球の活性化は抑制されることが推測された。

2-5 同種樹状細胞 (DC) による T 細胞の活性化

健常人の T 細胞と DC を混合培養し、BrdU の取り込みにより T 細胞の活性化を評価した。同種 DC との混合培養により T 細胞の活性化は亢進し、OZ により抑制された。T 細胞は同種 DC により活性化されることが示され、DC の TAK1 阻害により T 細胞の活性化は抑制されることが推測された。

4. 考察

TAK1 は NF-kappa-B および MAPK signaling pathway に必須のキナーゼで NF-kappa-B や ERK 等複数のシグナル伝達経路を活性化させることが知られている。急性 GVHD 患者単球では TAK1 の発現増加により複数の炎症性経路が活性化状態にあると考えられ、TAK1 が急性 GVHD 制御の標的分子となり得る可能性を示す。

LPS 刺激により活性化したマクロファージでは TAK1 の活性はステロイドに耐性であることが報告されている。また、ステロイド耐性の皮膚、腸管急性 GVHD ではマクロファージの組織浸潤の程度が予後に相関することが報告されており、活性化マクロファージに対する TAK1 抑制が効果的である可能性を示す。

一方で、TLR リガンドによる抗原提示細胞の活性化は移植片対白血病 (GVL) 効果の増強に重要であることが報告されており、TAK1 阻害による TLR シグナルの過剰な抑制は GVL 効果の減弱をもたらす可能性もある。

5. 結論

TAK1 は急性 GVHD の制御の標的分子となりうる可能性を見出した。