



Cytokine responses of intraepithelial lymphocytes are regulated by histamine H2 receptor

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2017-01-18 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 高垣, 航輔 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/811

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 549号	学位授与年月日	平成21年 3月18日
氏 名	高 垣 航 輔		
論文題目	Cytokine responses of intraepithelial lymphocytes are regulated by histamine H ₂ receptor (腸管上皮間リンパ球のサイトカイン応答はヒスタミン H ₂ 受容体による制御を受ける)		

博士(医学) 高 垣 航 輔

論文題目

Cytokine responses of intraepithelial lymphocytes are regulated by histamine H₂ receptor

(腸管上皮間リンパ球のサイトカイン応答はヒスタミン H₂ 受容体による制御を受ける)

論文内容の要旨

[はじめに]

生体内で最も豊富な活性アミンであるヒスタミンは、様々な生理機能を有する。消化管においては、胃壁細胞での酸分泌の主な作動系がヒスタミン H₂ 受容体により司られ、一方では、食物アレルギーではヒスタミン H₁ 受容体が深く関わり、ともに受容体制御は治療の鍵を握る。近年の知見では、ヒスタミン受容体はさらに H₃, H₄ を加え 4 種類あり、これらを含め、これまで理解の乏しかった中枢神経系や免疫系での役割が示唆されている。ヒスタミンの免疫系での機能としては、免疫担当細胞のヒスタミン受容体に直接働きかけ、いわゆる Th1/Th2 バランスを Th2 応答へシフトさせることが報告されている。ヒスタミンは、消化管関連リンパ組織を介し、粘膜免疫に直接的に関わることが示唆されている。消化管細胞では、ヒスタミンは、肥満細胞や好塩基球、腸クロム親和性細胞様細胞に貯蔵されているが、これらのヒスタミンの、生理的意義や機能の詳細は十分に明らかにされていない。

腸管上皮間リンパ球(IEL)は、消化管粘膜免疫の最前線を担い、末梢血リンパ球とは表現型や機能面での相違が知られている。IEL の機能としては、炎症反応への介入、腸管上皮での免疫サーベイランスや経口免疫寛容の誘導などへの関与が指摘され、消化管粘膜免疫に大きな役割を有すると考えられる。また IEL は、外来抗原や各種刺激により、IFN- γ 、TNF- α 、TGF- β 1、IL-2、IL-3、IL-6 などのサイトカインを分泌するが、その機能制御については未だ十分な解明に至っていない。

本研究では、ヒスタミンの消化管粘膜免疫への直接的な関与につき、IEL のサイトカイン応答の制御という視点から明らかにすることを目的とした。ヒスタミン受容体サブタイプ別の IEL での mRNA 発現の検討、サブタイプ別によるサイトカイン産生、細胞内サイトカイン、サイトカイン mRNA 発現について検討を行った。

[材料ならびに方法]

7~10 週齢 C3H/HeN 雄性マウスから小腸及び脾臓を摘出し、Percoll 法を用い、IEL と脾細胞を分離した。IEL の subset は、フローサイトメトリーにより解析を行った。ヒスタミン受容体 mRNA 発現は、Reverse Transcription-PCR を用いて解析した。サイトカイン産生は、抽出リンパ球を一次培養し、*in vitro* 刺激条件下で測定した。選択的 H₁ 受容体アンタゴニスト・H₂ 受容体アンタゴニスト・H₃/ H₄ 受容体アンタゴニスト・選択的 H₂ 受容体アゴニストを用い、受容体サブタイプ別の IEL でのサイトカイン産生応答の違いを測定した。サイトカイン測定には cytometric bead array system を用いた。表面抗原及び細胞内サイトカイン解析はフローサイトメトリーを用い、サイトカイン mRNA 発現は Real-Time PCR による解析を行った。

[結果]

IEL サブセットは、CD3⁺ 88.2 $\pm$ 3.2 %、CD8⁺ 85.6 $\pm$ 0.9 %、CD4⁺ 9.1 $\pm$ 0.7 %、TCR $\alpha\beta$ ⁺ 48.7 $\pm$ 1.6 %、TCR $\gamma\delta$ ⁺ 38.6 $\pm$ 2.4 %であり、既報告と同様のサブセット分布を確認した。IEL は H₁・H₂・H₄ 各受容体 mRNA を発現し、特に H₂ 受容体 mRNA は強発現であった。H₃ 受容体 mRNA の発現は認められなかった。IEL 及び脾細胞で、ヒスタミンは、Th1 系サイトカインである IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、ならびに IL-4 産生

を抑制した。この抑制は、ヒスタミン濃度依存性であり、TNF- α 産生は、 10^{-4} M のヒスタミンにより最大 48 % 抑制された。ヒスタミンによる効果は、選択的 H₂ 受容体アンタゴニスト (famotidine) が拮抗したが、選択的 H₁ 及び H₃ 受容体アンタゴニスト (pyrilamine, thioperamide) は拮抗を示さず、サイトカイン産生への H₂ 受容体の関与を示唆した。選択的 H₂ 受容体アゴニスト (dimaprit) と選択的 H₂ 受容体アンタゴニストを用いた実験結果も、同様の結論を支持した。細胞内サイトカイン解析では、主たる IFN- γ 産生細胞が、TCR $\alpha\beta^+$ であり、ヒスタミン添加による TCR $\alpha\beta^+$ IEL 数の減少を確認した。ヒスタミンは、IFN- γ mRNA 発現の抑制を示した。IL-10 は、Th1 サイトカイン産生に阻害的に働くことが知られるが、IL-10 産生は、ヒスタミンによる影響を受けなかった。

[考察]

本研究では、消化管 IEL におけるヒスタミン受容体 mRNA の発現を、初めて明らかにし、さらにヒスタミンが、Th1 系サイトカインと IL-4 産生を抑制し、この抑制効果が、主に H₂ 受容体を介していることを明らかにした。これは、消化管粘膜免疫を直接担当する細胞レベルで、ヒスタミンによる制御の存在を、初めて明らかにした報告である。これらの反応は、末梢血リンパ球のものと相同で、粘膜上皮における T 細胞の免疫寛容を反映している可能性が考えられた。ヒスタミンによる H₂ 受容体を介した Th1 系サイトカインを中心とする免疫応答の抑制は、汎用される H₂ 受容体アンタゴニストが、消化管粘膜免疫に影響を与える可能性を示唆した。H₂ 受容体を介したヒスタミンの免疫系への関与は、近年ようやく知られるようになったヒスタミンの機能であるが、消化管の粘膜免疫に関わる機能や意義は報告が無い。一方、最近の知見は、ヒスタミンが、広く炎症性腸疾患や過敏性腸症候群、腸管腫瘍免疫などの病態に関与をすることが示唆している。本研究の結果は、消化管の粘膜免疫でのヒスタミンの影響を明らかにする端緒となり、ひいては、炎症性腸疾患などの消化管の病態解明の一助となると期待される。

[結論]

ヒスタミンは、H₂ 受容体を介して IEL のサイトカイン産生を制御した。ヒスタミンの免疫系への関わり、特に腸管局所での免疫応答を抑制する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

消化管には様々な外的因子の侵襲を排除する gut-associated lymphoid tissues (GALT) をはじめ様々な免疫機構が発達している。小腸上皮間リンパ球 (Intraepithelial lymphocytes: IEL) は腸管粘膜直下に位置し、消化管免疫の最前線の細胞として重要な役割を果たしている。消化管にはヒスタミンを含有する細胞が多数存在するが、消化管粘膜免疫へのヒスタミンの関与については未知の部分が多い。申請者はヒスタミンが IEL の *in vitro* サイトカイン産生能にどのような影響を及ぼすかを、ヒスタミン受容体発現と関連させて検討した。

実験に用いられた材料、方法は適切なものであった。すなわち、C3H/HeN マウスの小腸より、既に確立された方法により IEL を単離した。ヒスタミン受容体 mRNA 発現は RT-PCR でみた。サイトカイン産生では、*in vitro* phorbol myristate acetate (PMA; 40ng/ml) 及びイオノマイシン (40 μ g/ml) 刺激下での IEL による IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-5 産生を検討した。IEL 刺激時にヒスタミン (10^{-7} M あるいは 10^{-4} M) を加え、これらサイトカイン産生に及ぼす影響をみた。選択的 H₁、H₂、H₃ 受容体アンタゴニストはそれぞ

れピリラミン、ファモチジン、チオペラミド、選択的H2受容体アゴニストはディマプリットを 10^{-5} Mで用いた。サイトカイン測定はcytometric bead array システムを用い、フローサイトメトリーにより解析した。コントロールとして、必要に応じて脾細胞を用い同様の実験を行った。得られた結果は以下の通りである。

1. IELを構成する主な細胞はT細胞受容体(TCR) $\alpha\beta$ 型CD8(+)細胞で40～50%を占め、他にTCR $\alpha\beta$ 型CD4(+)細胞が10%、TCR $\gamma\delta$ 型T細胞が20%で、既報告と同様であった。
2. IELはH1、H2、H4受容体mRNAを発現し、特にH2受容体mRNA発現は強かった。
3. IELはPMA／イオノマイシン刺激により、IL-2、INF- γ 、TNF- α 、IL-4を産生した。LPS刺激には反応しなかった。
4. IELによるこれらサイトカイン産生はヒスタミンにより濃度依存性に抑制された。
5. ヒスタミンのIELに対する効果は選択的H2受容体アンタゴニストにより拮抗された。一方、H1及びH3受容体アンタゴニストでは拮抗効果は見られなかった。
6. ヒスタミンに代わり選択的H2受容体アゴニストを用いて5と同様の実験を行い、選択的H2受容体アンタゴニストの拮抗効果を確認した。
7. IELではTCR $\alpha\beta$ 細胞がINF- γ を産生し、ヒスタミン添加によりその数は減少した。
8. IL-10産生はヒスタミンにより抑制されなかった。

本申請内容の最も注目すべき点は、IELによるTh1、Th2サイトカイン産生にヒスタミンがどのような影響を及ぼすかを見たことにある。その中で、IELにおけるヒスタミン受容体mRNA発現を初めて明らかにした。さらに、IELによるTh1、Th2サイトカイン産生がヒスタミンにより抑制されたが、その効果がH2受容体を介して発揮されることを示した。本研究結果は腸管免疫応答さらには炎症性腸疾患へのヒスタミンの関与を考える上で重要な示唆を与えるものである。審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) IELとヒスタミンとの相互作用に注目した理由について
- 2) C3H/HeNを選んだ理由について
- 3) IELによるH1、H2、H4受容体のタンパクレベルでの発現について
- 4) ヒスタミンアンタゴニスト効果の検証方法について
- 5) IELとlamina propria lymphocyteとのcross-talkについて
- 6) 過敏性腸疾患におけるヒスタミンの役割について
- 7) サイトカイン産生における細胞内シグナリングに及ぼすヒスタミンの影響について
- 8) IELがLPSに反応しない理由について
- 9) IELのIL-5産生について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者

主査 瀧川 雅浩

副査 永田 年

中村 利夫