

論 文 内 容 要 旨

気管支喘息では、肥満細胞が炎症の場において種々の化学伝達物質を放出して気道平滑筋や分泌腺を刺激するだけでなく、多くのサイトカインを産生して病態の増幅、維持に重要な役割を果たしていると考えられる。IL-13はB細胞に働きIgEクラススイッチを起こさせるなど、IL-4と似た作用を有し、アレルギーの病態における重要な役割が注目されている。本研究では、ヒト肥満細胞がIL-13遺伝子および蛋白を発現するか否かをヒト肥満細胞株(HMC-1)を用いて検討した。また、IL-13遺伝子および蛋白発現に対するグルココルチコイドの作用を検討した。HMC-1 (5×10^5 /ml)をデキサメサゾン存在下にIMDM+10% FBSの条件で1時間培養した後10ng/ml PMA/1 μ M ionomycinあるいは50U/ml IL-2を加えて更に3-12時間培養した。健康人末梢血単核球 (5×10^6 /ml)はデキサメサゾン存在下にRPMI 1640+10% FBSの条件で1時間培養した後5 μ g/ml PHA, 10ng/ml PMAを加えて更に12時間培養した。細胞よりtotal RNAを抽出し、IL-13 mRNA levelをRT-PCR-Southern blot法を用いて半定量的に解析した。HMC-1およびヒト末梢血単核球の12時間培養上清中のIL-13蛋白をELISA法で測定した。HMC-1細胞では、非刺激時においてもIL-13遺伝子発現が認められた。PMA/ionomycin刺激によりIL-13遺伝子発現は約34倍増加した。IL-13遺伝子発現の時間経過解析では、刺激後1時間から3時間の間に最大となり、以後急速に減少した。HMC-1細胞のIL-13遺伝子発現はIL-2刺激によっても約3.8倍増加したが、IL-4刺激ではIL-13遺伝子は誘導されなかった。IL-2刺激によるIL-13遺伝子発現は、刺激後3時間から6時間の間に最大となり、以後漸減した。IL-2刺激による最大値は、PMA/ionomycin刺激による最大値の約1/4であった。デキサメサゾンは、PMA/ionomycinの3時間刺激およびIL-2の6時間刺激によるIL-13遺伝子発現の増加をそれぞれ67.5%、89.4%抑制した。HMC-1細胞のIL-13産生は、非刺激状態では24.6pg/mlであった。PMA/ionomycinの12時間刺激により、IL-13産生は188.4pg/mlまで増加した。10⁻⁶MのデキサメサゾンによりIL-13産生は124.0pg/mlに減少した。またIL-2の12時間刺激では、IL-13産生は48.0pg/mlまで増加した。10⁻⁶MのデキサメサゾンによりIL-13産生は23.6pg/mlに減少した。ヒト末梢血単核球におけるIL-13遺伝子発現は、非刺激時においても認められ、PHA/PMAの刺激により約31倍増加した。デキサメサゾンは、ヒト末梢血単核球におけるPHA/PMA刺激によるIL-13遺伝子発現を濃度依存的に抑制した。デキサメサゾンは10⁻⁸MでIL-13遺伝子発現を有意に抑制し、10⁻⁶Mでは96.2%抑制した。ヒト末梢血単核球におけるIL-13産生は、非刺激状態では175pg/mlであった。PHA/PMAの12時間刺激によりIL-13産生は1550pg/mlまで増加した。10⁻⁶MのデキサメサゾンによりIL-13産生は840pg/mlまで減少した。本研究によ

り、ヒト肥満細胞（HMC-1）においてIL-13遺伝子発現およびIL-13産生がCa ionophore刺激だけでなく、IL-2刺激によっても誘導されることが明らかになった。しかし、IL-4によっては誘導されなかった。これは炎症部位において肥満細胞がIL-13を産生し、アレルギー性炎症の増幅、維持に関わっている可能性を示唆している。肥満細胞におけるIL-13遺伝子発現およびIL-13産生はグルココルチコイドで抑制された。グルココルチコイドによるIL-13遺伝子発現の抑制は、IL-13産生抑制の最も重要な作用機序の一つであると考えられる。グルココルチコイドのIL-13産生抑制作用は、グルココルチコイドがアレルギー性炎症を抑制するその作用機序の中で重要な位置を占めていると考えられる。

本研究は、ヒト肥満細胞株（HMC-1）がIL-13遺伝子および蛋白を発現し、グルココルチコイドがその発現を抑制するという初めての報告である。肥満細胞は、IL-13を産生することによってもアレルギー性炎症を増幅させている可能性がある。また今まで知られていなかった、治療薬としてのグルココルチコイドの重要な作用機序の一つが明らかになった。

審査結果の要旨

気管支喘息は、好酸球、肥満細胞、リンパ球等の浸潤を伴った慢性炎症性疾患であり、その病態形成において、サイトカインは中心的な役割を演じていると考えられる。肥満細胞は、喘息患者の気道上皮や上皮下に多く認められ、化学伝達物質を放出するだけでなく、IL-4等のサイトカインを産生することが知られている。IL-4は、B細胞に作用してIgEへのクラススイッチを起こさせる唯一のサイトカインとされてきたが、近年発見されたIL-13もB細胞に作用して低親和性IgE受容体を誘導し、また、IgEクラススイッチを起こさせるなどIL-4と似た作用を有し、アレルギーの病態における重要な役割が注目されている。著者は、ヒト肥満細胞がIL-13を産生することによってアレルギー性炎症の増幅、維持に関与しているとの仮説にたち、肥満細胞のIL-13産生能につき、ヒト肥満細胞株(HMC-1)を用いて検討した。また、グルココルチコイドは、気管支喘息における最も強力な治療薬として広く使用されているが、そのメカニズムは完全には解明されていないことよりIL-13遺伝子および蛋白発現に対する作用を検討した。

IL-13 mRNAレベルを逆転写-PCR法で定量するにはかなりの困難を伴うが、著者は詳細な予備実験を行ってIL-13 mRNAレベルを半定量的に解析した。HMC-1細胞では、非刺激時においてもIL-13遺伝子発現が認められ、PMA/ionomycin刺激によりIL-13遺伝子発現は約34倍増加した。最大値は、刺激後1時間から3時間の間に認められ、以後急速に減少した。また、HMC-1細胞のIL-13遺伝子発現はIL-2刺激によっても約3.8倍増加したが、IL-4刺激では誘導されなかった。IL-2刺激によるIL-13遺伝子発現は、刺激後3時間から6時間の間に最大となり、以後漸減した。培養上清中のIL-13蛋白は、非刺激状態で24.6pg/ml、PMA/ionomycin刺激で188.4pg/ml、IL-2刺激で48.0pg/ml認められ、ヒト肥満細胞がIL-13を産生することが遺伝子発現レベル、蛋白発現レベルで確認された。そして、 10^{-6} Mのデキサメサゾン、PMA/ionomycin、IL-2刺激によるIL-13遺伝子発現をそれぞれ67.5%、89.4%抑制し、IL-13蛋白を抑制した。ヒト末梢血単核球においても、 10^{-6} MのデキサメサゾンはPHA/PMA刺激によるIL-13遺伝子発現を96.2%抑制し、IL-13蛋白を抑制した。以上より、デキサメサゾンが、ヒト肥満細胞およびヒト末梢血単核球におけるIL-13遺伝子発現および産生を抑制することが明らかとなった。

本研究は、ヒト肥満細胞がIL-13を産生すること、グルココルチコイドがIL-13産生を抑制することを明らかにし、肥満細胞の役割およびグルココルチコイドの作用機序に新たな知見を加えるものであり、学位論文に価すると思われる。