

[別紙1]

論文の内容の要旨

論文題目 アレルギー疾患における Th2 特異的ケモカイン TARC
(thymus and activation- regulated chemokine) の発現解析

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10年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 関谷 剛

気管支喘息は変動する気道狭窄を示し、発作性の呼吸困難、喘鳴、咳などの症状を呈する疾患である。気管支喘息の根底には炎症機転が存在し、気道の炎症は気道過敏性を伴っている。一般的に炎症局所への細胞集積には骨髄から末梢への動員、内皮細胞への接着、内皮細胞間移行、遊走の一連の過程が必要である。炎症局所で産生される走化因子は特に接着反応や遊走反応に強力に関わることによって炎症細胞の組織集積を誘導することが知られている。内因性走化因子であるケモカインは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。ケモカインが種々の疾患の炎症病態の形成に重要な役割を担っているとの知見が集積しており、気管支喘息を始めとするアレルギー性疾患の病態形成についてもその関与が注目されている。例えばアレルギー性炎症の重要なエフェクターである好酸球、好塩基球は CCR (CC chemokine receptor) 3 を構築的に強く発現しており、特異的リガンドである eotaxin はアレルギー炎症時の好酸球の局所集積に働いているケモカインと考えられている。

アレルギー炎症のコントローラーである Tリンパ球の集積についても、ケモカインの関与が想定されている。ヘルパー T細胞は Th1, Th2 のサブポピュレーションに分類されるが、in vitro の結果よりアレルギーの成立には Th2 の産生するサイトカインが必要であり、例えば IL-5 は好酸球系前駆細胞に対して増殖作用を示すのみならず、成熟好酸球に対しても superoxide 産生誘導、LTC4 産生促進、遊走活性、生存延長などを示す。また Th2 サイトカインのプロトタ

イプである IL-4 は B 細胞に作用して、その IgE 抗体産生への class switch を誘導する。事実、気管支喘息患者の気道局所に集積するリンパ球はその phenotype から Th2 細胞であることが報告されている。最近、Th1/Th2 上に特定のケモカイン受容体が発現しているとの知見が集積しつつある。現在まで、Th1 選択的なケモカイン受容体としては CXCR3, CCR5 が示され、一方、Th2 に関しては、CCR4 がナイーブ CD4 細胞から Th2 に分化させた細胞および Th2 cell line に発現していることが報告されている。また末梢血の IL-4 産生 T 細胞の一部には CCR3 が、活性化 Th2 cell line には CCR8 の発現が認められている。これら受容体の中で特に CCR4 は CCR3 や CCR8 に比べても強く Th2 に発現しているとの報告がある。CCR4 受容体のリガンドである TARC (thymus and activation-regulated chemokine) および MDC (macrophage-derived chemokine) は in vitro で Th2 細胞を強力、且つ選択的に遊走させる。これら両者のケモカインは CCR4 を通じて気管支喘息における炎症部位への Th2 細胞集積に深く関わっている可能性が考えられる。

気管支喘息の病態形成に重要と考えられる炎症部位への Th2 細胞集積の機序を明らかにするために、我々は気管支喘息における Th2 タイプのケモカイン受容体 CCR4 のリガンドである MDC と TARC の発現を検討した。

我々は以下の結論を得た。

1) 健常人および喘息患者より気道粘膜の生検標本の凍結組織切片を得、TARC と MDC に対する polyclonal 抗体で染色した。TARC に関しては健常人 (3 名)、アトピー性喘息患者 (5 名)、非アトピー性喘息患者 (1 名) の検体を、また MDC に関しては健常人 (3 名) とアトピー性喘息患者 (6 名) の検体を検討した。抗 TARC 抗体染色に対し健常者の気道上皮は単に弱い反応性を示すのみだったが、喘息患者の気道上皮は強く染色され、健常人との間で、その染色強度に統計学的な有意差を認めた ($p=0.025$)。一方、MDC 発現は、非常に弱く、健常人と喘息患者との間で染色性に有意差は認められなかった。

2) TARC, MDC タンパクの産生調節を気道上皮細胞株である A549 細胞, BEAS-2B 細胞を用いて検討した。TNF- α , IL-4, IFN- γ , LPS 等の単独刺激や共刺激を行い、その培養上清中の TARC, MDC タンパクの定量を行った。A549 細胞, BEAS-2B 細胞はともに TNF- α , IL-4, IFN- γ , LPS の単独刺激では有意な TARC を産生しなかったが、A549 細胞では TNF- α と IL-4 の共刺激にて著明な TARC 産生を示し、IFN- γ は TNF- α と IL-4 の共刺激による TARC 産生をさらに増強した。BEAS-2B 細胞では TNF- α と IFN- γ の共刺激にて弱いながら有意な TARC 産生が誘導され、TNF- α , IL-4, IFN- γ の共刺激にて著明に増強された。しかしながら MDC については A549 細胞, BEAS-2B 細胞はこれらの刺激条件下では有意な産生は示さなかった。

3) A549 細胞では TNF- α の存在下で 0.01 ng/mL の IL-4 より TARC 産生が用量依存的に増加した。また TNF- α と IFN- γ の共存在下で BEAS-2B 細胞でも同様に 0.1 ng/mL の IL-4 で有意な TARC の産生増強が認められ、これ以上の濃度において用量依存的に TARC 産生を増強した。IL-4 と共通のレセプターサブユニットを持ち、種々の生物活性を共有する IL-13 も同様にこれ

らの細胞において用量依存的に TARC 産生を増加させた。

IL-4、TNF- α の存在下では、IFN- γ は BEAS-2B 細胞に 1 U/mL の濃度で有意な TARC 発現増強を誘導し 100 U/mL で最大増強に達した。TNF- α /IL-4 刺激により誘導された A549 細胞による TARC タンパク産生についても IFN- γ は同様な用量依存的な増強効果を示した。

4) TARC mRNA を Northern analysis にて検討したところ、無刺激の状態では TARC mRNA は検出されなかったが、TNF- α と IL-4 による共刺激では時間依存的に A549 細胞に TARC mRNA 発現を誘導した。TARC mRNA レベルは 4 時間以内に増加し、24 時間まで増加を続け、刺激後 48 時間まで高レベルで維持された。24 時間および 48 時間後の TNF- α と IL-4 の共刺激によって引き起こされた TARC mRNA の発現は IFN- γ の追加によりさらに増強された。BEAS-2B 細胞では A549 細胞と異なる TARC mRNA 発現パターンを観察した。すなわち TARC mRNA は、TNF- α と IL-4 もしくは TNF と IFN- γ で共刺激された BEAS-2B 細胞においてはほとんど検出されなかった。しかしながら TARC mRNA は TNF- α 、IFN- γ および IL-4 の 3 種のコンビネーション刺激により著明に発現が誘導され、刺激 24 時間後に最大発現に達した。

5) 副腎皮質ステロイド (グルココルチコイド (GCC)) であるデキサメタゾン (DEX) は A549 細胞および BEAS-2B 細胞の両者による TARC 産生を用量依存的に抑制した。すなわち ID₅₀ は 10⁻⁹ から 10⁻⁸ M までの範囲の濃度で観察され、また 10⁻¹⁰ ~ 10⁻⁷ M の範囲で用量依存的抑制を観察した。A549 細胞ではハイドロコチゾン (10⁻⁷ M) もまた TARC 産生を抑制したが、性ステロイドである β -エストラジオールは TARC 産生抑制を認めなかった。

6) 健常者血清 (26 名) に比較すると喘息患者血清 (46 名) では、有意な TARC 濃度の増加が認められた (p<0.001)。また誘発喀痰を健常者 (6 名) および喘息患者 (30 名) 間で比較したところ、喘息患者誘発喀痰で有意な TARC 濃度の増加が認められた (p=0.027)。しかしながら血清の MDC 濃度については両群間に有意な差は認められなかった。喘息患者の血清において、eotaxin 濃度と TARC 濃度 (p=0.011)、TARC 濃度と MDC 濃度間 (p=0.003) に相関を認めた。喘息の誘発喀痰においては eotaxin 濃度と TARC 濃度間 (p=0.006) に相関が見られた。

TARC や MDC はアレルギー性炎症のコントローラーである Th2 細胞を選択的に遊走させることで、喘息の病態形成に関わっていると考えられる。本研究を通じて、気道上皮が Th2 特異的なケモカインである TARC の重要な産生源の一つであることを初めて示した。気道上皮に由来する TARC は paracrine (傍分泌) の機序で働いていると考えられる。気道上皮細胞は、eotaxin をはじめとするアレルギーに関わる種々のケモカインを産生することが知られているが、本研究の結果はケモカイン産生細胞としての気道上皮細胞の喘息における重要性をより一層明らかにした。また Th2 サイトカインである IL-4、IL-13 が TARC 発現を誘導する事実から、TARC 産生を介して喘息における局所の Th2 反応を維持し、かつ悪化させるというポジティブフィードバックの機構の存在が考えられた。すなわち局所における Th2 から遊離された IL-4、IL-13 は TARC の

産生を通じて、炎症局所への Th2 細胞の補充を誘導している可能性が考えられた。また、Th1 サイトカインは一般にアレルギー反応の進展を抑制するとされるが、ある状況下、特にウイルス感染において IFN- γ はアレルギー性炎症を促進する役割を果たすことが臨床的に知られている。我々の実験においても、IFN- γ は明らかに TARC 産生を増強した。すなわち気管支喘息患者におけるウイルス感染は Th1 サイトカイン反応の誘導のみならず、TARC 発現を介して Th2 サイトカイン反応も促進する可能性が推測される。また本研究より、気管支喘息における吸入グルココルチコイド (GCC) の作用機序として、気道上皮細胞における TARC 産生に対する GCC の直接的な抑制が関与していることが推測された。

TARC と MDC はともに CCR4 の高親和性リガンドであるが、その産生細胞は異なっていることが示されている。MDC が単球や内皮細胞等で産生されるのにくらべ、TARC は主に樹状細胞や上皮細胞等により産生される。これは同じ CCR4 を受容体を持つケモカインであっても、病態ごとにその関与の程度が異なっている可能性を示している。気道における重要なケモカイン産生細胞である気道上皮が TARC を大量に産生する事実、また、喘息患者の喀痰、血清中での TARC の増加からは、気管支喘息においては、MDC に比べ TARC がより積極的にその病態に関わっているのではないかと推測された。気道上皮由来の TARC は気管支喘息の新しい治療標的になりうると考えられる。