

博士論文(要約)

血球貪食症候群の病態における血液線維素溶解系の

機能解析

島津 浩

論文の内容の要旨

論文題目 血球貪食症候群の病態における血液線維素溶解系の機能解析

氏名 島津 浩

血球貪食症候群(Macrophage activation syndrome/Hemophagocytic syndrome、以下 MAS と記載)は、本来ヒトを守るべき存在である T リンパ球、単球、マクロファージなどの免疫担当細胞が何らかの原因によって、異常に活性化した結果、マクロファージが自己の血球をも貪食してしまう病態として知られている。臨床においては、急激な進行から多臓器不全となり、致命的な状況を呈することが多く、しばしば治療に難渋する。このため、MAS の予後の改善には、的確な診断と早期治療介入を行うことが極めて重要である。

MAS は、高熱・肝脾腫・リンパ節腫脹などの症状に加え、汎血球減少・肝機能障害・高フェリチン血症・高トリグリセリド血症・播種性血管内凝固症候群(DIC)などの所見を特徴とし、骨髄・リンパ節・肝臓・脾臓などの組織における血球貪食像の存在により診断される。

MAS では、異常に活性化した T リンパ球、マクロファージによる炎症性サイトカインの過剰産生が、その病態形成の主要因の一つであることは明らかである。実際の MAS 患者の血中で、TNF α 、IFN- γ 、IL-1、IL-6、IL-12、IL-18、sIL-2R、FasL などの炎症性サイトカインの濃度の増加について多くの報告がある。また、こうした高サイトカイン血症に伴って、血液凝固系/血液線維素溶解系(線溶系)の異常な活性化、いわゆる DIC と呼ばれる病態を発症することが広く知られている。したがって、このような MAS の病態形成において、組織傷害の主因とも考えられる炎症性サイトカインの過剰産生状態を抑制できれば、MAS の予後の改善につながる可能性がある。

DIC では、その原因となる疾患の治療に加え、主に抗凝固療法の観点から様々な治療が実

施されている。しかし、線溶系因子の調整という観点からのアプローチは、実臨床においてはほとんど行われていない。また凝固・線溶系因子群に代表されるセリンプロテアーゼ、またはマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)などの酵素群が、サイトカインストーム—高サイトカイン血症を伴う全身性炎症性疾患の病態形成に与える影響については不明な点が多い。

そこで本研究では、MAS のような高サイトカイン血症を伴った組織傷害が誘導される疾患において、線溶系因子群がその病態形成に果たす機能の解明を主な目的とし、MAS の動物モデルの作製とその解析を進めた。

2011年にEdwardら、および2013年にOhyagiらは、TLR-9のagonistであるCpG1826をC57BL/6のマウスに投与することで、MAS様の病態が誘導できることを報告した。その機序として、CpG1826の刺激により炎症性サイトカインが放出され、その結果、赤血球系細胞にアポトーシスがもたらされ、これらの細胞表面にフォスファチジルセリン(PS)が露出し、単球由来樹状細胞のPS受容体に結合して貪食される機構を明らかにした。しかし、これらの論文でも指摘されているが、CpG1826のみの投与で誘導できるMASは、ヒトのMASと比較して、明らかに軽症であることが知られている。実際に筆者も、2011年のEdwardらの報告と同様の手法で、CpG1826(1回に $2.5\mu\text{g/g}$ 、20gのマウス1匹でCpG1826 $50\mu\text{g}$ /回)をC57BL/6マウスに複数回投与を行ったところ、これらの論文と同様にMAS様の病態を誘導できたが、各臓器の組織傷害の程度は軽症で、ヒトのMASで見られる致死かつ重症な病態とは有意な相違が認められた。そこで筆者は、ヒトのMAS病態に即した致死かつ重症MASの動物モデルの作製を試みた。

2006年にKyunらは、4-5週齢のBALB/C・C57BL/6に、CpG1826 $20\mu\text{g}$ とD-galactosamine(以下DGと記載)20mgを併用して腹腔内投与することで、致死的な急性肝障害をもたらすことを報告した。彼らは、①マウス生体内で $\text{TNF}\alpha$ ・IL-6・IL-12などの炎症性サイトカインの産生が、CpG1826単独投与と比較してCpG1826/DG併用投与群では薬剤投与12時間後でも持続していること、②TLR9陽性細胞から放出された $\text{TNF}\alpha$ が肝細胞に作用し、caspase3・8・9の活性化を介し、急性肝障害を誘導することを報告している。

そこで筆者は、これらを参考に、近交系C57BL/6の8週齢のマウスにCpG1826 $2.5\mu\text{g/g}$ にDG 0.25mg/g (20gのマウス1匹でDG 5mg /回)を併用して複数回投与し、急性肝炎様の病態から重症のMAS様の病態の誘導を試みた。その結果、このモデルでは、CpG1826単独投与よりも貧血が進行し、より重度な組織傷害(主に肝臓・骨髄)が認められ、約3週間で8-9

割のマウスが致死となった。さらに、このモデルでは、ヒトにおける MAS の診断基準である HLH-2004 の 8 項目の内、5 項目を満たすことを確認できたことから、ヒトの MAS に酷似した、重症かつ致死的な病態が誘導できているものと考えられた。

次に、この MAS モデルにおける線溶系因子群の動態を調べた。実際の MAS の患者で、DIC を併発することが知られ、線溶系の活性化が見られるが、今回作成した MAS モデルにおいても、その生体内で、plasmin および MMP-9 の活性化を認め、線溶系因子群の活性化が誘導されていることが明らかになった。

これまでの報告から、plasmin は単球/マクロファージ系の細胞・樹状細胞に作用して、TNF α 、IL-6、CCL2 などの炎症性サイトカイン/ケモカインの遺伝子発現レベルを増加させること、またこれらの細胞の組織浸潤を促進することが報告されており、plasmin が炎症反応の促進に寄与する可能性が示唆されている。

また近年の研究で、組織内の plasmin が複数の MMP の活性化に関与することが報告されている。MMP はその大半が前駆体-潜在型酵素として分泌され、plasmin や他の MMP によって生体内で活性型に変換されることによって、その機能を発揮する。先述したように MAS で上昇しているサイトカインの中で、TNF α 、FasL、sIL-2R は、数種の MMP、ADAM によって炎症性細胞の細胞膜から細胞外ドメイン分泌されることが報告されている。したがって、MAS のような病態において、線溶系因子群の活性化がこれらの炎症性サイトカインの産生に寄与する可能性は十分に考えられる。そこで筆者は、各種 MMP の活性を制御する plasmin に注目し、線溶系の活性調節を行うことによって、各種 MMP の活性阻害、および多くの炎症性サイトカインの過剰産生-サイトカインストームの抑制を試みた。

筆者は、神戸学院大学薬学部との共同研究で開発された plasmin の活性中心を阻害する作用を有する Y02 を、この MAS モデルに投与し、その病態の解析を行った。Y02 の投与により生存率の著明な改善が見られ、各組織における炎症性細胞浸潤の抑制および組織傷害の軽減が見られた。また Y02 の投与によって、plasmin の産生/活性化および MMP-9 の産生/活性化が抑制され、TNF α 、CCL2、IL-6、FasL といった炎症性サイトカインの産生が抑制されていることが明らかとなった。

筆者は、この MAS モデルを、plasmin の前駆体である plasminogen の遺伝子欠損マウス (Plg(-/-))、および MMP-9 の遺伝子欠損マウス (MMP-9(-/-)) で作製したところ、その野生型と比較して、生存率・病態の改善を認めることが判明した。また MAS モデルに tPA を追加投与したところ、生存率・病態の悪化を認めた。このことは、この MAS の病態形成にお

いて、plasminogen/plasmin/MMP-9 の連関が重要な役割を有することを示唆している。

今回の研究から、この MAS モデルにおいて、plasmin は、MMP-9 をはじめとした各種 MMP および CCL2 などのケモカインの産生、及び活性化をもたらし、炎症性細胞の動員および組織浸潤を促進すること、TNF α 、IL-6、FasL といった炎症性サイトカインの産生を促進させること、その結果組織傷害を悪化させることが明らかとなった。またこのことは、MAS のような全身性の炎症性疾患において、線溶系の活性化が、発症あるいは病態悪化のトリガーとなっている可能性を強く示唆するものである。

近年、敗血症や DIC のような病態において、凝固系の活性化が注目され、凝固系因子が炎症をさらに悪化させていることが数多く報告されている。本研究は、凝固系と密接に関連した線溶系に注目し、plasmin の活性化が炎症反応をさらに悪化させるメカニズムにつながることを明らかにした。線溶系の活性化を伴って、高サイトカイン血症および組織傷害が惹起される全身性炎症性疾患において、plasmin をはじめとした線溶系因子群が、新たな治療標的分子となる可能性が示された。