

論文の内容の要旨

論文題目 ヒト好酸球におけるロイコトリエンレセプター (CysLT₁)の機能に関する研究—気管支喘息の好酸球性炎症の成立におけるシステイニルロイコトリエンの役割について—

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 12 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 大島 信治

背景：日本国内における成人の気管支喘息患者数は人口の約 3%ともいわれ、その病態の解明および、効果的な治療法の確立が待たれるところである。気管支喘息の病態については、最近の研究を通じて持続性の好酸球を主体とした気道炎症に本態があると考えられるようになってきている。この好酸球を主体とした気道炎症には、サイトカインやケモカイン等の様々な物質の関わりが論じられているが、ロイコトリエン (LT) も気道炎症成立のメカニズムに関わっていると考えられるようになってきている。LT はアラキドン酸の 5-リポキシゲナーゼ系の代謝産物の総称であり、LTB₄とペプチドの結合した Cysteinyl leukotrienes (CysLTs) の二つに大別される。特に CysLTs は古くより SRS-A (slow reacting substance of anaphylaxis) と呼ばれており、緩徐に強く長く平滑筋を収縮させる作用を持ち、気道粘液の分泌亢進作用も併せ持つことから気管支喘息の病態生理に関与する重要なメディエーターとして注目されている。この CysLTs には薬理的に CysLT₁と CysLT₂の 2つの受容体の存在が知られている。CysLTs は CysLT₁を介して気道平滑筋収縮作用、気道分泌促進作用、血管

透過性亢進作用等を有しており、アレルギーを含めた炎症時において、病態生理学的に重要な役割を果たしている。一方、もう一つの受容体である CysLT₂ を介しての CysLTs の作用については今のところ、あまり明らかにはなっていない。この CysLTs と、気管支喘息の病態である好酸球を主体とした気道炎症との関わりに関しては、抗原を吸入させ喘息を誘発する実験や、特異的 CysLT₁ 拮抗薬を用いた臨床試験から、喘息患者に観察される好酸球の気道組織への浸潤に CysLTs が重要な役割を果たしていると考えられるようになってきている。しかし、In vitro のにおいては、培養細胞である、好酸球分化 HL-60 細胞において、LTD₄ 受容体が存在し機能的な役割を演じていることが報告されているが、ヒト好酸球に関しては末梢血から十分な数の好酸球を得ることが容易でないこともあり、CysLT₁ が発現しているか否か不明であり、CysLT₁ を介する CysLTs の直接作用を検討した成績もほとんど知られていないのが現状である。

目的: 本研究の目的は CysLT₁ に焦点を合わせ、RT-PCR、フローサイトメトリー、Ca²⁺流入反応、遊走および脱顆粒などの方法を用いて、ヒト好酸球上の CysLT₁ の発現の有無、および CysLTs が CysLT₁ を介して、ヒト好酸球に対して直接作用を示すかどうかの解明を試みることである。

方法: アレルギーの病歴のない健常志願者の静脈血から、比重 1.088 g/ml の Percoll 液による比重遠沈法、続いて抗 CD16 micro magnetic beads を用いた MACS 法による negative selection により、好酸球を分離した（純度 > 99%、生存率 > 95%）。それらを用いて CysLT₁ について逆転写-PCR 分析およびフローサイトメトリー分析を行った。結合測定には [³H] LTD₄ を用いた。Fura-2AM と反応させた精製好酸球を CysLTs で刺激し、細胞内 Ca²⁺流入を F-2500 分光蛍光光度計を用いて計測した。96 well のマルチウェルボイデンチャンバーおよび直径 5 μm のポリカーボネイトフィルター膜を用いて CysLTs に反応した好酸球遊走活性を測定した。この測定には Tris-HCl 溶液を用いた好酸球の EPO 活性の定量にて行い、Bio Rad Lab 製の ELISA リーダーを用いて測定した。脱顆粒の実験としては、好酸球を 10⁻⁶M の LTD₄ で 60 分間処理した後、IL-5 の存在下または非存在下において、37°C で 4 時間インキュベートし、EDN 放出を評価した。

結果: ヒト好酸球における CysLT₁ の mRNA およびタンパク質の発現、ならびに好酸球への [³H] LTD₄-特異的結合が観察された。なおこの特異的結合は CysLT₁ 拮抗薬であるプラシルカストにて阻害された。CysLTs はヒト好酸

球における Ca^{2+} 流入反応を誘発した。CysLTs が Ca^{2+} 流入反応を引き起こす効力は、 LTD_4 、 LTC_4 、および LTE_4 の順であることおよび、この Ca^{2+} 流入反応は CysLT₁ 拮抗薬であるプラシルカストにて抑制されることも示された。CysLTs は好酸球遊走反応を誘導し、その活性が最も高いのは LTD_4 であった。 LTD_4 に対する遊走反応を CysLT₁ 拮抗薬であるプラシルカストが抑制した。なお、Th1 サイトカイン (IFN- γ) および Th2 サイトカイン (IL-4 または IL-5) のいずれも好酸球における CysLT₁ の発現に影響しないこともわかった。 LTD_4 は CysLT₁ を介して IL-5 によって誘発される脱顆粒を増大させた。

結論: CysLTs は CysLT₁ を介して好酸球における Ca^{2+} 流入反応や遊走を誘発するほか、IL-5 による脱顆粒を増大させるといった、機能的な役割を担っている。つまり、CysLTs がヒト好酸球における CysLT₁ を介して直接作用することにより好酸球を主体とした気道炎症における炎症増悪の機序を担っていることが示唆された。また、 Ca^{2+} 流入反応や遊走などの直接作用を特異的 CysLT₁ 拮抗薬であるプラシルカストが抑制したことから、特異的 CysLT₁ 拮抗薬における新しい抗炎症作用として CysLTs の好酸球への直接作用を阻害する機序が認められた。したがって、好酸球に対する CysLTs と CysLT₁ の相互作用は喘息の病態生理において著明な役割を果たす可能性がある。

キーワード: 気管支喘息、好酸球、システイニルロイコトリエン、CysLT₁、IL-5、遊走、 Ca^{2+} 流入、EDN