

氏名（本籍）	たなかあきこ 田中章子
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	医博第1738号
学位授与年月日	平成13年3月26日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）内科学系専攻
学位論文題目	活性化末梢血好酸球におけるCCR3を介するケモカイン（eotaxin, RANTES）の作用の検討

（主査）

論文審査委員	教授 白土 邦 男	教授 田 上 八 朗
	教授 近 藤 丘	

論文内容要旨

研究目的

気管支喘息に代表されるアレルギー性炎症反応は、好酸球が最も重要な炎症細胞として認識されている。好酸球はケモカイン受容体 CCR3 を強く発現しており、CCR3 を介して作用する eotaxin, RANTES などは、遊走をはじめとする活性化を好酸球に誘導する。これまで eotaxin や RANTES の生物活性作用を *in vitro* の系で検討するには、主に分離直後の非活性化ヒト末梢血好酸球が用いられてきたが、好酸球は、気道上皮粘膜下に集積する過程で既に活性化されており、CCR3 を介したケモカインの炎症局所での作用を詳細に検討するには不十分と考える。そこで本研究で我々は、CCR3 を介するケモカインの好酸球に対する炎症局所での作用をより詳細に検討するため、アレルギー性炎症の成因に重要なサイトカイン (IL-5, GM-CSF, TNF- α) により活性化した好酸球を用いて、eotaxin と RANTES に対する活性化好酸球の遊走活性と、遊走活性以外の作用について検討した。

研究方法

アレルギー疾患を有さない健康人より末梢血を 200ml 採血し、パーコール比重遠心法、CD16 negative selection により、好酸球を分離精製した (純度 > 99%)。好酸球は、10% FCS 加 RPMI 中で 10ng/ml のサイトカイン (rh IL-5, rh TNF- α , rh GM-CSF) で刺激後、各濃度のケモカイン (rh eotaxin, rh RANTES) を加え、CO₂ 5%, 37°C の条件下で培養した。この活性化した好酸球の遊走活性は、polycarbonate membrane を用いて測定した。また、細胞表面の CCR3 の発現はフローサイトメトリーを用いて測定した。好酸球の細胞内カルシウム濃度は Fura-2 で染色後、蛍光強度計を用いて測定した。細胞の寿命は propidium iodide で染色後フローサイトメトリーで測定し、細胞内サイトカイン量、ロイコトリエン量の測定は、ELISA 法で行った。

研究結果

活性化好酸球の eotaxin に対する遊走反応は、rh IL-5 で刺激 1, 6, 24 時間後に、分離直後の非活性化好酸球に比べて有意に抑制された。rh IL-5, rh TNF- α , rh GM-CSF で刺激 24 時間後の活性化好酸球の eotaxin, RANTES, eotaxin と RANTES 両者に対する遊走反応は、各ケモカイン 10ng/ml の濃度で有意に抑制された。フローサイトメトリーによる活性化好酸球上の CCR3 の発現は、分離直後の好酸球と比べて有意な差を認めなかった。分離直後の好酸球で

は、1ng/ml, 10ng/ml の eotaxin によって細胞内カルシウム濃度が上昇したが、GM-CSF (10 ng/ml) で 24 時間刺激培養した活性化好酸球では、eotaxin による細胞内カルシウム濃度の上昇が増強し、特に 10ng/ml の濃度で、著名な細胞内カルシウム濃度の上昇を認めた。また分離直後の非活性化好酸球と活性化された好酸球ともに、10ng/ml の eotaxin, または RANTES による 48 時間培養刺激で、寿命の延長の増強効果を示さなかった。細胞内 IL-4 量、培養上清中の LTC₄ 量は、分離直後の非活性化好酸球では、eotaxin, RANTES 刺激で有意な増加を認めなかったが、GM-CSF で活性化された好酸球では培養液のみの場合と比べ、eotaxin, RANTES 刺激で有意に IL-4 量、LTC₄ 量の増加を示した。

結 論

活性化された好酸球では、CCR3 発現量低下や CCR3 の機能低下に関係無く、eotaxin や RANTES に対する遊走活性は、分離直後の非活性化好酸球に比べ有意に抑制され、さらに eotaxin や RANTES による細胞内カルシウム濃度上昇の著明な増強作用と共に、細胞内 IL-4 量の増加作用を認めた。以上のことから、CCR3 を介して作用する eotaxin や RANTES は、気道上皮下に集積した活性化好酸球に対し、遊走活性を抑制して局所に貯留させるとともに、IL-4, LTC₄ の産生を刺激して、アレルギー性炎症の持続と増強に関与している可能性が示唆された。

研究の意義・独創的な点

これまで eotaxin や RANTES の生物活性作用については、主に非活性化ヒト末梢血好酸球が用いられ、報告されてきたが、eotaxin や RANTES の主な産生細胞が気道上皮細胞であることから、これらの作用する好酸球は、気道上皮下に浸潤してくる過程ですでに活性化されていると考えられた。そこで、今回我々は活性化好酸球を用いることで、eotaxin や RANTES が好酸球の遊走活性を抑制し、さらに IL-4, LTC₄ の産生を増加させることを明らかにした。以上の結果は、アレルギー性炎症の持続と増強に eotaxin や RANTES が関与するという新しい可能性を示した点で意義がある。

審査結果の要旨

気管支喘息に代表されるアレルギー性炎症反応は、好酸球が最も重要な炎症細胞として認識されている。炎症局所への好酸球の選択的集積は、骨髄での好酸球の増殖・分化、血管内皮細胞への接着、気道粘膜への遊走、活性化や寿命延長等が協調することにより調節されている。好酸球はケモカイン受容体 CCR3 を特異的に発現しており、CCR3 を介して作用する eotaxin, RANTES などのケモカインによって遊走する。好酸球の活性化と寿命延長には、炎症細胞から放出されたサイトカインや細胞外基質などが関与する。活性化され、寿命が延長した好酸球は、遊走し、炎症局所に集積し、ロイコトリエンなどの化学物質を遊離して、気管支平滑筋の収縮や気道の浮腫を引き起こす。

これまで eotaxin や RANTES などのケモカインの生物活性作用を *in vitro* の系で検討する場合、主に分離直後の非活性化ヒト末梢血好酸球が用いられてきた。しかし、これらケモカインの作用する好酸球は、*in vivo* の系で気道上皮粘膜下に集積する過程で既に活性化されており、CCR3 を介したケモカインの炎症局所での作用を詳細に検討するには不十分と考えられる。そこで本研究者は、CCR3 を介するケモカインの好酸球に対する炎症局所での作用をより詳細に検討するため、生体内で活性化されながら気道粘膜下に集積してきた好酸球のモデルとして、ヒト末梢血から分離精製した好酸球をアレルギー性炎症の成因として重要なサイトカイン (IL-5, GM-CSF, TNF- α) で活性化し、CCR3 の発現と、eotaxin と RANTES の CCR3 を介した作用について検討している。

その結果、活性化された好酸球では CCR3 発現量低下や CCR3 の機能低下に関係無く eotaxin や RANTES に対する遊走活性が分離直後の非活性化好酸球に比べ明らかに抑制されること、さらに eotaxin や RANTES による細胞内カルシウム濃度上昇の著明な増強と共に、細胞内 IL-4 量の増加、LTC₄ の産生増加を認めている。以上のことから、CCR3 を介して作用する eotaxin や RANTES は、気道上皮下に集積した活性化好酸球に対し、遊走活性を抑制して局所に停留させるとともに、IL-4, LTC₄ の産生を刺激して、アレルギー性炎症の持続と増強に関与している可能性が示唆される。活性化した好酸球において IL-4, LTC₄ の産生が増強するという報告はこれまでになく、本研究は eotaxin や RANTES が走化作用以外にアレルギー性炎症の持続と増強に関与するという新しい知見を示した点で大変意義深い。したがって、本研究は学位論文に値する。