

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類

博 士

氏 名

柳内 充

学 位 論 文 題 目

A role of CCL22/macrophage derived chemokine in allergic rhinitis

(邦題：アレルギー性鼻炎患者における
CCL22/macrophage derived chemokine の役割)

共 著 者 名

佐藤 啓介

青木 直子

滝山 由美

及川 賢輔

小林 博也

木村 昭治

原 洩 保明

立野 正敏

(未 公 表)

I. 研究目的

シラカンバ花粉症・アレルギー性鼻炎は、北米、北欧に多く、日本では主に北海道に認められる疾患である。アレルギー性鼻炎患者における、T細胞に抗原を提示し免疫応答を開始する抗原提示細胞に関する研究は散見されるのみで、抗原提示細胞の機能はいまだ不明な点が多い。アレルギー性鼻炎の発症機序を考え、さらに効果的な免疫療法等を開発するうえで抗原提示細胞の機能解析は重要な役割を持つと考える。

本研究では、強力な抗原提示細胞である樹状細胞を用いて、シラカンバ花粉症患者と健常者での抗原刺激後の mRNA を cDNA アレイを用いてスクリーニングし、明らかな差異のあった mRNA に関して蛋白発現の差異について検討を行った。さらに、その蛋白に関してシラカンバ花粉症発症に関わる機序を解析した。

II. 材料・方法

1. シラカンバ花粉症患者および健常者

シラカンバ花粉飛散時期に一致して臨床症状を有し、シラカンバ花粉抗原に対する RAST またはプリックテスト陽性である患者 7 名、及びアトピー素因のない健常者 5 名の末梢血単核球を用いた。採血にあたってはインフォームドコンセントを得た。cDNA アレイスクリーニングでは患者、健常者それぞれ 3 名で比較検討した。

2. シラカンバ花粉粗抗原の抽出

日本産シラカンバ花粉 1g を 10mM リン酸緩衝液(pH7.4)100ml に溶解し、4°C で 4 時間静置した。上清を回収しシラカンバ花粉粗抗原とした。粗抗原の蛋白量は BCA 法にて決定した。

3. 樹状細胞の培養

患者及び健常者末梢血より比重遠心法にて単核球を分離後、MACS カラム(Miltenyi 社製)を用いて CD14 陽性細胞を分離し、GM-CSF、IL-4 添加 10%ウシ胎児血清を含む RPMI-1640 培地 (以下 RPMI-10%FBS 培地) にて 7 日間培養し樹状細胞とした。cDNA アレイスクリーニングでは、末梢血単核球を 6 穴プレートにて 2 時間静置し、付着した細胞を GM-CSF および IL-4 添加 RPMI-10%FBS 培地にて 7 日間培養し樹状細胞とした。

4. フローサイトメトリー

3. で培養した樹状細胞の表面分子を蛍光色素標識単クローン抗体で染色し、フローサイトメーターにて解析した。用いた抗体は抗 CD1a、抗 CD14、抗 CD40、抗 CD80、抗 CD83、抗 CD86、抗 HLA-DR (コールター社製) である。

5. RNA 抽出と cDNA アレイ解析

培養した樹状細胞に粗抗原抽出液を 20 μ g/ml となるよう添加し、37°C で 1 時間刺激した。刺激後、セバゾール (ナカライテスク社製) を用いて RNA を抽出した。各人から得られた RNA をそれぞれ同量ずつ混合し、患者群 RNA、健常者群 RNA とした。それぞれの RNA を SMART cDNA amplification kit (クロンテック社製) にて逆転写した後増幅し、³²P 標識の後、cDNA アレイ (クロンテック社製) にハイブリダイズした。結果は BAS2000 システム (富士写真フイルム社製) を用いて補正した値で比較検討した。

6. ケモカイン量測定

cDNA アレイで発現差のあった CCL22/MDC(macrophage derived chemokine) および CCL3/MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α)について、抗原刺激樹状細胞培養上清をサンドイッチ ELISA 法 (R&D 社製) にて解析した。

7. 細胞遊走試験

樹状細胞を 24 穴プレートにて培養し、花粉粗抗原抽出液を添加して刺激した。24 時間後、上清をケモタキシスチャンバーの下層に移した。チャンバーの上層には MACS カラムで分離した CD4⁺陽性 T 細胞を

加えた。24時間後、チャンバー下層に遊走した細胞を回収し、フローサイトメーターにて細胞数をカウントした。さらに、抗 CCR4 抗体、抗 CCR5 抗体（ファーマンジェン社製）を用いて遊走した T 細胞を染色し、フローサイトメーターにてケモカインレセプターの発現を検討した。

8. 免疫組織化学的検討

シラカンバ花粉症 3 名、鼻中隔彎曲症・肥厚性鼻炎 3 名の鼻甲介粘膜切除術より得られた鼻粘膜凍結切片を、抗 MDC 抗体（ペプロテック社製）、抗 CD1a 抗体、抗 CD83 抗体（コールター社製）を用いて免疫染色した。手術検体の使用にあたり患者から同意を得た。

III. 成績

1. フローサイトメーターによる樹状細胞表面マーカーの解析

付着細胞及び MACS にて分離した CD14 陽性細胞を IL-4, GM-CSF 存在下で 7 日間培養し、細胞の表面マーカーをフローサイトメーターにて検討した。いずれも HLA-DR、CD40、CD1a、CD80 陽性、CD14、CD83、CD86 陰性であり過去の報告と同様であった。このことから培養細胞は樹状細胞であると考えられた。

2. cDNA アレイによる解析

cDNA アレイにより mRNA の発現を比較検討すると、種々の mRNA に発現差を認めた。なかでも CCL22/MDC は、患者では健常者と比較して約 30 倍の発現増強が見られた。ケモカインに着目して比較すると CCL17/TARC(Thymus and Activation-Regulated Chemokine) が患者 / 健常者比 1.1, CCL17/RANTES(Regulated upon Activation, Normal T Expressed and Secreted)が 0.84 とほぼかわりがなかったのに対して、CCL3/MIP-1 α 、CCL4/MIP-1 β (Macrophage Inflammatory Protein-1 β)は患者において発現の低下が見られ、患者 / 健常者比はそれぞれ 0.54、0.56 と患者では約 1/2 であった。以上の結果から樹状細胞の抗原刺激によるケモカイン産生について詳細に検討することとした。

3. ケモカインの産生量の検討

患者で mRNA 発現の増強が見られた CCL22/MDC と mRNA 発現減少を示した CCL3/MIP-1 α について培養上清中に産生される量をサンドイッチ ELISA 法にて定量したところ、刺激後 24 時間で CCL22/MDC は患者で健常者の約 2 倍産生されており、有意に上昇していた。また、CCL3/MIP-1 α では反対に約半分と有意に減少しており、cDNA アレイによる mRNA の発現差を反映していた。

4. 細胞遊走試験での検討

CCL22/MDC の産生が T 細胞の遊走に機能的に関わっているかどうか検討するため、抗原刺激下に遊走する細胞数を比較検討したところ、患者群では花粉粗抗原抽出液により有意に細胞数が増加した。下層に抗 CCL22/MDC 抗体を加えて培養したところ、細胞数に減少傾向が見られた。

5. 遊走細胞のフローサイトメーターによる解析

細胞遊走試験で遊走してきた患者T細胞を抗 CCR4 抗体、抗 CCR5 抗体で染色しフローサイトメーターで解析したところ、非刺激時のものでは CCR4、CCR5 陽性の細胞がそれぞれ遊走してきていたが、シラカンバ花粉粗抗原抽出液で刺激したものでは主に CCR5 陽性細胞は減少し、CCR4 陽性細胞の割合が増加していた。

6. 免疫組織化学的検討

連続切片にて、患者鼻粘膜には3名とも CD1a、CD83 陽性細胞が上皮下に集簇を形成し存在していた。さらに、その細胞表面には CCL22/MDC が陽性となっていた。それに対して健常者鼻粘膜は3名とも CD83 陽性細胞は認められたが CD1a 陽性細胞は少数で、CCL22/MDC の発現は全く認められなかった。

IV. 考案

本研究では CCL22/MDC がシラカンバ花粉症患者由来樹状細胞で多く産生されていること、細胞遊走試験においてより多くの T 細胞を遊走させ得ること、遊走した細胞の多くは CCR4 陽性の Th2 細胞であること、患者由来鼻粘膜において CD83 陽性細胞膜に一致して CCL22/MDC が見られ、鼻粘膜に存在する樹状細胞より CCL22/MDC が産生されていることを見出した。CCL22/MDC は 1997 年に Godiska ら¹⁾によって始めて報告された CC ケモカインである。当初、マクロファージより産生されるケモカインとして報告されたが、その後活性化 T 細胞や樹状細胞より産生されることが報告され、現在では樹状細胞から主に産生され T 細胞の遊走に関与していると考えられている。CCL22/MDC は CCR4 をレセプターとしているが、CCR4 は主に Th2 細胞に発現していることから、アレルギー性疾患との関連が指摘されている。アトピー性皮膚炎、喘息で発現が亢進していること、Kakinuma ら²⁾によると血清 CCL22/MDC レベルはアトピー性皮膚炎の病勢と相関することが報告されているが、CCL22/MDC とアレルギー性鼻炎（シラカンバ花粉症）の関連を明らかにしたのは本研究が最初である。アレルギー性鼻炎における樹状細胞の役割を報告した Hammad ら³⁾の報告とあわせるとアレルギー性鼻炎患者における樹状細胞の役割は 1) 樹状細胞は CCL22/MDC の産生により T 細胞を遊走させ、サイトカイン環境と共分子刺激により Th2 に分化成熟させる。2) Th2 細胞は B 細胞を分化成熟させ IgE 産生を促すと同時に IL-4、IL-13 を産生する。3) それらにより Th2 細胞自身も CCL22/MDC を産生し、より多くの T 細胞を Th2 に分化させる。4) このサーキットが続くことにより樹状細胞は T 細胞を継続的に Th2 に分化成熟させ続け、アレルギー性炎症を完成させると考えられた。以上のことから、将来的に CCL22/MDC またはそのリガンドである CCR4 を標的とした治療法の開発がシラカンバ花粉症の治療に有効となることが期待でき、今後の検討課題であると考えられた。





V. 結論

1. シラカンバ花粉症患者における樹状細胞の機能を cDNA アレイを用いて解析したところ、CC ケモカインである CCL22/MDC の産生が亢進していた。
2. 細胞遊走試験によって、シラカンバ花粉抗原で刺激した上清では遊走する T 細胞が増加しており、その大部分は CCR4 陽性の Th2 細胞であった。また、この遊走は抗 CCL22/MDC 抗体を加えることにより減少した。
3. シラカンバ花粉症患者由来鼻粘膜において CD83 陽性細胞表面に CCL22/MDC が染色されていることから、局所での産生が示唆された。
4. 以上の結果よりシラカンバ花粉症患者ではその病態に CCL22/MDC が関与していると考えられた。

VI. 参考文献

1. Godiska, R., D. Chantry, C. J. Raport, S. Sozzani, P. Allavena, D. Leviten, A. Mantovani, and P. W. Gray. 1997. Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells. *J Exp Med* 185:1595.
2. Kakinuma, T., K. Nakamura, M. Wakugawa, H. Mitsui, Y. Tada, H. Saeki, H. Torii, M. Komine, A. Asahina, and K. Tamaki. 2002. Serum macrophage-derived chemokine (MDC) levels are closely related with the disease activity of atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol* 127:270.
3. Hammad, H., A. S. Charbonnier, C. Duez, A. Jacquet, G. A. Stewart, A. B. Tonnel, and J. Pestel. 2001. Th2 polarization by Der p 1--pulsed monocyte-derived dendritic cells is due to the allergic status of the donors. *Blood* 98:1135.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	柳内 充
<p>審査委員長 若宮 伸隆 </p> <p>審査委員 高後 祐 </p> <p>審査委員 原 潤 保 明 </p> <p>審査委員 立野 正 敏 </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>A role of CCL22/macrophage derived chemokine in allergic rhinitis (アレルギー性鼻炎患者における CCL22/macrophage derived chemokine の役割)</p>			
<p>アレルギー性鼻炎は、非常にありふれた病気でありながら、その抜本的な治療法については未だ確固したものは存在していない。その原因として、抗原となるアレルギーについては多くの研究と知見があるも関わらず、その抗原提示に関わる細胞機能については未だ不明の点が多く、それを解析検討することは、病態の解明および新しい治療法の開発に極めて有用であると考えられる。</p> <p>本論文は、シラカンバ花粉症患者由来樹状細胞をもちいて、CCL22/Macrophage Derived Chemokine (MDC)が <i>in vitro</i> および生体内で産生されていること、さらにその機能が Th2 細胞を選択的に遊走させることを検討し、本因子のアレルギー性鼻炎病態における役割を考察したものである。</p> <p>はじめにシラカンバ花粉症患者および健常者由来の樹状細胞をシラカンバ花粉可溶性抗原で刺激し、両細胞中の mRNA 発現を cDNA アレイをもちいて比較検討した。その結果、発現差が一番大きかったのは CCL22/MDC であり、健常者の約 30 倍であった。その他のケモカインでは、Th1 細胞との関連が報告されている CCL3/macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1α)では患者群で発現が低下していた。</p>			

次に、患者樹状細胞の mRNA レベルで発現増大を認めた CCL22/MDC および発現低下を認めた CCL3/MIP-1 α について、培養上清において ELISA 法で両蛋白量を検討した。培養 24 時間後、CCL22/MDC 産生は患者群では健常者と比較して約 2 倍となり、対照的に CCL3/MIP-1 α では約半分となっていた。これは cDNA アレイを用いた mRNA 発現の結果を反映しており、シラカンバ花粉症患者由来樹状細胞においてシラカンバ花粉可溶化抗原刺激により CCL22/MDC がより多く産生されることが明らかとなった。

CCL22/MDC が反応局所である鼻粘膜において産生されているかどうかを確認するため、手術材料を免疫組織染色で検討した。その結果、患者由来鼻粘膜では明らかに多くの CCL22/MDC 陽性細胞を認めたのに対し、健常者群では陽性細胞はごく僅かであった。連続切片で樹状細胞マーカーである CD83 および CD1a の発現を検討したところ、CCL22/MDC 陽性細胞は CD83 および CD1a 陽性であり、患者鼻粘膜においても樹状細胞から CCL22/MDC が産生されていることが確認された。

次に CCL22/MDC の機能的意義を検討するために、シラカンバ花粉可溶化抗原添加時における細胞遊走試験を行った。その結果、抗原刺激により患者群では多くの T 細胞が遊走し、さらに本遊走は抗 CCL22/MDC 抗体により減少した。さらに、患者群での遊走細胞はフローサイトメーターによる解析から、おもに Th2 細胞であることが明らかになった。

以上のことから、本研究では、シラカンバ花粉症患者において、CC ケモカインの一種である CCL22/MDC が、細胞培養系と実際の患者局所における樹状細胞から産生されていることを明らかにし、更に本因子によりアレルギーの病態に関わると考えられている Th2 細胞の細胞遊走がおこることを明らかにしたものである。

本研究は、アレルギー性鼻炎患者由来樹状細胞における CCL22/MDC の役割について明らかにした最初の報告である。得られた知見は今後、アレルギー性鼻炎の治療法に役立つ可能性があり、臨床的にも意義深いと考えられた。

また、論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ論理的回答がなされ、関連分野に関する十分な知識を有していることが認められた。

以上の内容から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位論文として値するものであると判定した。