

論文の内容の要旨

論文題目 気道での抗原特異的免疫応答におけるシステニルロイコトリエンの新たな意義
に関する実験的研究

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 13 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 奥西 勝秀

アラキドン酸代謝物であるエイコサノイドが、肺機能や呼吸器疾患において、重要な役割を担っていることは、良く知られている。エイコサノイドは、ロイコトリエン (leukotriene: LT) 及びプロスタグランジン (prostaglandin: PG) に大別される。LT は、5-リポキシゲナーゼ (5-lipoxygenase: 5-LO) の経路を介して、アラキドン酸から生成される。LT は、LTB₄ およびシステニルロイコトリエン (cysteinyl leukotrienes: cysLTs. LTC₄, D₄, E₄) に分けられる。cysLTs は、強力な気管支収縮作用を有し、平滑筋細胞増殖、血管透過性、粘液産生、及び好酸球の肺への遊走を亢進させる。これまで、cysLTs の役割やロイコトリエン拮抗薬 (cysLT1 receptor antagonist: LTRA) の効果については、喘息における好酸球気道炎症やリモデリングを中心に研究されてきた。一方、免疫応答初期における cysLTs の役割に関する研究は、わずかに認めるのみである。特に、樹状細胞 (dendritic cell: DC) の抗原提示能に対する cysLTs の効果や、in vivo での cysLTs の DC に対する作用については、ほとんど解明されていない。

本研究では、マウス喘息モデルおよび *in vitro* の実験を用いて、抗原特異的免疫応答初期における *cysLTs* の役割について検討した。まず、マウスモデルを用いて *in vivo* での検討を行った。当研究室では、以前、抗原全身感作のみで、気道炎症成立以前に、気道過敏性 (airway hyperreactivity: AHR) および肺でのサイトカイン産生が亢進することを報告した。同様の系を用いて、抗原全身感作により誘導される免疫応答初期の、肺での反応における *cysLTs* の役割について検討した。BALB/c マウスを卵白アルブミン (ovalbumin: OVA)/水酸化アルミニウムゲル (alum) で days 0, 11 に全身感作し、OVA で感作した一部のマウスに、days 11-17 に、LTRA であるプラナルカスト (pranlukast hydrate: Prl) またはモンテルカスト (montelukast sodium: Mk) を投与した。対照群には、生理食塩水を days 0, 11 に腹腔内投与した。Day 18 に、AHR 測定及び気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid: BALF) 回収を行った。OVA 全身感作で誘導される AHR 及び BALF 中 Th1, Th2 いずれのサイトカイン濃度上昇も、LTRA 投与により有意に抑制された。一方、LTRA 投与は OVA 全身感作で誘導される血清中 IgG 及び IgE の上昇は抑制しなかった。すなわち、LTRA は、IgE 産生の抑制を介さない経路でその効果を発揮する可能性が示唆された。

LTs と PGs は、*in vivo*、*in vitro* いずれにおいても、お互いの産生を干渉しあうという報告がある。そこで、LTRA の投与が、PGs 産生に及ぼす影響を検討する為に、BALF 中 PGs 濃度の測定を行った。OVA 全身感作は、肺での PGE₂ 産生を亢進させ、LTRA 投与は、肺での PGE₂ 産生を更に亢進させた。他方、OVA 全身感作では、PGE₂ 以外の PGs の上昇は認めなかった。また、5-LO ノックアウトマウスを用いた検討でも、LTs の経路の阻害が、肺での PGE₂ 産生を亢進させることを確認した。これまでの報告から、PGE₂ は、少なくともアレルギー性気道炎症においては、免疫抑制的に作用すると考えられる。そこで、シクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase: COX) 阻害剤である、インドメタシン (indomethacin: Ind) を用いて PGE₂ の産生を抑制することにより、LTRA 治療における PGE₂ の役割について検討した。LTRA と Ind の同時投与により、AHR 及び肺でのサイトカイン産生に対する LTRA の抑制効果が有意に解除された。すなわち、LTRA が、*in vivo* においては、PGE₂ の産生亢進を介してその作用を発揮する可能性があることが示唆された。

次に、*ex vivo* および *in vitro* の系を用いて、抗原特異的免疫応答初期における LTRA の効果について検討した。まず、LTRA の T 細胞に対する効果を検討する為、

BALB/c マウスを OVA/Alum で day 0 に感作後、一部のマウスに、Prl 又は Prl + Ind を days 0-10 に連日投与し、day 11 に、各マウスから脾細胞及び CD4⁺ T 細胞を取り出し、in vitro での OVA 再刺激に伴う脾細胞の反応、及び OVA 抗原が提示された場合の CD4⁺ T 細胞増殖能を検討した。脾細胞を OVA で in vitro で再刺激した際に誘導される細胞増殖、Th1, Th2 いずれのサイトカイン産生、及び OVA 抗原に対する CD4⁺ T 細胞の増殖は、Prl 投与群で有意に抑制されていた。すなわち、OVA による T 細胞のプライミングを、Prl が有意に抑制することが示唆された。また、in vivo の結果と同様、Prl の T 細胞プライミングに対する抑制効果は、Ind 同時投与により、有意に解除された。

一般的に、cysLT1 受容体 mRNA/蛋白は、T 細胞上にはほとんど存在しないとされている。本研究でも、PMA および ionomycin で誘導される CD4⁺ T 細胞の増殖反応を Prl が抑制しないこと、及びサイトカイン産生に LTD₄ が影響を与えないことを確認した。以上の結果から、抗原感作により誘導される CD4⁺ T 細胞活性化を、LTRA は間接的に抑制することが示唆された。次に、LTRA の、抗原提示細胞、特に最強の抗原提示細胞である DC に対する効果を検討した。まず、ex vivo の実験系を用いて、LTRA の in vivo 投与が DC 機能へ及ぼす効果について検討した。マウスを OVA で day 0 に全身感作後、一部のマウスには Prl または Prl+Ind の投与を行い、day 11 に脾臓から DC を取り出した。まず、RT-PCR 法にて、マウス脾細胞由来 DC 上に cysLT1 受容体 mRNA が発現していることを確認した後、DC の OVA 抗原提示能及びサイトカイン産生能について検討し、in vivo での LTRA 投与が、OVA 全身感作により亢進する DC の抗原提示能及びサイトカイン産生能を有意に抑制することを確認した。また、LTRA の DC 機能抑制効果は、Ind 同時投与により、有意に解除された。LTRA の DC への直接作用の検討の為にを行った in vitro の実験においても、LPS 刺激により、DC からの cysLTs 産生が亢進し、DC を LPS 刺激下で 2 日間培養する際、その上清中に Prl を添加することにより、DC のアロ抗原提示能が有意に抑制されることを確認した。すなわち、Prl が DC 機能を直接的に抑制することが示唆された。更に、OVA を抗原として、アジュヴァントとして、alum の代わりに完全フロイントアジュヴァントを用いることにより誘導される、Th1 に偏向した反応及び DC からのサイトカイン産生亢進も、LTRA が有意に抑制することを確認した。

最後に、抗原感作により誘導される初期免疫応答における LTRA の投与が、その後抗原

吸入により誘導される好酸球性気道炎症に及ぼす効果について、マウス喘息モデルを用いて検討した。そして、抗原感作初期の LTRA の投与が、その後抗原吸入により誘導される AHR、好酸球性気道炎症及び気道上皮細胞からの粘液産生の進展を、有意に抑制することを確認した。更に、抗原感作初期の Prl 投与は、効果期においても、DC の抗原提示能を抑制することを確認した。一方、抗原感作期に、Prlと共に Ind の投与を行うと、Prlにより抑制された AHR、好酸球性気道炎症、粘液産生が有意に回復し、また、肺 DC の抗原提示能を亢進させることを確認した。

本研究により、cysLTs が、気道炎症期だけでなく、抗原により誘導される免疫応答初期においても、DC の機能を亢進させることにより、重要な役割を担っていることが示された。更に、本研究では、LTRA が、DC 機能の抑制を介して、抗原により誘導される T 細胞プライミングを抑制し、その結果、Th2 型免疫応答だけでなく、Th1 型免疫応答も強力に抑制することが示された。これまで、Th2 型免疫応答の進展における Th1 型反応の重要性が報告されている。臨床の場合においても、ウイルス感染などの Th1 型気道炎症が気管支喘息を増悪させることが、しばしば経験される。従って、本研究の結果は、ウイルス感染に伴う喘息の急性増悪の抑制において、LTRA が有効であることを示唆する。更に、LTRA が喘息以外の免疫疾患の治療にも有効な可能性が示唆された。

喘息の発症の予防において、明らかな気道炎症が起きる以前の前または早期気道炎症期の制御の重要性も報告されている。本研究においても、抗原免疫応答初期における LTRA の投与が、その後抗原吸入により誘導される喘息に特徴的な所見を、有意に抑制することが示された。すなわち、臨床においても、気道炎症が十分に成立する以前の抗原感作早期に LTRA を投与することにより、その後の喘息発症が減少する可能性が示唆された。

更に、COX 阻害剤投与により、*in vivo* での LTRA の抑制作用の多くが解除されることから、LTRA は、アレルギー性免疫応答において、少なくとも *in vivo* では、PGE₂ 産生亢進を介してその効果を発揮している部分がある可能性が示唆された。