

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 アレルギー性炎症における好塩基球集積機構

指導教員 山本 一彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

鈴木真穂

【背景】

アレルギー疾患は、罹患率が増加傾向にあり、社会的にも、医療経済の上でも大きな問題となっており、各種アレルギー疾患の病態解明と治療確立は急務となっている。

アレルギー反応の中でも I 型反応は抗原曝露直後に惹起される即時相のみならず、抗原曝露後 4～8 時間後にアレルギー症状が再出現する遅発相が存在し、2 相性反応として認識されている。この遅発相、あるいは慢性アレルギー疾患において好塩基球の局所への浸潤が報告されており、好塩基球はアレルギー疾患の病態形成に重要な役割を果たすものと考えられている。好塩基球は末梢血中白血球の 1% にも満たない希少な白血球であるが、細胞表面に Fc γ RI を有し、IgE、Fc γ RI を介した刺激によりケミカルメディエーターを産生、放出することで I 型アレルギー反応の惹起や増悪に関与している。

好塩基球は骨髄で分化し、体内循環系に入る。好塩基球が炎症局所に浸潤する際には、血流中から血管壁に接着し、血管内皮細胞間を通過 (transendothelial migration, TEM) し、さらに組織内を遊走することが必要であるが、好塩基球の集積過程は、その全貌が明らかになったわけではない。そこで本研究においては好塩基球の炎症局所への集積機構を明らかにすることを目標とし、具体的には好塩基球遊走に対する抗原の関与並びに好塩基球の基底膜通過機構に関し検討を行った。

【方法】

末梢血より Percoll による比重遠心法で好塩基球を分離し、一部の実験にはさらに MACS を用いた negative selection で高純度に精製した。遊走には、chemotaxicell を使用し、基底膜通過遊走には人工基底膜モデル、Matrigel を用いた。遊走した細胞を回収後、FITC-conjugated goat anti-human IgE で好塩基球を標識し、flow cytometry で一定時間測定し、細胞数を計測した。CD11b、CCR3、MMP 発現の解析には flow cytometry を用いた。脱顆粒の解析には、Percoll で分離した好塩基球を用い、遊離したヒスタミンをオートアナライザーで解析した。

Real-time PCR、免疫染色、ELISA により、MMP-2 および MMP-9 の mRNA とタンパクの発現を解析した。

【結果】

まず anti-Fc ϵ RI α -chain mAb, CRA-1 を用いて Fc ϵ RI 架橋による好塩基球遊走を検討した。CRA-1 mAb は、既知の好塩基球遊走因子である eotaxin, MCP-1, PGD₂, C5a などに比較して弱いものの、コントロール IgG2b mAb に比較して有意な遊走作用を示した。MACS で分離した好塩基球も同様に CRA-1 mAb により有意に遊走したことから、CRA-1 mAb が直接好塩基球に遊走作用を及ぼすことが示された。checkerboard 解析から、CRA-1 mAb による好塩基球遊走は主に chemotaxis であることが判明した。CRA-1 mAb による好塩基球活性化作用の比較を行ったところ、脱顆粒、CD11b 発現増強より低濃度で遊走作用を惹起することが示された。Der f に対する RAST 陽性の喘息患者由来の好塩基球は、Der f 2 に対して有意に遊走した。Syk の欠損が報告されている nonreleaser 好塩基球は CRA-1 mAb に対し遊走しなかったことから、CRA-1 mAb による好塩基球遊走には Syk が関与していることが示唆された。CRA-1 mAb 1 ng/ml の存在下

において、好塩基球の CCR3 発現レベルは変化しないものの、eotaxin に対する遊走は有意に増強した。

引き続き、人工基底膜モデルである Matrigel を用いて通過遊走実験を行い、好塩基球の基底膜通過機構を検討した。上室に IL-3 300 pM を加えると、好塩基球の基底膜通過遊走は増強し、下室に IL-8、RANTES、5-oxo-ETE または PAF を加えることでさらに増強した。タイムコース解析において、好塩基球の基底膜通過遊走は、緩やかに増強し 18 時間後まで増加した。MACS で分離した高純度好塩基球においても同様に基底膜通過が見られたことから、他の細胞による間接的な作用ではなく、好塩基球自体の基底膜通過遊走であることが示された。ケモカインレセプターの中和実験より、好塩基球の基底膜通過遊走には、CCR3 のみならず、CCR1、CXCR1 といった複数のケモカインレセプターが関与していることが判明した。インテグリンの構成成分である CD29 及び CD18 の中和抗体を用いて実験を行ったところ、anti-CD18 Ab は好塩基球基底膜通過を著明に抑制したが、anti-CD29 は抑制しなかった。このことから、好塩基球の基底膜通過には主に α_2 integrin が関与していることが示唆された。さらに MMP-2、MMP-9 の阻害剤を用いて好塩基球基底膜通過遊走を検討した。阻害剤により基底膜通過遊走が最大 75% と著明に抑制されたことより、好塩基球の基底膜通過にはこれらの MMP が関与していることが示唆された。

引き続き、好塩基球による MMP 発現を検討した。real-time PCR の結果、好塩基球において MMP-2 mRNA の発現は低レベルであり、MMP-9 の発現レベルは好中球に比較して低レベルであったが、好酸球と同等かやや高レベルであった。MMP-2、MMP-9 のタンパク発現をフローサイトメトリーで解析したところ、好塩基球細胞表面の MMP-9 は高レベルで発現を認め、さらに IL-3 300 pM で overnight 処理後は発現レベルが増強した。免疫染色により、好塩基球の細胞質に MMP-9 の染色を認めた。細胞の培養上清中に遊離した MMP-9 を ELISA により測定したところ、好塩基球は測定感度内で MMP-9 を分泌していたが、その量は好中球より低かった。

さらに喘息発作で同愛記念病院を受診した患者を対象に、好塩基球を分離して MMP-9 の細胞表面発現を解析した。その結果として、喘息発作患者由来の好塩基球では健常人好塩基球と比較して、細胞表面の MMP-9 発現が増強していた。

【考察】

IgE、Fc γ RI は抗原依存性の即時型アレルギー反応の惹起において重要な位置を占める。さらに最近、IgE 架橋刺激がマウスマスト細胞を遊走させることが報告されている。本研究から、ヒト好塩基球もマスト細胞と同様に IgE、Fc γ RI 依存的に遊走することが示された。また、CRA-1 mAb が低濃度で、好塩基球の eotaxin に対する遊走を増強することが判明した。

抗原誘発性アレルギー反応の遅発相において、炎症局所への好塩基球の集積が報告されている。通常、好塩基球は血流中にしか存在しないため、アレルギー性炎症局所へ遊走する機序が存在することは明白である。現在までに、補体、細菌由来ペプチド、サイトカイン、ケモカイン、酵素、脂質メディエーターなど様々な物質が好塩基球遊走因子として報告されてきた。しかしこれらの遊走因子は好塩基球に選択的ではなく、他の炎症細胞も遊走させる働きを持つ。本研究で示した抗原による遊走は IgE、Fc γ RI 依存的であり、白血球の中でも専ら好塩基球に選択的に作用すると言える。さらに特異抗原に感作された個体にのみ反応を起こすと考えられ、既知の遊走因子とは趣を異にする。この抗原依存性遊走は、遷延する抗原曝露がアレルギー性炎症の増悪につながるメカニズムの少なくとも一部を構成していると考えられる。

さらに本研究では、基底膜モデル Matrigel を用いて好塩基球の基底膜通過機序を初めて解析した。好塩基球の基底膜通過増強が IL-3 の存在下でのみ認められたことは好塩基球の基底膜通過に特徴的である。また興味深いことに、好塩基球の基底膜通過を増強する遊走因子の repertoire は、好塩基球遊走や TEM と異なっていた。

本研究により、接着分子の中でも特に α_2 integrin が好塩基球の基底膜通過に関与していることが示された。 α_2 integrin は好塩基球の TEM、好酸球の TEM、基底膜通過にも中心的役割を演じることが報告されており、アレルギー性炎症の病態形成に重要な位置を占めることが推察される。また、MMP も好塩基球の基底膜通過に関与していることが示された。MMP は他の炎症細胞や腫瘍細胞の基底膜通過に必須であることが知られているが、好塩基球もまた、MMP を用い基底膜を通過することが示唆された。

real-time PCR、flow cytometry、免疫染色、ELISA による解析で、好塩基球が MMP-9 を産生し、さらに細胞外へ分泌することが示された。好塩基球が MMP-9 の産生源となりうること、および MMP-9 が好塩基球の基底膜通過にお

いて重要な役割を演じていることが推察される。

さらに本研究では、喘息発作患者由来の好塩基球において MMP-9 の表面発現が増強していることを示した。MMP-9 が実際のアレルギー性疾患において重要な役割を果たしていることを示唆する新たな知見と考えられる。

以上の通り、本研究においてはヒト好塩基球の組織集積メカニズムに対しあらたな視点から解析を行った。本研究成果を基に、今後も研究面、臨床面双方からのアプローチを組み合わせることでアレルギー疾患の成立機序を明らかにし、アレルギー疾患の治療法と予防法の発展に微力ながら貢献して行きたいと考えている。