

平成19年2月

# 縄田信彦 学位論文審査要旨

主査 井上幸次  
副査 山元修  
同 清水英治

## 主論文

反復抗原暴露によるマウスアレルギー性結膜炎モデルにおける肥満細胞拘束性プロテアーゼの変化

(著者：縄田信彦)

平成19年3月 米子医学雑誌 58巻掲載予定

# 学 位 論 文 要 旨

## 反復抗原暴露によるマウスアレルギー性結膜炎モデルにおける 肥満細胞拘束性プロテアーゼの変化

アレルギー性結膜炎は、癢痒感、結膜浮腫や充血、流涙などの臨床症状を呈し、その病態において、肥満細胞が重要な役割を果たしている。肥満細胞は、組織によって表現型が大きく異なり、分化状態により機能も異なる。粘膜型の肥満細胞 (mucosal mast cell : MMC) と結合組織型の肥満細胞 (connective tissue mast cell : CTMC) に大別され、含有されるプロテアーゼが異なることが知られている。結膜の肥満細胞は結合組織型に属している。本研究では、より臨床的状況に近い反復抗原暴露によるアレルギー性結膜炎遷延化モデルを開発し、このモデルを用いて種々の肥満細胞拘束性プロテアーゼをマーカーとして肥満細胞のプロファイリングが変動するかどうかについて検討し、併せてこれらに重要なシグナルとなると考えられる分子群の発現解析を試みた。

### 方 法

反復抗原暴露によるアレルギー性結膜炎モデルを開発した。生後8-12週のSWR/J雌マウスの両足蹠に、ブタクサ花粉と水酸化アルミニウムを含むリン酸緩衝溶液の懸濁液を注射して感作させ、1か月後にブタクサ花粉懸濁液1.5mg/10 $\mu$ lを7日連続で両眼に点眼し、アレルギー性結膜炎を惹起させた。アレルギーの即時相反応として結膜浮腫、結膜充血、眼瞼浮腫/発赤、眼脂/流涙をスコア化して評価した。また、結膜を含む全眼球を摘出して矢状断組織切片を作成し、ギムザ染色にて肥満細胞数、脱顆粒肥満細胞数、マクロファージ数、好酸球数、好中球数を計測して組織学的評価を行った。結合組織型肥満細胞を染めるCAE (chloroacetate esterase) 染色もあわせて検討した。更に結膜組織よりRNAを抽出してcDNAを合成し、real-time PCR法にて肥満細胞拘束性プロテアーゼの定量を行い、RNase Protection Assay (RPA)法にて種々の免疫・炎症関連のマーカーの発現を調べた。

### 結 果

臨床所見のスコアリングで見ると、アレルゲンの点眼を繰り返すことによる症状の悪化が認められた。点眼1日目と比較して、3日目以降のいずれの臨床スコアでも有意差がみられた ( $P < 0.05$ )。炎症細胞数は非感作群あるいは感作0時間 (抗原暴露直前) 群と比較し

て、感作後1日群、3日群、7日群で有意な増加を認めた ( $P < 0.05$ )。また、肥満細胞数、好酸球数については感作後1日群と比較して、3日群、7日群で有意な増加を認めた ( $P < 0.05$ )。プロテアーゼ量については、非感作群で、murine carboxypeptidase A3、 murine mast cell protease (mMCP)-4、 mMCP-5、 mMCP-6、 mMCP-7を認め、特にmMCP-7は多く、結合組織型のプロファイルを示した。そして抗原反復暴露により点眼後3日群、点眼後7日群では更に有意に増加していた ( $P < 0.05$ )。また、この発現増加は肥満細胞数の増加と相関していた。一方、3日以後では本来結合組織型の肥満細胞には認められないmMCP-1、 mMCP-2が発現していた。しかし、CAE陽性細胞は、ギムザ染色とほぼ同様な分布を示し、粘膜型肥満細胞への大きな系統変化は生じていないと推察された。RPAでは、肥満細胞に特異的なFc $\epsilon$ RI $\alpha$ 、 $\beta$ 鎖の上昇が示されたが、Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ 鎖には変化を認めなかった。SCFも軽度ながら上昇しており、免疫担当細胞表面マーカーのCD3、CD4、F4/80、ケモカインのRANTES、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、MIP-2、eotaxinに経時的な上昇が見られた。

## 考 察

今回、反復抗原暴露による結膜の遷延化炎症において認められた結膜におけるmMCP-1、 mMCP-2の発現は、粘膜型の肥満細胞のホーミングあるいは局所での粘膜型への分化の可能性を示唆している。しかしながら、CAE陽性細胞とギムザ陽性の肥満細胞の分布に乖離が認められなかったことから、結膜局所における粘膜型肥満細胞への大きな系統変化は否定的であると考えられた。むしろ結合組織型の肥満細胞の特徴を保ったままmMCP-1、 mMCP-2が発現してきたのではないかと考えられた。

肥満細胞はCCR1、CCR3、CCR5などのケモカインレセプターを有しており、これらのリガンドであるRANTES、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、MIP-2、eotaxinの増加は反復抗原刺激によって肥満細胞の活性化や脱顆粒の促進が生じていることを示唆している。CD3、CD4、F4/80の増加からはT細胞、マクロファージなども、直接的、間接的に今回の反復抗原暴露モデルにおける肥満細胞のプロテアーゼ変化に影響している可能性が考えられた。

## 結 論

今回の研究では抗原暴露を反復するアレルギー性結膜炎モデルマウスを開発し、臨床症状の増悪に伴って肥満細胞拘束性プロテアーゼの増加がみられること、一部で粘膜型のプロテアーゼも認められることを確認した。また、それに伴い種々の免疫担当細胞やその表面マーカー、各種ケモカインの発現増加を認めた。