

論文の内容の要旨

マクロファージレクチン(MGL)を発現する細胞が Cyclooxygenase-2 介在性に接触過敏症の感作の成立を補助する可能性

平成11年度進学 前田 大輔
指導教官 入村 達郎

【序】

接触過敏症は、低分子化合物(ハプテン)などによって生じる T 細胞介在性の免疫応答であり、遅延型過敏症に分類される。この症状を解析する実験モデルとして、マウスの腹部や上腕などにハプテンを塗布して免疫記憶を誘導し(感作過程)、その後、同一のハプテンを耳に塗布して(惹起過程)耳の腫脹を測定し、感作の成立を評価する方法が確立されている(図 1)。

感作においては、皮膚に付着したハプテンが表皮のタンパク質に結合したものを、表皮に局在するランゲルハンス細胞が取り込み、表皮から近傍の所属リンパ節へ遊走する。リンパ節において、この抗原を特異的に認識するリンパ球に抗原提示を行うことによって感作が成立すると考えられている。

ハプテン塗布後にマクロファージ Gal/GalNAc 特異的 C 型レクチン(MGL)を発現している細胞(MGL 陽性細胞と呼ぶ)は、真皮から所属リンパ節に移動する。惹起時の耳の腫脹と、所属リンパ節における MGL 陽性細胞数の増加の度合いとの間には相関が認められ、MGL 陽性細胞の移動を阻害すると耳の腫脹は減少する。MGL 陽性細胞による感作の成立を補助する機構を明らかにすることを目的として、リンパ節において MGL 陽性細胞の産生する液性因子等の遺伝子発現を調べた。リンパ節に移動した MGL 陽性細胞の機能の一つとして、この細胞が Cyclooxygenase (COX)-2 介在性に感作の成立を補助していることを示唆する知見を得た。

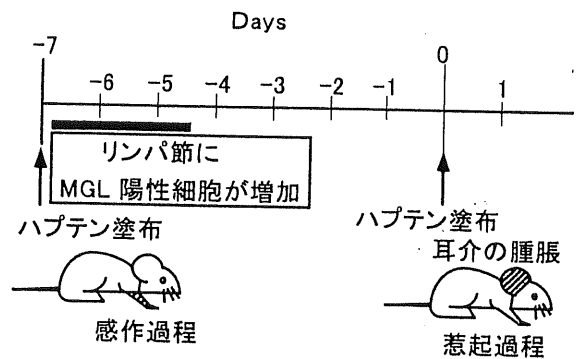


図1. 接触過敏症の実験モデル

【方法と結果】

1. 感作時の所属リンパ節において、液性因子および関連酵素の遺伝子発現は変化しているか

ハプテン(acetone:dibutylphthalate= 1:1(v/v))に溶解させた FITC)を皮膚に塗布後、リンパ節に MGL 陽性細胞が増加する時期に、所属リンパ節細胞全体でマクロファージ系細胞の産生する主要な液性因子等の遺伝子発現を調べた。その結果、IL-1 α 、IL-6、IL-12p40、TNF- α 、inducible nitric oxide synthase(iNOS)、COX-2 の遺伝子発現が、ハプテンを塗布した後の所属のリンパ節に比べて増加していることがわかった(図 2)。

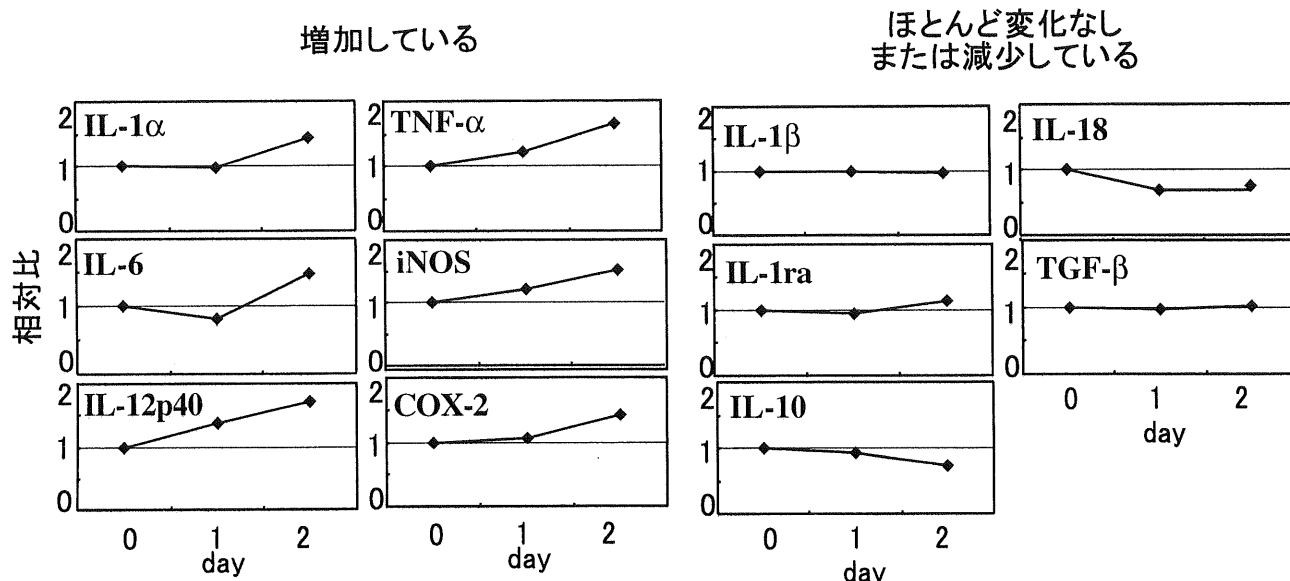


図 2. ハプテン塗布後のリンパ節における遺伝子発現の経時変化

2. MGL 陽性細胞において発現が高い、液性因子および関連酵素の遺伝子は何か

感作時にリンパ節で発現が増加する上記の遺伝子に関して、MGL 陽性細胞で優位な発現があるかどうかを調べた。ハプテン塗布 24 時間後のリンパ節から細胞を回収して浮遊液とし、抗 MGL 抗体 LOM-14 によって MGL 陽性細胞を得た。リンパ節細胞 10^6 個あたり、 $0.3 \sim 1.2 \times 10^4$ 個の MGL 陽性細胞を取得した。フローサイトメトリー分析によると、MGL 陽性細胞は、DEC-205 陽性、MHC class II 陽性、CD11b 陽性、CD45 陽性、CD14 弱陽性、MOMA-1 と CD11c はごく一部が陽性、F4/80、CD86 陰性の細胞であった。ここで調製した MGL 陰性細胞の 95% はリンパ球であった。

MGL 陽性細胞と MGL 陰性細胞における遺伝子発現を半定量 RT-PCR で比較した。感作時にリンパ節で発現が増加する上記の遺伝子のうち、COX-2、IL-1 α 、IL-1ra 遺伝子が、リンパ節の MGL 陽性細胞において MGL 陰性細胞よりも高く発現されていた。リンパ節から密度勾配遠心法によって非リンパ球濃縮画分を得て MGL 陽性細胞と陰性細胞を調製した場合においても、ほぼ同様の結果が得られ、MGL 陽性細胞で発現が高かった遺伝子は COX-2 (4.0 倍)、IL-1 α (3.1 倍)、IL-1ra (1.6 倍) であった (図 3)。

皮膚の MGL 陽性細胞の移動には IL-1 β などの関与が報告されており、IL-1 β 存在下で皮膚 MGL 陽性細胞を培養すると COX-2 遺伝子の発現が上昇したことから、抗原によって感作された後のリンパ節においてみられた COX-2 遺伝子の発現はリンパ節に遊走した MGL 陽性細胞によるものと考えられた。COX-2 について、さらに検討をおこなった。

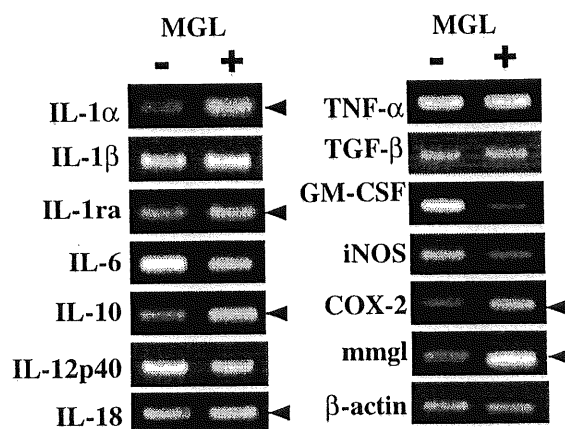


図3. MGL 陽性細胞とMGL 陰性細胞における遺伝子発現の比較

3. MGL 陽性細胞において COX-2 タンパク質が発現しているか

抗原感作後リンパ節において検出された MGL 陽性細胞において COX-2 タンパク質が発現しているかを調べた。ハプテン塗布1日後のリンパ節から、リンパ節細胞を調製し、MGL陽性細胞を単離して、チャンバースライド上に接着させて、抗 COX-2 抗体をもちいて染色をおこなった。ハプテン塗布後の所属リンパ節の MGL 陽性細胞において COX-2 タンパク質が発現していることが示された。

4. MGL 陽性細胞で Prostaglandin(PG) E₂ が産生されているか

COX 経路の産物の一つである PGE₂ が産生されているかどうかを ELISA で定量した。ハプテン塗布後のリンパ節から得た MGL 陽性細胞では MGL 陰性細胞(上記のリンパ球に富む細胞)に比べて約 70 倍高く産生されており、この産生は COX-2 選択的阻害剤 NS-398 によって阻害された(図 4)。

これらから、感作されたマウスのリンパ節において MGL 陽性細胞が COX-2 介在性に PGE₂ を産生していることが分かった。

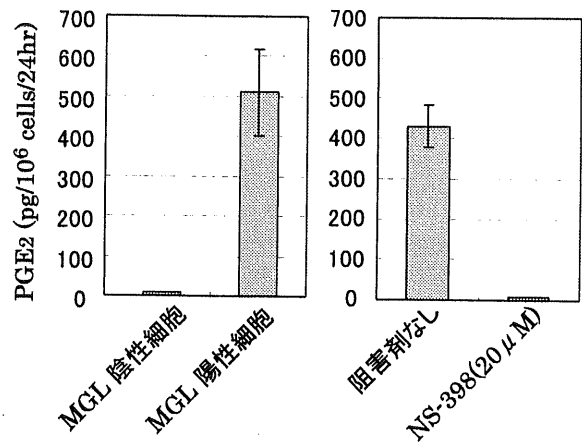


図 4. MGL 陽性細胞および陰性細胞における PGE₂ 産生(左)と MGL 陽性細胞における PGE₂ 産生に及ぼす COX-2 阻害剤の効果(右)

5. MGL 陽性細胞の移動を阻害するとリンパ節での PGE₂ 産生は減少するか

抗 MGL 抗体を皮下投与すると MGL 陽性細胞の皮膚からリンパ節への遊走が阻害されることがわかっている。同じ条件でマウスに抗 MGL 抗体を投与すると、リンパ節での PGE₂ 産生が減少するかを調べた。ハプテン塗布 2 時間前および塗布 8 時間後に抗 MGL 抗体 LOM-8.7 またはコントロールとして rat IgG を上腕に皮下投与した。LOM-8.7 投与すると、ハプテン塗布 24 時間後のリンパ節での MGL 陽性細胞数は、rat IgG 投与群の 40%であった。このリンパ節細胞からの 24 時間の PGE₂ 産生量は、rat IgG 投与群の 66%であった(図 5)。

すなわち、MGL 陽性細胞のリンパ節への遊走を阻害すると、リンパ節での PGE₂ 産生が減少することが確認された。以上の結果から、皮膚からリンパ節に移動した MGL 陽性細胞が PGE₂ の産生源になっていることが再確認された。

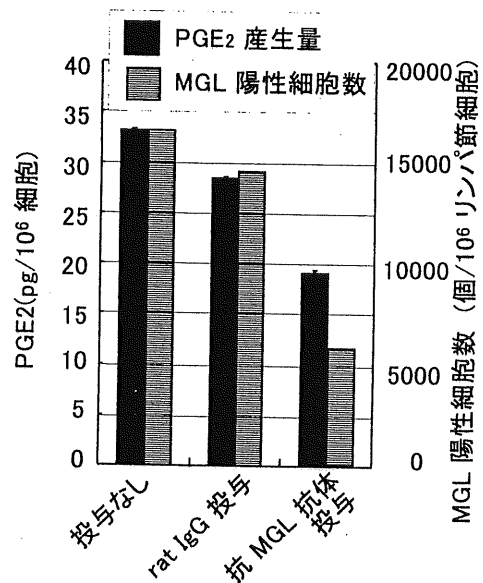


図 5. リンパ節細胞での PGE₂ 産生に及ぼす MGL 陽性細胞数の増加阻害の影響

6. COX-2 選択的阻害剤 NS-398 の投与は感作へ影響を与えるか

ハプテン塗布 2 日目まで COX-2 選択的阻害剤 NS-398 (10 mg/kg, 1 回/日) または溶媒のみを経口投与した (n = 10)。ハプテン塗布 1 日後の所属リンパ節における PGE₂ 産生が阻害されていることを、NS-398 または溶媒のみを投与した感作マウスのリンパ節細胞の培養上清から ELISA 法によって定量して確認した。また、ハプテン塗布 1 日後の所属リンパ節における MGL 陽性細胞の数をフローサイトメトリー分析で算出した。

単位リンパ節細胞数あたりの MGL 陽性細胞数は、NS-398 投与群と溶媒のみの投与群とで差異が見られなかった。

惹起時の耳の腫脹は溶媒のみの投与群に比べ、NS-398 投与群では 58% に減少した (図 6)。

これらの結果から、感作時に所属リンパ節において感作の成立の補助が COX-2 を介して起きていることが示唆された。

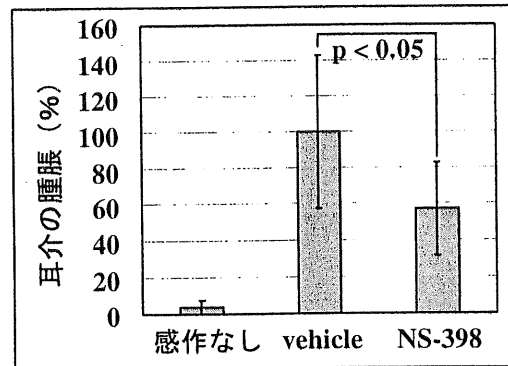


図 6. 感作時の COX-2 選択的阻害剤 NS-398 投与の惹起による耳介の腫脹への影響

【結論】

本研究において、リンパ節の MGL 陽性細胞は陰性細胞に比べて COX-2、IL-1 α の遺伝子発現が高いことが観察された。さらに、リンパ節の MGL 陽性細胞において MGL 陰性細胞よりも高いレベルの COX-2 タンパク質が発現しており、産物である PGE₂などを産生していることが示された。抗原感作に伴って MGL 陽性細胞が皮膚からリンパ節に移動し、これらの細胞がリンパ節における PGE₂ 産生の産生源となっていることが明らかになった。COX-2 選択的阻害剤をもちいた *in vivo* の実験によって、遅延型過敏症モデルにおける感作の成立が阻害されることが示された。MGL 陽性細胞が所属リンパ節において感作の成立を補助するメカニズムのひとつとして COX-2 が介在する場合があることが示唆された。