

博士論文 (要約)

アルサス反応における Aryl hydrocarbon Receptor の関与

中島 理奈

論文の内容の要旨

論文題目 アルサス反応におけるAryl hydrocarbon Receptorの関与

氏名 中島 理奈

免疫複合体沈着によって引き起こされる炎症・組織障害は III 型アレルギー反応とよばれる。生体に侵入した病原微生物などの異物を排除する際に免疫複合体が形成されるが、通常補体と結合したものは可溶化され赤血球に捕捉されたのち肝臓や脾臓で処理される。しかし、免疫複合体が過剰産生された場合や補体が消費され不足した場合には、免疫複合体は効率的に処理されず、さまざまな臓器に沈着し、組織障害を引き起こす。このような免疫複合体組織障害による疾患として、全身性エリテマトーデス(SLE)や関節リウマチ(RA)、多様な皮膚血管炎が挙げられる。アルサス反応はこの III 型アレルギー反応の古典的実験モデルである。ウサギ皮膚にウマ血清を繰り返し注射することにより、浮腫、出血、好中球浸潤が生じる反応で Arthus によって 1903 年に初めて報告された。抗体を局所に投与し抗原を静脈内に投与することで抗体投与部位に反応を生じさせる逆受動アルサス反応はその簡便さと再現性の高さから III 型アレルギー反応の実験モデルとして頻用されている。

アрилハイドロカーボンレセプター(AhR)はリガンド誘導性転写因子であり、1976 年にマウスの肝臓から TCDD (2,3,7,8-テトラクロロジベンゾパラダイオキシン)に対する細胞内標的物質として同定され、ダイオキシンなどのハロゲン化多環性芳香族化合物あるいは多環性芳香族化合物による異物代謝酵素シトクロム P4501A1(CYP1A1)の誘導機構の研究から転写調節因子としての機能が解明された。さらに AhR ノックアウトマウスの解析からダイオキシンなどの外来異物の示す催奇形性、発癌作用、免疫抑制といった多岐にわたる生体毒性を仲介する細胞内因子であることが分かった。また、AhR ヘテロ欠損マウスでは大腸癌が高率に発生することが分かっており、それ自体ががん抑制因子としても重要であることも明らかになっている。よって現在では AhR はむしろ根源的に生体の維持に関わっている因子であると考えられている。最近の研究では、AhR はさまざまな免疫担当細胞の分化、機能を制御していることが分かってきた。まず、AhR は Th17 細胞や制御性 T 細胞の分化を調整していると報告されている。AhR 欠損 T 細胞は IL-6 や TGF- β で刺激しても Th17 細胞への分化が起りにくく、AhR 欠損マウスでは Th17 細胞への分化や炎症性サイトカインの産生が少ないため、RA のマウスモデルであるコラーゲン誘導性関節炎の症状が軽減される。この報告を裏付けるように、AhR のリガンドである FICZ(6-formylindolo[3.2-b]carbazole)をマウスに投与すると、Th17 細胞への分化が促進され、多

発性硬化症のモデルである実験的脳脊髄炎(EAE)の症状が悪化することも報告されている。一方で、AhR の別のリガンドである TCDD をマウスに投与すると制御性 T 細胞が誘導され、EAE の症状が抑制されることも報告されている。このように、AhR はリガンド特異的に Th17 細胞や制御性 T 細胞への分化を調整し、免疫反応を正の方向にも負の方向にも誘導する機能を持っている。樹状細胞においては TCDD がその分化を促進するとされている。一方で、AhR 欠損骨髄由来樹状細胞では LPS 刺激下での抑制性サイトカインである IL-10 発現は減少すると報告されている。さらに AhR 欠損マクロファージでは LPS 刺激下での炎症性サイトカイン産生が増加することが知られている。以上のように、AhR はさまざまな免疫担当細胞の機能を制御することによって、免疫反応の促進と抑制のバランスをとり、自己免疫疾患、全身炎症性疾患の発症、進展に関わっており、治療のターゲットとして有望視されている。

現在までに RA を除いて免疫複合体組織障害における AhR の関与を検討した報告はない。本研究では、免疫複合体による血管炎における AhR の役割を調べることを目的に、AhR ヘテロ欠損マウスに皮膚および腹腔逆受動アルサス反応を行った。

本研究では野生型マウス、AhR ホモ欠損マウスを交配させることで AhR ヘテロ欠損マウスを作成した。皮膚逆受動アルサス反応は、rabbit IgG anti-chicken egg albumin Abs を皮内注射した後すぐに chicken egg albumin を尾静脈から静脈注射することで起こした。反応前後の皮膚を採取し、染色し細胞数をカウントした。また、採取した皮膚から RNA を抽出し cDNA に変換し、定量的 PCR を行った。同様に腹腔逆受動アルサス反応は、rabbit IgG anti-chicken egg albumin Abs を腹腔内注射した後すぐに chicken egg albumin を尾静脈から静脈注射することで起こした。腹腔洗浄液中の細胞をカウントし、フローサイトメリーで細胞の評価を行った。さらにマクロファージに注目し、腹腔から回収したマクロファージを rabbit IgG anti-chicken egg albumin Abs と chicken egg albumin とともに培養し、炎症性サイトカイン、ケモカインの産生能を検討した。また、クロドロン酸リポソームでマクロファージ除去後に皮膚逆受動アルサス反応を行い、さらに腹腔マクロファージを移入後に腹腔逆受動アルサス反応を行った。最後に血管炎患者および健常人から PBMC を回収し、AhR、FcγRIII の発現を調べた。

皮膚アルサス反応 4 時間後の浮腫は野生型マウスと比較し、AhR ヘテロ欠損マウスで有意差をもって悪化した。4 から 10 時間後まで浮腫斑を測定したところ、4 時間後以外は明らかな差を認めなかったが、野生型マウスよりも AhR ヘテロ欠損マウスで増加する傾向にあった。皮膚アルサス反応前後の皮膚組織切片中の好中球数は、反応 4 時間後および 8 時間後で野生型マウスよりも AhR ヘテロ欠損マウスで増加していた。肥満細胞数、マクロファージ数に有意差はなかった。さらに、皮膚アルサス反応 4 時間後において、病変局所の炎症性サイトカイン IL-6、好中球遊走性ケモカイン

CXCL1 の発現が AhR ヘテロ欠損マウスで野生型マウスに比して増加していた。

腹腔アルサス反応では、皮膚アルサス反応と同様に、反応 4 時間後の AhR ヘテロ欠損マウスの腹腔好中球数が増加していた。マクロファージ数は野生型マウスと AhR ヘテロ欠損マウスとで差は認めなかった。

IL-6 は炎症を惹起するサイトカインでマクロファージや肥満細胞から産生される。また、CXCL1 は好中球遊走に関わる主要ケモカインで、アルサス反応においては主にリンパ管内皮細胞及びマクロファージより産生される。アルサス反応ではこのようなマクロファージによる免疫複合体の認識およびそれによる炎症性サイトカイン、ケモカインの産生が重要である。野生型マウスもしくは AhR ヘテロ欠損マウスの腹腔マクロファージを rabbit IgG anti-chicken egg albumin Abs と chicken egg albumin すなわち免疫複合体とともに 4 時間培養したところ、IL-6、CXCL1 の mRNA 発現およびタンパク発現が AhR ヘテロ欠損マウスのマクロファージで有意に増加した。また、マクロファージにおける免疫複合体の認識は FcγR によって制御されることが知られていたため、腹腔マクロファージの FcγR の発現をフローサイトメトリーで調べたところ、AhR ヘテロ欠損マウス腹腔マクロファージは野生型マウスマクロファージよりも FcγRIII を強く発現していた。また、ChIP アッセイを用いて AhR がリガンド非依存性に FcγRIII のプロモーター領域に結合することを見出した。

マクロファージのアルサス反応への関わりを直接的に評価するために、マクロファージ除去作用を持つクロドロン酸リポソームを皮膚に投与した後に同部位に皮膚アルサス反応を行った。反応 4 時間後において、クロドロン酸リポソームを投与した AhR ヘテロ欠損マウスの浮腫は、投与していない AhR ヘテロ欠損マウスの浮腫と比較して有意差をもって減弱した。さらに、野生型マウスもしくは AhR ヘテロ欠損マウスのマクロファージを単離し、新たな野生型マウスの腹腔に移入した後に腹腔アルサス反応を行った。野生型マウスマクロファージを移入した群と比較し、AhR ヘテロ欠損マウスマクロファージを移入した群で腹腔好中球数が増加した。

最後に、免疫複合体沈着による疾患である皮膚型結節性多発動脈炎、IgA 血管炎、蕁麻疹様血管炎患者および健康人の PBMC を単離し、CD14 陽性単球における AhR および FcγRIII 発現を解析した。血管炎患者では健康人と比較し、AhR 発現が有意に低下している一方で、FcγRIII 発現は増加していた。

以上の結果から、ヒト疾患においてもマウスモデルと同様の機序が起きている可能性が考えられた。AhR 欠損は FcγRIII 発現を増強することで免疫複合体の認識能を上げ、マクロファージからの IL-6、CXCL1 産生を増やし、結果として好中球浸潤増加を引き起こし、免疫複合体沈着による血管炎を増悪させると推測された。したがって、免疫複合体関連疾患では AhR が治療のターゲットとなる可能性が考えられた。