

博士論文

k-cyclin トランスジェニックマウスにおける
アルサス反応の解析

蒲澤 美代子

論文の内容の要旨

論文題目 k-cyclin トランスジェニックマウスにおけるアルサス反応の解析

氏名 蒲澤 美代子

血管炎は血管壁を標的とした炎症である。血管炎の多くは原因不明の難治性疾患で、病態形成に免疫複体の関与するアナフィラクトイド紫斑病・蕁麻疹様血管炎・本態性クリオグロブリン血症や、抗好中球細胞質抗体（ANCA）が関与する顕微鏡的多発血管炎・ウェゲナー肉芽腫症・アレルギー性肉芽腫性血管炎などの ANCA 関連血管炎などが知られている。皮膚の真皮、皮下組織には血管が豊富に存在しているため、血管炎ではしばしば皮膚に症状が出現する。紫斑、潰瘍、網状皮斑、結節などが血管炎の一般的な徴候である。病変の組織所見では、血管内および血管周囲への細胞浸潤と血管壁のフィブリノイド変性がみられ、白血球破砕性脈管炎と呼ばれる。皮膚血管炎が組織学的に診断された場合、新生物や自己免疫疾患といった全身性疾患が潜在しているか検索をする必要がある。

免疫複体沈着によって引き起こされる血管・組織傷害はⅢ型アレルギー反応と呼ばれ、さまざまな血管炎、全身性エリテマトーデス、関節リウマチなどの自己免疫疾患の病態形成に関与している。免疫複体による血管炎の動物モデルとして、抗体を局所に投与し、抗原を静脈内に投与することで抗体投与部位に反応を生じさせる逆受動アルサス反応があり、その再現性の高さから、最も頻用されている。

リンパ管は組織の間質液やタンパク質などの微小物質を血液循環に輸送する機能を持つとともに、樹状細胞などの抗原提示細胞やリンパ球をリンパ節に誘導することで、病原体や悪性腫瘍に対する免疫応答において重要な役割を果たしている。リンパ管の機能が障害されると、間質の膠質浸透圧が高くなるために間質液が貯留し、リンパ浮腫に至る。リンパ浮腫の原因として、世界的にはバンクロフト糸状虫などによるフィラリア症、先進国では悪性腫瘍またはその治療による後遺症が多いと推計されている。リンパ浮腫患者では貯留した間質液に細菌感染を来し、しばしば蜂窩織炎を繰り返す傾向がある。また慢性に経過したリンパ浮腫患者では罹患部位に脈

管肉腫（Stewart-Treves 症候群）、カポジ肉腫、リンパ腫などの悪性腫瘍を合併することもある。血管炎は、リンパ灌流障害の起きやすい下肢に病変を生じる可能性の高い難治性疾患であり、患者の QOL を著しく障害している。臨床的にリンパ浮腫と血管炎が合併することは多くはないが、少数ながらそれらの関与を示唆する報告も散見される。この事実に基づき、我々はリンパ灌流障害の免疫複合体沈着による血管炎に与える影響について解析することとした。

我々はカポジ肉腫関連ヘルペスウイルスの遺伝子である *k-cyclin* を *vascular endothelial growth factor receptor 3*（*VEGFR-3*）のプロモーターの下流に挿入したトランスジェニックマウスを作成した。*VEGFR-3* は、最初に特定されたリンパ管特異的な成長因子レセプターで、主にリンパ管内皮細胞にのみ発現している。*kCYC* トランスジェニック（*kCYC^{+/+}*）マウスはリンパ管内皮細胞特異的に *kCYC* を発現しており、臓器毎の *kCYC* の発現は *VEGFR-3* の発現と合致している。全身の浮腫、乳び胸水を呈し、*FITC-dextran* や *Evans blue dye* を注射しても、リンパ管が描出されず、また所属リンパ節が染色されないという特徴を有する。*Dynamic MRI* を用いたリンパ管造影にて胸管やリンパ節の描出が遅れること、解剖学的に胸管・リンパ節には明らかな異常はないが、リンパ管のネットワークの乱れや弁の低形成が見られたことから、*kCYC^{+/+}*マウスのフェノタイプはリンパ管の機能障害に起因していると考えられた。*kCYC* は *in vitro* でアポトーシスに関与しているとの報告があり、胎生期に *kCYC* が発現することでリンパ管形成の一部が障害されるものと推定されている。リンパ浮腫の原因には後天的なものが多いとされるが、後天的なリンパ灌流障害のモデルマウスの作成は困難であり、今回我々は、免疫複合体沈着による血管炎のモデルである皮膚逆受動アルサス反応を先天的にリンパ灌流が障害された *kCYC^{+/+}*マウスにおいて解析することで、リンパ灌流障害の血管炎に対する影響を検討することとした。

*kCYC^{+/+}*マウスで皮膚逆受動アルサス反応を惹起させたところ、浮腫は早期では野生型マウスより弱く、時間の経過につれ *kCYC^{+/+}*マウスで増強し逆転することがわかった。同様に浸潤した好中球数、マスト細胞数ともに皮膚逆受動アルサス反応早期では野生型マウスで多かったが、時間の経過につれ逆転し、*kCYC^{+/+}*マウスで多くなった。*kCYC^{+/+}*マウスでは、免疫複合体沈着による血管炎の早期の反応が減弱し、炎症が遷延することが示された。接触皮膚炎でもこのマウス

特有のリンパ灌流の障害により、炎症が遷延することが示されているが、リンパ灌流障害の状態では免疫複合体沈着による血管炎も遷延する可能性が示唆された。

次に IL-6、TNF- α 、CXCL1 および CXCL2 の mRNA の発現を検討したところ、皮膚逆アルサス反応 4 時間後の組織中の IL-6 および TNF- α 濃度は kCYC^{+/-}マウスでは野生型マウスと比して、有意に低く、これらの炎症性サイトカインの減少は炎症部位への浸潤細胞数と相関していた。また皮膚逆アルサス反応 4 時間後では、ともにマウスにおいて好中球遊走を引き起こす主要なケモカインとして知られている CXCL1 および CXCL2 の発現が kCYC^{+/-}マウスにおいて野生型マウスに比して低下していた。

CXCL1、CXCL2 は皮膚逆受動アルサス反応における免疫複合体惹起性の炎症の維持に重要であるとの報告がある。また、アルサス反応においては、マクロファージによる免疫複合体の認識が重要な役割を果たし、マクロファージは CXCL1、CXCL2 の重要な産生源であることが知られている。皮膚のマクロファージは数が少なく、回収が困難なため、安定して回収が可能な腹腔よりマクロファージを分離し、CXCL1 と CXCL2 の発現を検討したところ、腹腔マクロファージにおける CXCL1 および CXCL2 の mRNA の発現および蛋白レベルでの発現は kCYC^{+/-}マウスにおいて野生型マウスに比して低下していた。さらに、CXCL1、CXCL2 の発現は蛋白レベルでも kCYC^{+/-}マウスにおいて野生型マウスに比して低下していた。以上の結果より、kCYC^{+/-}マウスにおける早期のアルサス反応の減弱は kCYC^{+/-}マウスのマクロファージにおける CXCL1、CXCL2 の産生が低下していることによると考えたが、マクロファージとリンパ管内皮細胞の起源は同一であり、分化の段階のいずれかの時期にマクロファージにも kCYC が発現し、それが成熟したマクロファージの性質にも影響を与えているという可能性は除外できない。マクロファージの移入実験や骨髄移植実験を行い、kCYC^{+/-}マウスにおけるマクロファージの CXCL1、CXCL2 の低下の原因を明らかにすることは今後の課題としたい。

詳細なメカニズムまでは検討できなかったが、これらの結果から、kCYC^{+/-}マウスにおける早期のアルサス反応では、好中球やマスト細胞といった炎症細胞の遊走に関与する CXCL1 と CXCL2 の発現が低下していることで炎症局所への好中球の遊走が低下し、好中球やマスト細胞

の産生する、炎症性サイトカイン TNF- α 、IL-6 の発現が低下することにより、アルサス反応早期の反応が減弱する可能性が示唆された。

また免疫複合体沈着による血管炎である結節性多発動脈炎 (PN) 患者の血清中 CXCL1 および CXCL2 値を測定したところ、PN 患者において血清 CXCL1 値、血清 CXCL2 値ともに上昇し、病勢マーカーや臨床症状と相関していた。そのため、ヒトにおける免疫複合体沈着による血管炎においても、CXCL1、CXCL2 が病態に寄与している可能性があると考えられた。

免疫複合体沈着による炎症および組織傷害は血管炎や膠原病、糸球体腎炎をはじめとする多様な疾患に関与する。これらの疾患に対する治療は、現在副腎皮質ホルモンや免疫抑制剤といった選択性が低い方法が主体であり、それゆえ副腎皮質ホルモンでは感染症、高脂血症、糖尿病、高血圧、精神症状、骨粗鬆症、消化管潰瘍、シクロフォスファミド、アザチオプリンなどの免疫抑制剤では感染症、骨髄抑制、催奇形性、発癌性といった相当の有害事象を伴う。より細胞選択性が高く、有害事象が少ない治療が求められている。ケモカインは産生する組織や細胞、受容体を発現する細胞に特異性があり、有望な治療標的となりうると考えられる。今回の研究結果から、免疫複合体沈着による血管炎に対して、CXCL1 や CXCL2 を標的にすることが、新たな治療に繋がる可能性が示された。