

平成 21年 2月

富長岳史 学位論文審査要旨

主 査 井 上 幸 次
副主査 北 野 博 也
同 林 一 彦

主論文

マウスアレルギー性結膜炎におけるmonocyte chemoattractant protein(MCP)-1/C-C chemokine receptor-2(CCR2)の役割

(著者：富長岳史)

平成21年 米子医学雑誌 掲載予定

学 位 論 文 要 旨

マウスアレルギー性結膜炎におけるmonocyte chemoattractant protein (MCP)-1/CCR2 chemokine receptor-2 (CCR2)の役割

アレルギー性結膜炎には種々の分子が関与しているが、最近、MCP-1が、重症アレルギー性結膜炎患者の涙液中で増大していることが報告されている。しかし、MCP-1がアレルギー性結膜炎において果たしている役割については知られていない。そこで、MCP-1/CCR2経路がアレルギー性結膜炎遅発相に特徴的な局所への好酸球浸潤にどのような役割を果たしているか検討した。

方 法

実験には6週齢の雌のSWR/J マウスを用いた。麻酔下にてブタクサ花粉50 μg と水酸化アルミニウム1 mgのリン酸緩衝溶液 (PBS)懸濁液を両足蹠注射して感作した。なお、未感作群には水酸化アルミニウム1 mgとPBSのみを注射した。感作後6週に、抗MCP-1抗体/CCR2阻害剤あるいは対照としてコントロールIgG/PBSを投与した。その後、ブタクサ花粉懸濁液を点眼し、アレルギー性結膜炎を誘発させた。ブタクサ花粉点眼24時間後に眼球摘出を行い、4%パラホルムアルデヒドで固定した。そして、眼球を樹脂包埋し3 μm の連続した矢状断組織切片を作製し、ギムザ染色を行ない各切片で結膜円蓋部における好酸球数を計測した。次に、ブタクサ花粉点眼24時間後に頸部リンパ節、血清を採取した。頸部リンパ節からリンパ球を分離しブタクサ花粉抽出物によるリンパ球刺激試験を行い、Th2型サイトカイン分泌量をELISA法にて測定した。また、血清中の抗原特異的IgE、IgG₁をELISA法にて測定した。次に、マウス皮膚を採取し、酵素処理、抗体処理を行い結合組織型肥満細胞を分離、精製した。この肥満細胞をmonoclonal anti-DNP IgEで感作した後、DNP-albumin、recombinant MCP-1、CCR2阻害剤または対照としての培養液と共に培養し、上清を回収した。そして、上清中の抗原特異的 β ヘキソサミニダーゼ放出量を測定した。なお、各データは平均値±標準誤差として示した。統計処理にはANOVAを用いた。

結 果

マウスアレルギー性結膜炎モデルに抗MCP-1抗体を投与し、結膜円蓋部に浸潤した好酸球数を調べた。その結果、ブタクサ感作群において、抗MCP-1抗体投与により好酸球浸潤が有

意に抑制された ($P < 0.05$)。同様に、マウスアレルギー性結膜炎モデルにCCR2阻害剤を投与し、結膜円蓋部に浸潤した好酸球数を調べた結果、ブタクサ感作群において、CCR2阻害剤投与により好酸球浸潤が有意に抑制された ($P < 0.05$)。次に、MCP-1/CCR2のT細胞系への関与を調べるため、マウスアレルギー性結膜炎モデルに抗MCP-1抗体/CCR2阻害剤を投与しリンパ球刺激試験を行った。その結果、ブタクサ感作群において、ブタクサ刺激によるTh2型サイトカイン分泌量は抗MCP-1抗体投与/CCR2阻害剤投与群と対照群で有意な差は認めなかった。また、抗原特異的IgE、IgG₁についても抗MCP-1抗体投与/CCR2阻害剤投与群と対照群で有意な差は認めなかった。次に、CCR2阻害による肥満細胞の脱顆粒抑制効果を調べるため、分離した組織結合型肥満細胞を用いた β ヘキソサミニダーゼアッセイを行った。その結果、CCR2阻害剤により肥満細胞の β ヘキソサミニダーゼ放出量は有意に抑制された ($P < 0.05$)。

考 察

MCP-1/CCR2阻害により、マウスアレルギー性結膜炎における好酸球浸潤が著明に抑制されるということがわかった。好酸球浸潤を促進する経路としては、肥満細胞を介する経路とT細胞を介する経路の2つが知られている。肥満細胞を介する経路の関与を検討するため、マウス皮膚より分離した肥満細胞を用いて β ヘキソサミニダーゼアッセイを行った。肥満細胞にはCCR2が発現しているが、CCR2阻害により肥満細胞の β ヘキソサミニダーゼ放出量は抑制され、脱顆粒が有意に抑制されることがわかった。一方、T細胞を介する経路の関与を調べるため行ったリンパ球刺激試験の結果、サイトカインの分泌量に有意な差は認められなかった。さらに、Th2型反応で上昇する血清中の抗原特異的IgG₁にも有意差は認められなかった。以上より、MCP-1/CCR2阻害による好酸球浸潤抑制に、T細胞を介する経路の抑制が関与していたことは否定的である。また、抗原特異的IgEにも有意差は認められなかったことより、肥満細胞のFc受容体に結合するIgEが好酸球浸潤抑制に関与したとは考えにくい。以上より、MCP-1/CCR2経路を阻害することにより、抗体やT細胞に影響することなく肥満細胞の活性化が抑制され、その結果、好酸球の浸潤が抑制されたものとする。

結 論

マウスアレルギー性結膜炎モデルにおいて、MCP-1/CCR2が、肥満細胞の活性化を介して好酸球浸潤を促進していると考えられ、今後、MCP-1/CCR2経路の抑制がアレルギー性結膜炎の新しい治療法につながる可能性が示された。