

## 審査の結果の要旨

氏名 関谷 剛

本研究は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、気道上皮細胞株や臨床検体を用いて、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 の発現を検討したものであり、以下の結果を得ている。

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。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。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。A549 細胞, BEAS-2B 細胞はともに TNF- $\alpha$ , IL-4, IFN- $\gamma$ , 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- $\alpha$  と IL-4 の共刺激にて著明な TARC 産生を示し、IFN- $\gamma$  は TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  と IFN- $\gamma$  の共刺激にて弱いながら有意な TARC 産生が誘導され、TNF- $\alpha$ , IL-4, IFN- $\gamma$  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- $\alpha$  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- $\alpha$  と IFN- $\gamma$  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- $\alpha$  の存在下では、IFN- $\gamma$  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- $\alpha$  /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- $\gamma$  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- $\alpha$  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。TNF- $\alpha$  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- $\gamma$  の追加によりさらに増強された。BEAS-2B 細胞では TARC mRNA は、TNF- $\alpha$  と IL-4 もしくは TNF と IFN- $\gamma$  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- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  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 ID<sub>50</sub> は 10<sup>-9</sup> から 10<sup>-8</sup>M までの範囲の濃度で観察され、また 10<sup>-10</sup>~10<sup>-7</sup>M の範囲で用量依存的抑制を観察した。

6) 健常者血清に比較すると喘息患者血清では、有意な TARC 濃度の増加が認められた。また誘発喀痰を健常者および喘息患者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。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、TARC 濃度と MDC 濃度間に相関を認めた。喘息の誘発喀痰においては eotaxin 濃度と TARC 濃度間に相関が見られた。

以上、本論文は気道上皮が 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、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。また種々の結果から、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。

本研究はこれまで未知に等しかった、Th2 特異的ケモカインである TARC, MDC の気管支喘息における役割の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。