

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

フォルミルペプチド受容体アゴニストの好中球組織浸潤抑制作用に関する研究

### 氏名

曾川 能任

好中球は感染防御の第一線で働く極めて重要な細胞であるが、組織における好中球の過剰な蓄積は慢性炎症を引き起こし、慢性肺閉塞性疾患や重症喘息などの発病や病態悪化の一因になっていると考えられている。これらの好中球性炎症に対しては、非常に強力で広範な抗炎症作用を持つステロイド剤も効きにくく、治療効果の高い新規薬剤の開発が望まれている。好中球は *N*-フォルミルペプチドやケモカインなど、病原体や宿主由来の走化性因子の濃度勾配によって炎症部位へと遊走することから、好中球の遊走を抑制することのできる薬剤は好中球性炎症の治療薬となると考えられる。また、炎症部位では多種の走化性因子が産生されるため、複数の走化性因子に起因した好中球の遊走反応を単剤で抑制することができれば、非常に効果的な好中球性炎症治療薬になることが期待される。

複数種の好中球走化性因子受容体が同時に抑制される現象として、クロス脱感作誘導が知られている。クロス脱感作とは、あらかじめある種の走化性因子で好中球を刺激しておく、それに続く他の走化性因子刺激に対する細胞応答が減弱する現象である。実際に、*N*-フォルミルペプチドの一つである fMLF (*N*-methionyl-leucyl-phenylalanine) で刺激したヒト好中球では、インターロイキン-8 (IL-8) や補体成分 C5a、ロイコトリエン B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) などの他の走化性因子による刺激に対する細胞応答が減弱することが *in vitro* の現象として報告されている。このように走化性因子受容体のクロス脱感作誘導は広範に走化性因子受容体を介した応答が抑制されるため、クロス脱感作を誘導する薬剤は好中球の組織浸潤を効果的に抑制することができると期待される。しかしながら、これまで *in vivo* で走化性因子受容体のクロス脱感作誘導

による好中球浸潤抑制作用を示した報告はない。

本研究では、フォルミルペプチド受容体アゴニストを用いて *in vivo* での走化性因子受容体のクロス脱感作誘導による好中球浸潤抑制の可能性について検討を行った。フォルミルペプチド受容体は G タンパク質共役受容体であり、*N*-フォルミルペプチドの受容体として同定された。*N*-フォルミルペプチド fMLF はフォルミルペプチド受容体 1 (FPR1) を介して好中球に走化性因子受容体のクロス脱感作を誘導することが *in vitro* において示されているが、*in vivo* における走化性因子受容体へのクロス脱感作誘導は十分に検証されていなかった。本研究では、最近報告されたマウスにおいて経口投与可能な FPR アゴニスト Compound 43 (Cpd43) を用いて検討を行った。Cpd43 は、当初 FPR ファミリーの一つである FPR2/ALX に選択的な低分子アゴニストとして報告されたが、本研究内で実際には FPR1 にもアゴニストとして作用することを発見した。そこで、Cpd43 を用いて *in vivo* における走化性因子受容体のクロス脱感作誘導による好中球浸潤抑制の可能性を検証することとした。

最初に、ヒト好中球を用いて Cpd43 による走化性因子受容体のクロス脱感作誘導能を調べた。Cpd43 で刺激したヒト好中球では、それに続く IL-8、C5a および LTB<sub>4</sub> 刺激による細胞内へのカルシウム流入や遊走能が減弱していた。また、Cpd43 で刺激したヒト好中球では細胞表面の各走化性因子受容体の発現が減少していた。Cpd43 は各走化性因子受容体とそのリガンドとの結合は阻害しなかったことから、Cpd43 は間接的にこれらの細胞応答を抑制していることが示唆された。これら一連の結果から、Cpd43 はヒト好中球に対して走化性因子受容体のクロス脱感作を誘導することが示された。

次に、マウス好中球における Cpd43 の走化性因子受容体のクロス脱感作誘導能を調べた。Cpd43 で刺激したマウス好中球における KC、C5a および LTB<sub>4</sub> に対する応答をカルシウム流入および遊走反応で評価したところ、これらの走化性因子に対する好中球の応答が Cpd43 刺激によって減弱していた。また、Cpd43 刺激によってマウス好中球の細胞表面上において C-X-C モチーフケモカイン受容体 2 (CXCR2) の発現が低下していた。これらの結果から、ヒト好中球の場合と同様に、Cpd43 はマウス好中球に対しても *in vitro* で走化性因子受容体のクロス脱感作を誘導することが示された。

Cpd43 の *in vivo* における作用を検討したところ、Cpd43 を経口投与したマウスでは、霧化 LPS 曝露による気道への好中球浸潤が Cpd43 の投与量依存的に抑制された。また、Zymosan 腹腔内投与による腹腔内への好中球浸潤についても、Cpd43 の投与量依存的に抑制された。Cpd43 を投与したマウスでは、血中好中球の細胞表面上の CXCR2 発現が低下していた。この Cpd43 投与による血中好中球上の CXCR2 発現低下は、*in vitro* においてみられた現象と一致しており、Cpd43 が *in vivo* においても走化性因子受容体のクロス脱感作を誘導したことが示唆された。

さらに、Cpd43 が作用した好中球の *in vivo* での挙動を調べるために細胞移入実験を

行った。蛍光ラベルしたマウス骨髄細胞を Cpd43 と共に培養し、レシピエントマウスに移入した後、霧化 LPS を曝露したところ、レシピエントマウスの好中球は LPS 曝露によって気道に浸潤したのに対し、移入した好中球はほとんど気道へ浸潤しなかった。一方、Cpd43 と培養しなかった骨髄細胞を移入したマウスでは、移入した好中球が気道へ浸潤していた。これらの結果から、Cpd43 は生体内において好中球に作用し、好中球の組織浸潤を抑制したことが示唆された。

以上から、本研究により初めて *in vivo* において走化性因子受容体のクロス脱感作誘導によって好中球の組織浸潤を抑制できることが示唆された。これらの結果は、走化性因子受容体のクロス脱感作誘導によって、好中球を起因とする炎症性疾患の治療薬を開発できる可能性を示した重要な結果と考えられる。