

## 論文の内容の要旨

論文題目 好酸球ケモカイン受容体の発現・機能とその制御  
- 好酸球 CXCR4 発現の新規同定 -

指導教官 山本一彦教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学 (平成9年4月 ~ 平成10年3月休学)

医学博士課程

内科学専攻

氏名 長瀬 洋之

アレルギー疾患の罹患患者数は年々増加の一途をたどり花粉症、アトピー性皮膚炎等の疾患は社会的に広く認知される問題となっている。また、難治性気管支喘息症例の治療における有効なマネジメントは模索されている最中であり、喘息死患者も未だに年 5000 人を越える現状である。これらの疾患に対する新しい治療戦略の開発は社会的要請でもある。

アレルギー性炎症は選択的な好酸球集積を一大特徴とする病態であり、その集積機構を詳細に解明することがアレルギー性炎症の新たな治療戦略の開発に直結しうる。炎症細胞の局所集積には走化性因子が重要な役割を果たしていることが知られてきた。中でも、近年白血球に対して強力な走化性を持つサイトカインであるケモカイン (chemotactic cytokine)が注目されている。

アレルギー疾患においては、エフェクター細胞である好酸球の選択的集積に関与するケモカイン/ケモカイン受容体の知見が集積してきている。本研究開始時には CCR3、CCR1、CXCR1、CXCR2 の好酸球上での発現が報告され、中でも CCR3 を介する好酸球活性化が最重要視されてきた。浸潤過程においては、CCR3 を介する刺激は好酸球に強力な一方向性遊走を誘導すると共に、接着分子受容体発現増強、血管内皮細胞への好酸球の firm adhesion の増強、transendothelial migration 等に重要であることが示されている。また、好酸球活性化の点では、スーパーオキシドの産生、顆粒蛋白の遊離を惹起する。CCR3

は好酸球の他、好塩基球や、ヒト肥満細胞の亜群 (McTC)、Th2 リンパ球にも発現が報告されている。しかし、通常状態では CCR3 は単球、好中球には発現されておらず、その発現細胞のパターンはアレルギー性炎症局所での好酸球を中心とした炎症細胞の選択的集積をケモカイン受容体の側からよく説明している。

また、CCR3 は共有型受容体であり、CCR3 リガンドとして eotaxin、eotaxin-2、eotaxin-3、MCP-2、MCP-3、MCP-4、RANTES が結合する。中でも eotaxin スーパーファミリーのみが他の受容体と結合しない CCR3 の特異的リガンドである。さらに、スーパーオキシド産生、遊走においては eotaxin スーパーファミリーが最強の活性化因子である。これらの事実は eotaxin/CCR3 が好酸球の選択的集積を特徴とするアレルギー性炎症の病態に重要な役割を果たしていることを示唆している。

好酸球の CCR3 以外のケモカイン受容体に関しては、CCR1 は CCR3 の 5%程度の発現がアレルギー性疾患あるいは喘息患者において認められるとの報告がある。また、一定の状況下での CXCR1、CXCR2 の発現と機能に関しても報告が見られる。一方でその他の新規に同定されてきたケモカイン受容体発現に関する報告は無く、好酸球集積に関与するケモカイン・ケモカイン受容体が包括的に検討されてはいなかった。事実 CCR3 の制御だけでは好酸球性炎症を完全には control できないとの知見も認められており、他のケモカイン受容体を介する好酸球活性化機構が存在する可能性があった。そこで本研究では、

第1章で、新規受容体に対応する新規に同定されてきたケモカインが機能的に好酸球遊走を誘導しうるかどうかを、新規に確立した EPO 活性定量を用いた簡便なアッセイ系を用いてリガンド側からの包括的解析を行った。その結果、分離直後の好酸球は CCR3 リガンドのみに対して遊走しうることを示した。また、Eotaxin が最強のリガンドであることを示した。また、RANTES、MCP-3 等の CCR3 と CCR1 双方に結合しうるリガンドについては、抗体による阻害実験で遊走の責任分子は CCR1 ではなく、CCR3 であることを確認した。

第2章では、受容体側からの検討を 15 種のケモカイン受容体について行った。その過程で CXCR4 mRNA が CCR3 mRNA に並んで、恒常的に好酸球で強く発現していることを見出した。また、一定の状況下で CXCR4 表面発現も誘導され、リガンドの SDF-1 は eotaxin に匹敵する遊走を誘導しえた。さらに、サイトカインによる発現制御パターンが特徴的で、Th2 サイトカインで発現は

抑制、Th1 サイトカインで増強することを見出した。これより、リガンドの SDF-1 が構築的に多くの組織に発現調節を受けることなく発現していることを考慮すると、CXCR4/SDF-1 はアレルギー性炎症局所への直接の遊走に関連するというより、非炎症部位へ係留 (anchoring) することにより生体内での homeostatic な好酸球分布に影響する可能性が考えられた。

また、ケモカインの生体内での作用はリガンド側の産生調節のみならず、受容体側の発現制御もまたケモカインの作用を規定しうると考えられが、好酸球ケモカイン受容体発現にサイトカインが与える影響に関する包括的な知見は無かった。そこで CCR3、CXCR4 を含め包括的に検討したところ、CXCR4 のみが上記のような強力な発現制御を受けていた。一方 CCR3 は構築的に発現しており、殆ど発現制御を受けていない点で対照的な結果であった。CCR3/eotaxin 系はリガンド産生レベルで、一方 CXCR4/SDF-1 系は受容体発現レベルで制御されていると考えられ、これらの生物学的影響のバランスが、好酸球分布と遊走に影響する重要なシステムであると考えられた。

さらに、CXCR4 のサイトカインによる発現調節は細胞特異的であった。好中球 CXCR4 発現調節に関する報告が無かったため、同様にサイトカインによる制御を検討したが、好酸球、リンパ球、好中球では同一のサイトカインで全く異なる CXCR4 発現調節が生じることから、CXCR4 の生体内での細胞特異的な集積への関与が示唆される結果となった。

ステロイドは全身投与下で、流血好酸球や炎症組織における好酸球を速やかに消失させることが臨床的に知られており、種々のアレルギー疾患において first-line の治療薬として有用性が認められている。ステロイドは CCR3 リガンド産生を抑制するが、好酸球ケモカイン受容体発現にいかなる影響を与えるかに関する検討はなかった。第3章では、ステロイドによる好酸球ケモカイン受容体の発現制御を検討した。グルココルチコイド処理により、臨床的に達成可能な濃度で好酸球 CXCR4 が機能変化を伴う著明な発現増強を示したが、CCR3 発現の変化はなかった。グルココルチコイドは流血中の好酸球 CXCR4 発現を増強し、非炎症組織に発現する SDF-1 への感受性を高めうる。流血中から CXCR4/SDF-1 を介して非炎症組織への好酸球流出を増加させる結果アレルギー性炎症部位への好酸球局所集積を低下させる可能性が考えられた。一方で好中球 CXCR4 発現レベルはグルココルチコイドにて殆ど影響を受けなかった。デキサメタゾンが好酸球及び好中球に異なる影響を与える結果、これらの細胞が

異なる動態をとる可能性があり、グルココルチコイドの全身投与により流血好酸球は速やかに消失するが、流血中の好中球の数が減らないという臨床的知見を説明する可能性が考えられた。

最後に In vivo では流血からの浸潤過程で局所好酸球は多彩なアレルギー性炎症細胞との相互作用により活性化を受けうる。また、サイトカイン等の微小環境により、ケモカイン受容体の発現が変化して、ケモカインの作用を変調させる可能性がある。事実マウスでは腹腔内遊走好酸球では新規にケモカイン受容体の発現が誘導されたとの定性的な報告がある。第4章では実際の最終的な炎症局面でいかなるケモカイン受容体がヒト好酸球に発現しているかを好酸球性肺疾患患者の気管支肺胞洗浄液 (BALF)より分離した好酸球について検討した。同時に同一人より採取した末梢血好酸球と BALF 好酸球での発現を比較したが、BALF 好酸球で新規受容体発現は認められず、質的な発現パターンの違いは認められなかった。また、CCR3、CXCR4 以外の既報の受容体も量的な発現変化はなく、炎症局所集積、活性化においても CCR3 の中心的な役割が想定された。CCR3、CXCR4 発現に関しては量的変化が認められ、CCR3 は BALF 好酸球で発現が低下する一方、CXCR4 は局所で発現が増加しており、リガンドに対する機能的変化も伴った。炎症局所での CCR3 発現低下は局所に存在する CCR3 リガンドへの曝露による internalization による効果が考えられた。前章までの結果から、好酸球 CXCR4 の生体内での役割を非炎症組織への baseline trafficking、および anchoring として想定し、むしろ発現を増強することで非炎症組織分布が高まると考えた。しかしながら CXCR4 発現の炎症局所での発現増強はその仮説に一石を投ずる結果となり、生体内での好酸球 CXCR4 発現の意義をさらに追求する必要があると考えられた。

Eotaxin/CCR3 システムは炎症部位への好酸球集積に直接関わる inflammatory chemokine system として考えられる。多種の CCR3 リガンドの作用を媒介する CCR3 が治療標的たりうる分子ととらえられ、現在検討が積極的に行われており臨床面への応用が期待される。一方本研究で中心的に検討した SDF-1/CXCR4 システムは homeostatic chemokine system と考えられ、非炎症組織への baseline trafficking, anchoring を通じて組織に偏在する好酸球の homeostatic な生体内分布に関与しているものと現時点では推定している。生体内での好酸球 CXCR4 の役割のさらなる解明が今後の課題と考えている。