

# Nara Women's University Digital Information Repository

Title	Regulation of activation and survival of eosinophils in immune and allergic reaction : Abstract of the Dissertation and the Summary of the Examination Results
Author(s)	寺川, 真紀; 鈴木, 孝仁; 渡邊, 利雄; 坂口, 修一
Citation	博士学位論文 内容の要旨及び審査の結果の要旨, Vol.25, pp.192-196
Issue Date	2008-08
Description	博士(理学),博論第142号,平成19年10月25日授与
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10935/1371">http://hdl.handle.net/10935/1371</a>
Textversion	publisher

This document is downloaded at: 2019-01-16T08:41:17Z

氏名（本籍）	寺川真紀（奈良県）
学位の種類	博士（理学）
学位記番号	博論第142号
学位授与年月日	平成19年10月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当 人間文化研究科
論文題目	Regulation of activation and survival of eosinophils in immune and allergic reaction (免疫及びアレルギーにおける好酸球の役割及びその機序に 関する研究)
論文審査委員	(委員長) 教授 鈴木孝仁 教授 渡邊利雄 准教授 坂口修一

## 論文内容の要旨

好酸球は1879年 Ehrlich によって酸性色素によりその顆粒が赤く染まる細胞として確認された。好酸球は、寄生虫感染以外に、喘息やアトピー性皮膚炎といったアレルギー疾患患者の血中あるいは組織中で増多が生じ、エフェクター細胞として重要な役割を果たすことが知られている。好酸球は炎症局所に集積し、組織障害性を有する顆粒蛋白、サイトカイン、ケミカルメディエーターを遊離することにより、組織障害や炎症を惹起する。好酸球がアレルギー反応の場に動員され作用を発現するにはいくつかの過程が存在する。この過程には、好酸球産生を促す因子の産生、骨髄における好酸球増殖・分化、循環血への移行、アレルギー反応局所・組織への接着・浸潤、好酸球の活性化などが含まれ、種々のサイトカインや、多くの接着分子等が複雑に関与していると考えられるが、生体内における好酸球の遊走や活性化の場で、実際にどの因子が主要な役割を果たし、どのようなメカニズムで作用しているかについてはなお不明な点が多い。

本研究では、免疫及びアレルギーにおける好酸球の役割及びその機序を解析することを目的に、好酸球に対するマスト細胞キマーゼの作用及びその機序、ならびに好酸球の生存における Toll-like receptors (TLR9及び CD30) の役割に関して解析を行った。

### 第1章 マスト細胞由来キマーゼによる好酸球活性化機構の解析

アトピー性皮膚炎患者の皮膚においてはマスト細胞や好酸球といった炎症性細胞が顕著に増加して

いることが報告されている。マスト細胞は細胞表面に発現する IgE 受容体の刺激により、脱顆粒を起こし、顆粒中に含まれるヒスタミン、トリプターゼ、キマーゼなどの炎症性メディエーターが遊離され、I 型アレルギー反応が誘導される。キマーゼはマスト細胞に特異的に発現し、脱顆粒に伴って遊離されるキモトリプシン様酵素であるが、その病態生理的意義は必ずしも明確ではない。

好酸球は、マスト細胞から遊離されたこれらメディエーターにより遊走し、また脱顆粒を起こすことが知られており、マスト細胞と好酸球におけるクロストークが炎症の増悪化を誘導することが示唆されてきた。本研究の第 1 章では、マスト細胞と好酸球におけるクロストークを解析する目的で、好酸球の活性化におけるマスト細胞キマーゼの作用及びその機序について検討した。その結果、好酸球様細胞株である EoL-1 (Butyric acid により分化誘導) およびマウス好酸球において、ヒトキマーゼおよびマウスキマーゼ (mMCP-4) が、その細胞遊走能を亢進すること、及び細胞内の MAP キナーゼの ERK および p38 のリン酸化を誘導することが明らかとなった。また、キマーゼによって誘導される好酸球遊走は、ERK (MEK) 阻害剤や G 蛋白阻害剤によって阻害され、MAP キナーゼ経路や G 蛋白共役型受容体の関与が示唆された。以上の結果は、キマーゼによる好酸球の活性化において Protease-activated receptor (PAR) の様な受容体を介する可能性を示唆する。

## 第 2 章 マスト細胞由来キマーゼ刺激好酸球のアレルギー炎症における役割解析

好酸球は組織への浸潤後、炎症部位において EDN (eosinophilic cationic protein)、MBP (major basic protein)、EPO (eosinophil peroxidase) といった組織障害性の顆粒蛋白を放出し、炎症の増悪化を誘導することが知られている。しかしながら、好酸球は様々な刺激により、顆粒蛋白のみならず、サイトカインやケモカインを産生しすることが報告されている。本研究の第 2 章では、キマーゼによる好酸球からの各種サイトカイン・ケモカイン産生作用について検討した。その結果、好酸球様細胞株である EoL-1 (Butyric acid により分化誘導) がヒトキマーゼ刺激により好中球の遊走因子である IL-8 を産生すること、ならびにマウス好酸球がマウスキマーゼ (mMCP-4) 刺激により、IL-8 のマウスアナログである MIP-2 を産生することが明らかとなった。また、この IL-8 (MIP-2) 産生は GPCR および MAP キナーゼ (p38, ERK) のリン酸化を介し誘導されていることが示された。さらに、*in vivo* においても、キマーゼをマウスに皮下投与することにより、組織への好酸球浸潤が誘導されるとともに、組織における MIP-2 産生が亢進し、好中球の浸潤が誘導されることが明らかとなった。以上の結果は、好酸球が、キマーゼによる IL-8/MIP-2 産生誘導を介し、炎症反応の増悪化・制御に関与する可能性を示唆する。

## 第 3 章 自然免疫における好酸球の作用解析

近年、自然免疫には Toll-like receptors (TLR) が関与していることが明らかとなっている。ヒト TLR は 1-10 の存在が明らかとなっており、感染時等には、これら TLR を介して Th1 反応が誘導される。TLR は様々な細胞で発現が報告されているが、好酸球においても TLR7・9 といった発現

が明らかとなっており、好酸球の TLR7 を刺激することにより、superoxide が産生されることが報告されている。TLR9 は微生物由来 DNA に含まれる非メチル化 CpG 繰り返し配列 (5'-CG-3') (以下 CpG) をリガンドとして認識し、抗原提示細胞表面の抗原提示分子発現を増強するなど Th1 タイプの免疫反応を活性化することが示されているが、好酸球における TLR9 の役割はほとんど知られていない。本研究の第 3 章では、好酸球における TLR9 の役割を解析した。その結果、plasmacytoid 樹状細胞等の存在下で、CpG が type I-IFN の産生を介し好酸球の生存延長を誘導することが明らかとなった。一方、plasmacytoid 樹状細胞等の非存在下では、CpG の好酸球生存延長作用は認められず、サイトカイン・ケモカイン産生や脱顆粒反応誘導も見られなかった。以上、好酸球において、TLR9 が間接的に生存延長作用に関与する可能性が示唆された。

#### 第 4 章 好酸球の作用制御に関する解析

好酸球は GM-CSF、IL-3、IL-5 等のサイトカインにより、生存延長や活性化が誘導され、これらのサイトカインの非存在下ではアポトーシスを起こす。一方、IL-4 や TGF- $\beta$  等のサイトカインはアポトーシスを誘導し、Fas/APO-1 や CD69 などを経してもアポトーシスが誘導される。従って、好酸球が関与するアレルギー炎症は、好酸球に対するこれらのアポトーシス刺激によって制御されているといえる。実際に抗 IL-5 中和抗体あるいは抗 Fas 抗体が気管支喘息の動物モデルで薬効を示すことが報告されてきた。アポトーシスを誘導する分子としては、TNF レセプターファミリーのメンバーが広く知られている。CD30 は 1992 年にホジキンリンパ腫の Reed-Sternberg 細胞の表面抗原分子 Ki-1 として同定された分子で、TNF レセプターファミリーに属する。CD30 は、activated T 細胞、Th2、Tc2、CD8、gd T 細胞、NK 細胞など、様々な細胞での発現が報告されているものの、その生理学的な意義は必ずしも明確ではない。本研究の第 4 章では、好酸球における CD30 発現の発現とその機能について検討を行った。その結果、ヒト末梢血好酸球や臍帯血由来培養好酸球において CD30 が発現していること、好酸球の細胞表面の CD30 を刺激することによって迅速かつ強力にアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。以上の結果は、CD30 が好酸球のアポトーシスに重要な役割を果たす可能性を示し、CD30 を介した刺激、あるいはそのメカニズムに関わる分子を標的とした好酸球へのアポトーシス誘導が、好酸球増多性疾患や好酸球の活性化を伴う疾患において、有用な治療法となる可能性を示唆する。

以上、本研究では、好酸球に対するマスト細胞キマーゼの作用及びその機序が明らかとなり、また好酸球の生死に細胞表面蛋白 TLR9 及び CD30 が関与することが始めて示された。これらの成果は、アレルギー性炎症における好酸球の役割の一端を明らかにするものであるだけでなく、好酸球を標的としたアレルギー疾患治療薬の開発の標的を示唆するものである。

## 論文審査の結果の要旨

好酸球は、寄生虫感染以外に、喘息やアトピー性皮膚炎といったアレルギー疾患患者の血中あるいは組織中で増多が生じ、エフェクター細胞として重要な役割を果たすことが知られている。アトピー性皮膚炎患者の皮膚においては、マスト細胞や好酸球といった炎症性細胞が顕著に増加し、I型アレルギー反応が誘導される。

本研究では、免疫及びアレルギーにおける好酸球の役割及びその機序を解析することを目的に、好酸球に対するマスト細胞キマーゼの作用及びその機序、ならびに好酸球の生存における Toll-like receptors (TLR) 及び CD30の役割に関して解析を行っている。

第1章では、好酸球の活性化におけるマスト細胞キマーゼの作用及びその機序について検討している。マスト細胞の脱顆粒によって生じる炎症性メディエーターが、好酸球に遊走と脱顆粒を引き起こし、マスト細胞と好酸球におけるクロストークが炎症の増悪を誘導することが示唆されてきた。酪酸処理によって好酸球様細胞に分化するヒト EoL-1細胞株およびマウス好酸球を用いて、マスト細胞に由来するヒトキマーゼおよびマウスキマーゼ (mMCP-4) が、好酸球の細胞遊走能を亢進すること、及び細胞内の MAP キナーゼの ERK および p38のリン酸化を誘導すること、及び阻害剤による実験から、キマーゼによって誘導される好酸球遊走には、MAP キナーゼ経路や G 蛋白共役型受容体が関与していることを示唆している。さらに、キマーゼによる好酸球の活性化において Protease-activated receptor (PAR) の様な受容体を介する可能性に言及している。

第2章では、マスト細胞由来キマーゼによって、好酸球が産生する各種サイトカイン・ケモカインについて検討している。酪酸処理した EoL-1細胞株では、ヒトキマーゼ刺激により、好中球の遊走因子である IL-8を産生すること、マウス好酸球でも同様に、マウスキマーゼ (mMCP-4) 刺激により、IL-8のマウスアナログである MIP-2を産生することを明らかにしている。また、いずれの IL-8 (MIP-2) 産生でも、GPCR および MAP キナーゼ (p38, ERK) のリン酸化を介し誘導されていることを示している。さらにキマーゼをマウスに皮内投与することにより、組織への好酸球浸潤が誘導されるとともに、組織における MIP-2産生が亢進し、好中球の浸潤が誘導されることを示している。

病原体や異物を幅広く感知する自然免疫のセンサーとして Toll-like receptors (TLR) の関与が最近明らかとなった。好酸球では、TLR9が発現され、微生物由来 DNA に含まれる非メチル化 CpG 繰り返し配列 (5'-CG-3') (以下 CpG) をリガンドとして認識し、抗原提示細胞表面の抗原提示分子発現を増強するなどして、獲得免疫反応を活性化する役割が示唆されてきた。第3章では、好酸球における TLR9の役割を解析している。plasmacytoid 樹状細胞の存在下で、CpG が type I-IFN の産

生を介し好酸球の生存延長を誘導することを明らかとしている。

第4章では、好酸球におけるCD30発現の発現とその機能について検討を行っている。CD30とは1992年にホジキンリンパ腫のReed-Sternberg細胞の表面抗原分子Ki-1として同定された分子で、アポトーシスを誘導するはたらきが知られている。

本論文では、ヒト末梢血好酸球や臍帯血由来培養好酸球においてCD30が発現していること、好酸球の細胞表面のCD30を刺激することによって迅速かつ強力にアポトーシスが誘導されることを明らかにしている。この研究結果から、好酸球増多性疾患や好酸球の活性化を伴うヒト疾患の有用な治療法として、CD30を介した刺激、あるいはそのメカニズムに関わる分子を標的とした好酸球へのアポトーシス誘導の可能性を示唆している。

以上から、本論文で記載された研究の成果は、アレルギー性炎症における好酸球の役割の一端を明らかにするものであるだけでなく、好酸球を標的としたアレルギー疾患治療薬の開発の標的を示唆するものとなっている。