

氏 名 (本籍)	おく 奥	つ 津	みつ 光	はる 晴
学 位 の 種 類	博 士 ( 障 害 科 学 )			
学 位 記 番 号	医 博 ( 障 ) 第 4 6 号			
学 位 授 与 年 月 日	平 成 14 年 3 月 25 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 ) 障 害 科 学 専 攻			
学 位 論 文 題 目	Exercise-induced expression of chemokine receptor CXCR4 in human lymphocytes ( 運 動 に よ る ヒ ト リ ン パ 球 の ケ モ カ イ ン レ セ プ タ ー CXCR4 の 発 現 )			

(主 査)

論 文 審 査 委 員	教 授 大 森 浩 明	教 授 福 土	審
	教 授 菅 村 和 夫		

## 論文内容要旨

免疫細胞は生体内を速やかに移動することにより外来抗原の侵入防御および侵入後早期における抗原排除を行うことができる。一過性の運動後は免疫細胞、とりわけ T 細胞および NK 細胞の分布が変化する。Glucocorticoid の投与は T 細胞および NK 細胞の分布を変化させる。Glucocorticoids は運動負荷時に分泌される代表的な内分泌系因子であることから、運動負荷時の T 細胞および NK 細胞の分布の変化は glucocorticoids に依存していると考えられている。しかし、そのメカニズムは明らかにされていない。そこで本研究では、運動負荷後におこる T 細胞および NK 細胞の分布変化のメカニズムを明らかにするために、細胞の移動に重要な受容体として報告されている CCR7 および CXCR4 の発現と glucocorticoids の関連について検討した。

被験者は成人男子7名であった。末梢血から単核球を比重分離後、cortisol を添加し24, 48, 72時間培養後に Flow-cytometer にて T 細胞および NK 細胞の CCR7 と CXCR4 の発現を解析した。その結果、CXCR4 の発現は培養時間および cortisol 濃度依存的に増強したが、CCR7 の発現に変化は観察されなかった。さらに、この変化は単核球を72時間培養し、cortisol の添加時間をその内の6時間のみとした場合でも観察された。次に、これらの変化が実際の運動負荷時でも観察されるか否かを検討するために、被験者に90分間の運動を負荷し、CXCR4 の発現を *in vivo*, *ex vivo* および *in vitro* で観察した。血漿中 cortisol は  $13.8 \pm 1.1$  ug/dl から  $18.6 \pm 1.8$  ug/dl へ増加した。*In vivo* での変化を観察するために、運動負荷前、直後、1日後、3日後の末梢血から単核球を比重分離し、細胞の CXCR4 の発現を観察した。その結果、運動負荷前に比べて、負荷直後は同レベルであるが、1日後、3日後は CXCR4 の発現の低下が観察された。しかしながら、運動負荷前、直後、1日後の単核球を culture medium で72時間培養し、CXCR4 の発現を観察した結果、運動負荷直後の単核球は CXCR4 の発現が運動負荷前の細胞と比べて高値を示した。また、運動負荷前、直後、1日後に末梢血から分離した血漿を運動負荷5日後以降の単核球に25%の濃度で添加し72時間培養した結果、運動負荷前に比べて運動負荷直後の血漿添加では CXCR4 の発現が増強した。運動負荷1日後の血漿添加では変化は観察されず、運動負荷直後の CXCR4 の発現の増強は glucocorticoids 受容体の antagonist である RU486 添加により抑制された。さらに、単核球を72時間培養し、血漿の添加時間をその内の6時間のみとした場合でも CXCR4 の発現が運動負荷直後は運動負荷前の細胞と比べて高値を示した。最後に、cortisol および血漿添加による CXCR4 の発現の増加が機能的なものであるか否かを検討するために migration assay を行った。その結果、T 細胞の浸潤能は cortisol 濃度依存的に増加し、運動負荷直後の血漿刺激でも運動負荷前と比較して T 細胞の浸潤能が高かった。

以上の結果，運動負荷時に分泌される cortisol は T 細胞および NK 細胞の CXCR4 の発現を短時間の暴露でも 72 時間後に増強させることが明らかとなった。また，*in vivo* での CXCR4 の減少は cortisol により CXCR4 の発現が増強された細胞が CXCR4 のリガンド産生部位へ移動したことにより，血中から失われたためであることが推測された。このことは運動負荷にともなう cortisol の増加が CXCR4 の発現を変化させ，細胞の分布を調節している可能性を示唆している。

## 審査結果の要旨

リンパ球は生体防御の中心的役割を担っている。侵入した外来抗原を早期に効率良く排除するためには、生体内におけるリンパ球の分布状況が大きく関与する。運動後に観察される免疫応答の変化は、リンパ球の分布変化が原因と考えられている。著者は、運動後に観察される T 細胞および NK 細胞の分布変化のメカニズムを解明するために、細胞の移動に重要な受容体として報告されている CCR7 および CXCR4 の発現とグルココルチコイドの関連について検証した。

末梢血から単核球を比重分離後、コルチゾールを添加し 24, 48, 72 時間培養後に T 細胞および NK 細胞の CCR7 と CXCR4 の発現を解析した。その結果、CXCR4 の発現は培養時間およびコルチゾール濃度に依存して増強したが、CCR7 の発現変化は観察されなかった。さらに、CXCR4 の発現はコルチゾールの添加時間をその内の 6 時間のみとした場合でも増強した。

次に、CXCR4 の変化が実際の運動負荷時でも観察されるか否かを検討するために、被験者に一過性の運動を負荷し、CXCR4 の発現を観察した。その結果、*in vivo* では、運動負荷前に比べて負荷直後は同レベルであるが、1 日後、3 日後は CXCR4 の低下が観察された。しかし、運動負荷前、直後、1 日後の単核球を 72 時間培養すると、運動負荷直後の発現は運動負荷前の細胞と比べて高値を示した。

*in vivo* での CXCR4 の減少はコルチゾールにより CXCR4 の発現が増強された細胞が CXCR4 のリガンド産生部位へ移動したことにより、血中から失われたためであると推測し、それを立証するために、運動負荷前、直後、1 日後の血漿を単核球に 25% の濃度で添加し 72 時間培養した。その結果、運動負荷前に比べて運動負荷直後の血漿添加では CXCR4 の発現が増強した。運動負荷直後の CXCR4 の発現の増強はグルココルチコイド受容体のアンタゴニストである RU 486 添加により抑制された。さらに、単核球を 72 時間培養し、血漿の添加時間をその内の 6 時間のみとした場合でも CXCR4 の発現が運動負荷直後は運動負荷前の細胞と比べて高値を示した。

最後に、コルチゾールおよび血漿添加による CXCR4 の発現の増加が機能的なものか否かを検討した結果、T 細胞の浸潤能はコルチゾール濃度依存的に増加し、運動負荷直後の血漿刺激でも運動負荷前と比較して T 細胞の浸潤能は高かった。

本研究は、運動時に観察されるリンパ球の分布変化が、コルチゾールの分泌増加にともなう CXCR4 の発現の増強が原因であることを明らかにした。今後、免疫応答と内分泌系因子の関連性を解明する上で、極めて有用な情報となることが期待できる成果を得た。よって、本論文は学位論文としての水準を十分に満たし、かつ学位授与に値すると判定する。