

## 放射線障害による腸管常在性好酸球の役割

東京大学医科学研究所国際粘膜ワクチン開発研究センター自然免疫制御分野  
／千葉大学大学院医学研究院・医学部粘膜免疫学

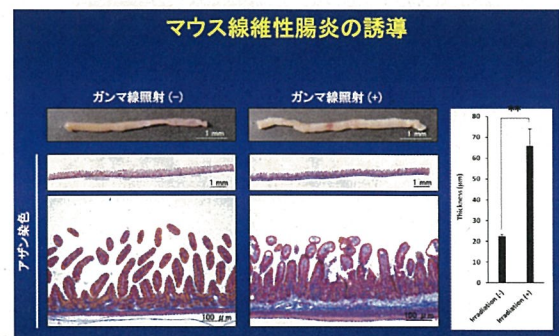
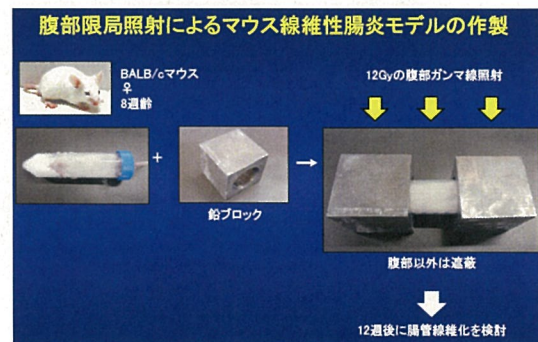
植松 智

### 1. はじめに

放射線は、その電離・励起能力によって生体細胞内のDNAを損傷させる。軽度のDNA損傷はがん抑制遺伝子p53によって修復されるが、それが不可能である場合にはDNAが損傷したまま分裂するか、もしくはp53依存的に細胞死が誘導される (Golden EB., et al. Front Oncol. 2:88, 2012)。これらの影響が蓄積・拡大することによる身体機能の低下を放射線障害という。悪性腫瘍の全身リンパ節転移や、精巣、卵巣癌の腹膜播種に対して治療目的に広範囲腹部照射をすることは多いが、目的外の部位である腸管に放射線が過剰に照射されると反復性の腸炎を起こし、線維化とそれに伴う狭窄、閉塞、穿孔などが誘導される。この患者のQOLを著しく損ねる副作用である腸管の線維化はその詳しい誘導メカニズムも分かっておらず、治療法もない状態で臨床的に解決すべき重大な問題と考えられている。放射線障害によって腸管の病態が形成されていくメカニズムにおいて、免疫応答は欠くことの出来ないものである。免疫応答は自然免疫応答と獲得免疫応答に分かれる。20世紀の終わりまで自然免疫は病原体などの異物を食するだけの非特異的の応答と考えられてきた。ところが、近年Toll-like receptor (TLR)の発見、機能解析を通じて、自然免疫の新たな役割が分かってきた (Akira S., et al. Cell. 124:783, 2006)。TLRは10数個のファミリーメンバーからなっており、細菌、真菌、原虫、ウイルス由来の成分によって活性化され、あらゆる病原体の侵入を感知する受容体として感染初期の生体防御に必須の役割を果たすだけでなく、抗原提示細胞である樹状細胞の活性化を促しその後の獲得免疫発動を制御することが分かった。さらに、自然免疫応答は炎症反応のトリガーとなって急性期の応答を担うとともに、その後の獲得免疫応答を誘導し、炎症の遷延化、慢性化にも重要な役割を果たすことが分かってきた。放射線障害における腸組織破壊では炎症は消滅しにくい傾向があり、エフェクター細胞群の活性化が持続して局所での炎症が増悪し、難治性の慢性炎症の病態を呈し、組織の重度の線維化から不可逆性の変化が起こり致死となることが多い。本研究課題は、マウスの慢性放射線腸炎モデルを用いて、炎症や組織傷害のトリガー要因として重要な「自然免疫」の観点から解析を行い、放射線による腸管の慢性炎症のメカニズムと線維化形成における腸管自然免疫細胞群の役割を明らかにし、これまで有効な治療法のなかった放射線腸障害に対する全く新しい治療戦略の開発を目指すものである。

### 2. 方法

我々は、マウスに腹部限局照射を行うことによって、人の慢性放射線性線維性腸炎をよく模倣したモデルの作成に成功した。腸管粘膜固有層には大量の好酸球が存在している。通常、好酸球は絨毛の粘膜固有層に局在しており、漿膜下の粘膜下層には殆ど認められない。ところが、 $\gamma$ 線腹部限局照射12週のBalb/Cのマウスにおいて、線維化している漿膜下の粘膜下層に好酸球の著明な浸潤が認められた。May-Grunwald Giemsa染色では、病変部の好酸球は、顆粒が白く抜けた像をしており、アレルギーの極期に血中で見られる“低密度好酸球”の形態をとっていた。電子顕微鏡での観察では、これらの好酸球は、著しく活性化し脱顆粒していることが確認された。さらに、放射線照射後の線維性腸炎でも同様の好酸球の浸潤、活性化が確認出来た。これらの結果から、好酸球が $\gamma$ 線照射後の慢性腸炎及び線維化に何らかの役割を果たすのではないかと考えた。GATA-1は未熟な骨髄系の前駆細胞から赤芽球、巨核球、好酸球への分化に必須の転写因子である。GATA-1欠損マウスは重篤な貧血のために胎生致死であるが、GATA-1の発現を正にオートレギュレーションするエンハンサーのGATA結合領域 (dblGATA) を欠損させたマウス  $\Delta$ dblGATAマウスでは、貧血の表現型はなく好酸球が特異的に消失している (Dyer K.D., et al. J. Immunol. 179:1693, 2007)。我々は、 $\Delta$ dblGATAマウスを解析の結果、腸管粘膜固有層の好酸球が完全に消失していることを確認した。興味深いことに、 $\Delta$ dblGATAマウス



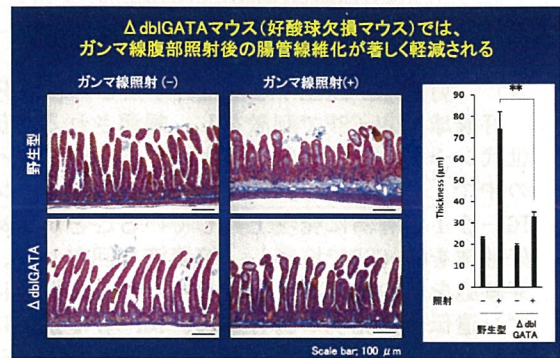
興味深いことに、 $\Delta$ dblGATAマウス

にγ線腹部限局照射を行うと、12週における線維化が著明に抑制されていることが明らかになり、放射線による線維化に好酸球が必須の役割を果たすことが分かった。放射線照射によって、通常は死なない陰窩部の細胞が定期的に細胞死を誘導していることが分かった。これらの死細胞成分によって、筋線維芽細胞が活性化され好酸球遊走因子のeotaxinを誘導し、好酸球を粘膜下層に遊走させていることが明らかになった。今後の研究計画として、マウス腹部照射モデルを用いて1) 粘膜下層に浸潤した好酸球を単離し、活性化機構を解析する。2) 好酸球が産生する液性因子及び顆粒成分における線維化促進物質の同定を行う。さらに、3) ヒト腸管好酸球の単離を行いマウスと同様に活性化実験、脱顆粒試験を検討する。

### 3. 結果

#### 1) 筋線維芽細胞の活性化機構の解析

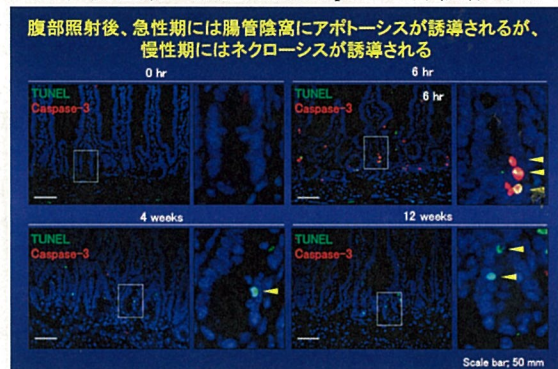
我々は、急性期だけでなく慢性期に陰窩の細胞死が起こっているのを見出した。興味深いことに、急性期の細胞死はCaspase-3依存的なアポトーシスであったが、慢性期の細胞死はCaspase-3非依存的なネクローシスであることが分かった。プレオマイシンの肺線維症モデルでは、プレオマイシンによってネクローシスを起こした細胞からATPが流出し、P2X7受容体を活性化することによって線維化を進展させることが報告されている。我々は、照射後慢性期の腸管において、細胞外ATPが有為に上昇しているのを見出した。そして、ATPによって筋線維芽細胞を刺激すると、CCL11が誘導されることがわかった。P2X7受容体欠損マウスでは、放射線照射後の線維化が有為に抑制されたことから慢性期のネクローシスを契機に遊離される細胞外のATPが線維化のトリガーになっていることが示唆された。



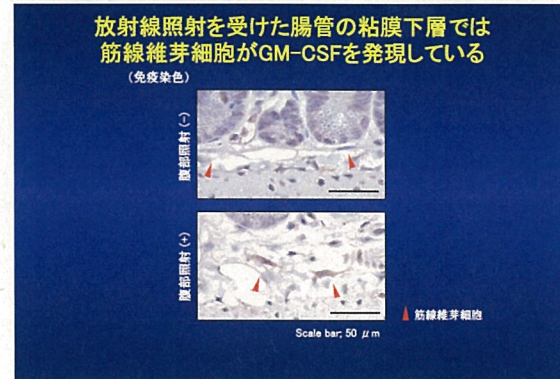
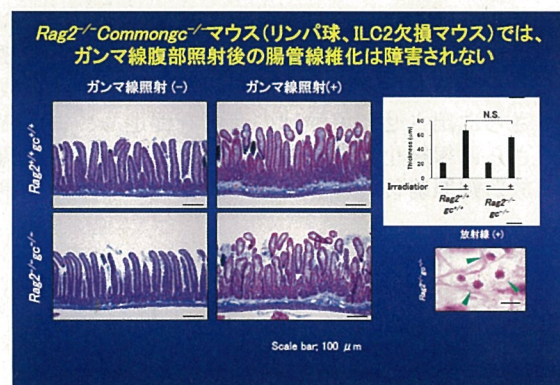
ヒト腸管好酸球の単離を行いマウスと同様に活性化

#### 2) 粘膜下層に浸潤した好酸球の活性化機構の解析

好酸球は、寄生虫感染やアレルギーにおいてTh2細胞の下流でその主要なエフェクター細胞として働く。しかしながら、リンパ球を欠損するマウスにおいても、放射線照射によって粘膜下層の線維化は野生型マウスと同様に誘導された。最近、寄生虫感染の亜急性期において、上皮細胞等から誘導されたIL-33によって活性化され、抗原非依存的にTh2サイトカインを出すことによって感染防御を行う自然リンパ球2型(ILC2)が発見された。好酸球は、ILC2の下流で働くことも報告されている。しかしながら、リンパ球もILC2も存在しないRagとCommonγの二重欠損マウスでも、放射線照射によ

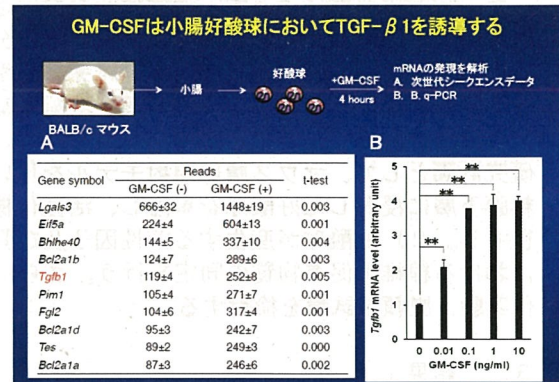


って粘膜下層の線維化は野生型マウスと同様に誘導された。そこで、我々は筋線維芽細胞が、好酸球の遊走だけでなく活性化にも関わるかを検討した。ATPで刺激をした筋線維芽細胞は好酸球活性化因子のGM-CSFとIL-33を出していた。一方、腸管から単離をした好酸球は、GM-CSF受容体を高発現していたが、IL-33の受容体であるST2は発現していなかった。実際、IL-33やST2の欠損マウスでは、野生型と同様に放射線腹部照射後の粘膜下層の線維化が誘導された。興味深いことに、放射線照射後の腸管粘膜下層では、筋線維芽細胞が特異的にGM-CSFを発現していることが免疫染色によって明らかになった。以上のことから、遊離したATPは筋線維芽細胞を活性化させ、好酸球を遊走させるだけでなくGM-CSFを誘導させ、粘膜下に浸潤した好酸球を直接活性化する作用があることが示唆された。



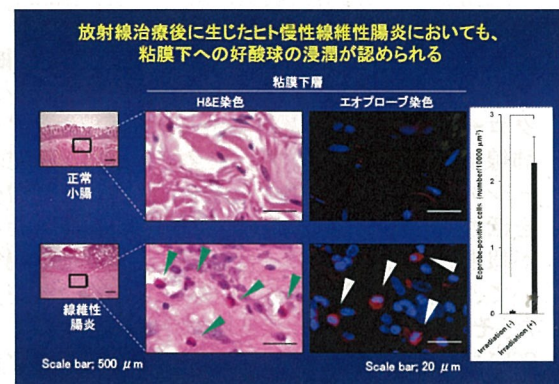
3) 好酸球が産生する液性因子及び顆粒成分における線維化促進物質の同定を行う。

好酸球をGM-CSFで刺激し、誘導される遺伝子を次世代シーケンサー解析によって網羅的に調べた。その中で、線維化の促進に必須のサイトカインであるTGF-β 1が有為に発現上昇していることが認められた。好酸球をGM-CSFで培養し、培養液を回収した。筋線維芽細胞をその培養液で培養したところ、顕著にコラーゲン遺伝子の発現が誘導され、TGF-β 1抗体によってその誘導は阻害された。以上のことからGM-CSFによって、好酸球はTGF-β 1を誘導し、線維化を促進することがわかった。さらに、好酸球をGM-CSFとエオタキシンで刺激をすると、脱顆粒することが分かった。



4) ヒト腸管好酸球の解析

ヒトの放射線治療後の線維化を起こした組織切片においても顕著な好酸球の浸潤が認められる。ヒト好酸球もGM-CSFやエオタキシンの刺激によって脱顆粒する。好酸球の顆粒として、MBP, EPX, EDN, ECPの4つのカチオンタンパク質が知られている。ヒトリコンビナントECPは筋線維芽細胞を活性化し、エオタキシンを誘導することがわかった。さらに、MMP3, 9, 13を誘導することが分かった。これらは、潜在型のTGF-β 1を活性型に変換する作用を持っている。マウスのECPも同様の作用を持っていた。以上のことから、脱顆粒成分によって、筋線維芽細胞が再刺激をされポジティブフィードバックループが形成されることが分かった。



4. 考察

以上の結果をまとめると、放射線腹部照射後、陰窩では慢性的なネクロシスが起きている。ネクロシス細胞から細胞外ATPが遊離する。細胞外ATPは、陰窩上皮細胞の直下に存在する筋線維芽細胞を活性化させる。活性化した筋線維芽細胞によって誘導されたエオタキシンは、好酸球を粘膜下層に郵送させる。さらに、活性化した筋線維芽細胞は、GM-CSFを産生し、浸潤した好酸球を活性化し、TGF-β 1を誘導させる。このTGF-β 1が筋線維芽細胞に働きかけ、コラーゲンを誘導させる。さらに、エオタキシンとGM-CSFは好酸球の脱顆粒を誘導し、顆粒成分のECPは筋線維芽細胞を再活性化させ、エオタキシンをさらに出させて好酸球の遊走を促進し、またMMP3, 9, 13を誘導し、潜在型のTGF-β 1を活性型に変換させさらに線維化を促進していく。この筋線維芽細胞と好酸球のポジティブフィードバックループの形成が、放射線照射後の粘膜下層の線維化に必須の役割を果たすことが明らかになった。

5. 発表論文、参考文献

現在、Immunityに投稿し、revise中である。