

## 自然免疫/炎症とサイトカイン・シグナル伝達

松川 昭博

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 病態探究医学

キーワード：サイトカイン，ケモカイン，自然免疫，炎症，シグナル伝達

### はじめに

炎症反応は生体に有害刺激が加わった場合に発動される反応で、古くから、発赤 rubor, 腫張 tumor, 局所熱感 calor, 疼痛 dolor を 4 主徴とする生体反応として知られている。炎症反応は、一連の反応経路が密接にリンクして増幅されるシステムからなり、生体侵襲とくに微生物侵入に対する最初の生体防御系として機能している。しかし、過剰あるいは長期にわたる炎症反応は生体にとってむしろ有害であり、その制御は厳密な調節下にあると考えられる。炎症反応の発動・制御に働く中心的なメディエーターはサイトカインである。本稿では、炎症反応の発動・制御に関わるサイトカイン・ケモカインの役割について紹介したい。

### ウサギ炎症モデルを用いた局所炎症の解析

サイトカインは'80年頃よりクローニングされはじめたが、その機能解析は *in vitro* での研究が中心であり、実際の炎症局所での役割は長く不明であった。これは、当時クローニングされたサイトカインがヒト型であったことによる。そこで、私たちは独自にウサギ

サイトカイン・ケモカインをクローニングし、その遺伝子組換え体やモノクローナル・ポリクローナル抗体を作製して、ウサギ炎症モデルを用いた *in vivo* でのサイトカイン・ケモカインの機能解析に取り組んだ。そのころ（'90年代前半）は、まず  $\text{TNF}\alpha$  がつづいて IL-1 が産生され、これによりケモカインが誘導されて炎症細胞浸潤がおこると考えられていたが、LPS や尿酸結晶をウサギ関節内に投与して誘発した関節炎でのサイトカイン産生動態を観察した結果、ケモカイン IL-8/CXCL8 や  $\text{GRO}\alpha/\text{CXCL1}$  は  $\text{TNF}\alpha$  と同時に IL-1 よりむしろ先行して産生される、ケモカインの産生は二相性である、といった従来の説との矛盾点を見いだした。そこで、各種サイトカイン抗体あるいは受容体拮抗因子投与後のサイトカイン産生量を測定したところ、初期のケモカインは  $\text{TNF}\alpha$  や IL-1 と独立して産生されること、これらにより IL-1 産生が増幅され、その後 IL-1 の作用により再びケモカイン産生が誘導されることが分かり、ケモカインは炎症導入期と効果期の両方に作用し炎症細胞浸潤に働くことを明らかにした<sup>1-8)</sup>。また、この時の炎症細胞浸潤は、これらサイトカイン・ケモカインの協調下に規定されることを示した。さらに、関節炎に伴う軟骨破壊は、局所に浸潤した好中球由来のエラスターゼによって惹起されることを明らかにし、カタボリン (=IL-1) によるとされた従来の説を覆した<sup>1)</sup>。一方、IL-1 の特異的阻害因子

平成18年3月受理

〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1

電話：086-235-7141 FAX：086-235-7141

E-mail：amatsu@md.okayama-u.ac.jp

### ◆プロフィール◆



熊本大学医学部卒業後、同整形外科入局。第一線の整形外科医を目指して昼夜を問わず臨床研修に明け暮れるも、大学院入学（熊本大学医学部第一病理学教室）を契機に研究の面白さに魅せられて基礎に身を置くようになった。大学時代の友人は、クラブ活動（軟式テニス）に没頭していた私が研究に従事するとは夢にも思っていなかった模様。研究テーマは、①炎症とサイトカイン・ケモカイン ②自然免疫におけるシグナル伝達機構の解明 ③自然免疫の獲得免疫、腫瘍免疫に及ぼす影響の解明。

IL-1 receptor antagonist (IL-1 Ra) の炎症局所での産生量はモル比で IL-1 の数百倍に及ぶこと<sup>1,4)</sup>, 活性化型 IL-1 Ra は未処置健常ウサギの全臓器で検出されること<sup>9)</sup>から, 炎症反応は抑制基調にあることも明らかにした。

### マウス敗血症モデルを用いた全身炎症の解析

次に, 局所炎症の解析から得た知見をもとに敗血症モデルを用いた全身性炎症反応の解析に取り組んだ。感染時の異物排除に働くエフェクター細胞は好中球やマクロファージであるが, これらの細胞の局所への動員および活性化には, TNF $\alpha$ , IL-1, IFN $\gamma$ , 種々のケモカイン<sup>10-12)</sup>が必須である。一方で, 炎症反応抑制には IL-13などの抗炎症サイトカインが働くとされる。これらのサイトカインのうち, IFN $\gamma$  は獲得免疫の分類では細胞性免疫にはたらく Th1 サイトカインとして, IL-13 は液性免疫に働く Th2 サイトカインとして分類されている。そこで, 自然免疫/炎症からみた Th1・Th2 サイトカインの機能分担に興味を抱き, 研究を展開した。面白いことに, 感染局所では Th1 サイトカイン IFN $\gamma$  に加え Th1 誘導サイトカイン IL-12 の上昇を認めたが, Th2 サイトカイン IL-13 は炎症局所ではまったく検出されなかった。この事実は, 感染局所は Th1 サイトカイン優位であることを意味する。このモデルに IFN $\gamma$  あるいは IL-12 の中和抗体を投与すると, 腹膜炎時の腹腔内細菌数は有意に増加し, マウス生存率は低下した。したがって, Th1 サイトカインは食細胞の殺菌能を高め, 局所の生体防御に働くと考えられた。一方, IL-13 は腹腔局所で発現しないものの, 敗血症時の標的臓器である肝, 肺, 腎では有意な上昇がみられ, 抗 IL-13 抗体の投与により, 敗血症による臓器炎・臓器傷害は悪化し, マウスの生存率は有意に低下した。このとき, 諸臓器における炎症性サイトカイン・ケモカイン産生は増加したことから, 臓器内で発現する IL-13 は, 臓器での炎症性サイトカインの産生を押さえ臓器傷害を抑制する, と考えられた<sup>13)</sup>。以上より, 敗血症時の生体防御は, 感染局所での IL-12 や IFN $\gamma$  による細菌排除と, 臓器での IL-13 の抗炎症作用による臓器傷害抑制のバランスの上に成り立つことが示され, 獲得免疫系の観点から Th1/Th2 サイトカインとよばれる機能分子が, 自然免疫の局面では, 局所で細菌排除に働くサイトカインと全身で抗炎症に働くサイトカイン, というグループに分類できること

を見いだした (図 1)。

### 自然免疫におけるシグナル伝達機構の解明

最近の解析から, T細胞における IL-12, IL-13 のシグナル伝達に関わる因子が Stat4, Stat6 であることが判明している。そこで, Stat4, Stat6 欠損マウスに感染性腹膜炎を誘導し, 敗血症モデルにみるサイトカインの作用機序をシグナル伝達因子の方面から解析した<sup>14)</sup>。敗血症誘導後のマウス生存率を観察すると, 野生型にくらべて Stat4, Stat6 欠損マウスでは有意な改善がみられた。この時のマウスの腹腔内保有菌量をみると, Stat6 欠損マウスでは有意な減少を認め, Stat6 欠損マウスにおける腹腔内 IL-12, TNF $\alpha$ , CC ケモカイン CCL6 及び CCL22 の産生は, 野生型にくらべて有意に上昇していた。一方, 細菌排除に働く白血球自体の機能に差異はなかったことから, Stat6 欠損マウスでは局所のサイトカイン産生が細菌排除に都合のよい Th1 反応にシフトし, そのためマウスは敗血症に抵抗性を示したと結論した。Stat4 欠損マウスでは局所の保有菌数に差はなかったものの, 野生型でみられる肝傷害, 腎傷害はほとんど認めなかった。野生型にみる組織学的肝実質への好中球浸潤も Stat4 欠損マウスではほとんど認めなかった。Stat4 欠損マウスにみる諸臓器でのサイトカイン産生パターンは, IL-10 及び IL-13 の上昇, CXC ケモカイン MIP-2, KC の低下を示した。IL-10 も IL-13 と同様に抗炎症に働くサイトカインである。このように, Stat4 欠損マウスは, 臓器でのサイトカイン産生が生体防御に好都合な Th2 にさらにシフトし, そのため臓器傷害が回避されてマウスは敗血症に抵抗性を示すと考えられた (図 2)。

IL-10 のシグナルは Stat3 を介して誘導される。そこで, 食細胞 (好中球, マクロファージ) 選択的に Stat3 の欠損したマウスを用いて, 敗血症における Stat3 の役割について検討した。その結果, 食細胞選択的 Stat3 欠損マウスは敗血症に対し高致死性を示した<sup>15)</sup>。このとき, 腹腔内の細菌数には両者間で差はなかったが, 腹腔内浸潤細胞数は Stat3 欠損マウスで著しく増加し, これと一致して腹腔内の種々の炎症性サイトカイン産生量も著しく亢進した。Stat3 欠損マウスでは血清サイトカインレベルも著しい高値 (高サイトカイン血症) を示し, 血清アミロイド A タンパク, フィブリノーゲン量の増加, 血清アルブミンの減少がみられ, 全身炎症は増強し, 敗血症に伴う肝傷害・腎障害はコ

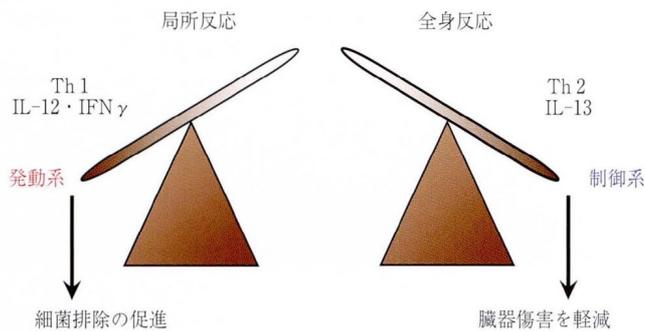


図1 感染性腹膜炎時の生体防御

ントロールに比べ有意に増悪した。組織学的には、著しい肝実質内好中球浸潤、高度の尿細管壊死が観察された。以上より、Stat3欠損マウスでは、局所および全身の過剰なサイトカイン産生により制御不能の全身性炎症反応が誘導され、マウスは高率に死に至ったと結論した<sup>16)</sup> (図2)。この結果からわかる、もう一つの重要な点は、Stat3はすべての細胞に発現するものの、食細胞(おそらくマクロファージ)に発現するStat3が過剰な炎症反応を制御するということである。このことは、Stat3欠損腹腔常在マクロファージを移入されたマウスでは、コントロールに比べ有意なTNF $\alpha$ やKCの上昇、浸潤好中球・マクロファージの増加を示すことから確認された<sup>17)</sup>。腹腔マクロファージは「パトロール部隊」として局所に常在し、刺激を感知すると炎症性サイトカイン・ケモカインを産生して炎症開始シグナルを発動するが、一方で、Stat3を介して抗炎症サイトカインIL-10の作用を伝え、過度の炎症が起こらないように監視していることになる。

### まとめと展望

以上、自然免疫の局面としての炎症反応発現・制御におけるサイトカインとシグナル伝達因子の機能解析に取り組み、敗血症の病態形成にサイトカインおよびSTAT因子が重要な働きを担うことを示し、自然免疫における新しいTh1/Th2サイトカインパラダイムを提唱した。本稿では割愛したが、ケモカインリセプターによる敗血症の負の制御機構や<sup>18)</sup>ケモカインの獲得免疫における役割<sup>19,20)</sup>についても明らかにしてきた。現在は、敗血症を含めた種々の炎症モデルにおける炎症反応制御機構をシグナル伝達抑制因子(SOCS, suppressor of cytokine signaling)の方面から解析している。敗血症は、様々な炎症シグナルが複雑なカスケ

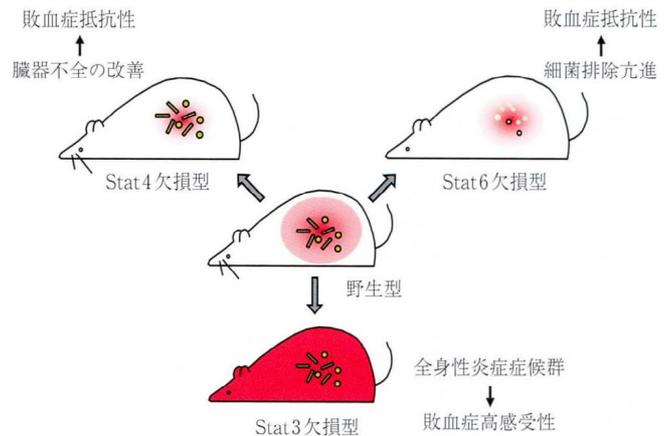


図2 敗血症とシグナル伝達因子

ドを形成しておこる難治性の炎症疾患であり、最近の急速な医学の進歩にもかかわらず、その死亡率はほとんど改善していない。今後も、敗血症を中心とした炎症疾患の病態解明に取り組み、自然免疫への介入による新しい治療戦略も念頭に入れて研究を展開したいと考えている。

### 文 献

- 1) Matsukawa A, Ohkawara S, Maeda T, Takagi K and Yoshinaga M: Production of IL-1 and IL-1 receptor antagonist and the pathological significance in lipopolysaccharide-induced arthritis in rabbits. *Clin Exp Immunol* (1993) **93**, 206-211.
- 2) Matsukawa A, Yoshimura T, Maeda T, Ohkawara S, Takagi K and Yoshinaga M: Neutrophil accumulation and activation by homologous IL-8 in rabbits. IL-8 induces destruction of cartilage and production of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in vivo. *J Immunol* (1995) **154**, 5418-5425.
- 3) Matsukawa A, Yoshimura T, Miyamoto K, Ohkawara S and Yoshinaga M: Analysis of the inflammatory cytokine network among TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 receptor antagonist, and IL-8 in LPS-induced rabbit arthritis. *Lab Invest* (1997) **76**, 629-638.
- 4) Matsukawa A, Yoshimura T, Maeda T, Takahashi T, Ohkawara S and Yoshinaga M: Analysis of the cytokine network among tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , interleukin-8, and interleukin-1 receptor antagonist in monosodium urate crystal-induced rabbit arthritis. *Lab Invest* (1998) **78**, 559-569.
- 5) Matsukawa A, Miyazaki S, Maeda T, Tanase S, Feng L, Ohkawara S, Yoshinaga M and Yoshimura T: Production and regulation of monocyte chemoattractant protein-1 in lipopolysaccharide- or monosodium urate crystal-induced

- arthritis in rabbits : roles of tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin-1, and interleukin-8. *Lab Invest* (1998) **78**, 973-985.
- 6) Matsukawa A and Yoshinaga M : Sequential generation of cytokines during the initiative phase of inflammation, with reference to neutrophils. *Inflamm Res* (1998) **47**, 137-144.
  - 7) Matsukawa A, Yoshimura T, Fujiwara K, Maeda T, Ohkawara S and Yoshinaga M : Involvement of growth-related protein in lipopolysaccharide-induced rabbit arthritis : cooperation between growth-related protein and IL-8, and interrelated regulation among TNF $\alpha$ , IL-1, IL-1 receptor antagonist, IL-8, and growth-related protein. *Lab Invest* (1999) **79**, 591-600.
  - 8) Fujiwara K, Ohkawara S, Takagi K, Yoshinaga M and Matsukawa A : Involvement of CXC chemokine growth-related oncogene-a in monosodium urate crystal-induced arthritis in rabbits. *Lab Invest* (2002) **82**, 1297-1304.
  - 9) Matsukawa A, Fukumoto T, Maeda T, Ohkawara S and Yoshinaga M : Detection and characterization of IL-1 receptor antagonist in tissues from healthy rabbits : IL-1 receptor antagonist is probably involved in health. *Cytokine* (1997) **9**, 307-315.
  - 10) Matsukawa A, Hogaboam CM, Lukacs NW, Lincoln PM, Strieter RM and Kunkel SL : Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) protects mice in a model of acute septic peritonitis : cross-talk between MCP-1 and leukotriene B<sub>4</sub>. *J Immunol* (1999) **163**, 6148-6154.
  - 11) Matsukawa A, Hogaboam CM, Lukacs NW, Lincoln PM, Evanoff HL and Kunkel SL : Pivotal role of the CC Chemokine, macrophage-derived chemokine, in the innate immune response. *J Immunol* (2000) **164**, 5362-5368.
  - 12) Matsukawa A, Hogaboam CM, Lukacs NW and Kunkel SL : Chemokines and innate immunity. *Rev Immunogenetics* (2002) **2**, 339-358.
  - 13) Matsukawa A, Hogaboam CM, Lukacs NW, Lincoln PM, Evanoff HL, Strieter RM and Kunkel SL : Expression and contribution of endogenous IL-13 in an experimental model of sepsis. *J Immunol* (2000) **164**, 2738-2744.
  - 14) Matsukawa A, Kaplan MH, Hogaboam CM, Lukacs NW and Kunkel SL : Pivotal role of signal transducer and activator of transcription (Stat)4 and Stat6 in the innate immune response during sepsis. *J Exp Med* (2001) **193**, 679-688.
  - 15) Matsukawa A, Takeda K, Kudo S, Maeda T, Kagayama M and Akira S : Aberrant inflammation and lethality to septic peritonitis in mice lacking Stat3 in macrophages and neutrophils. *J Immunol* (2003) **171**, 6198-6205.
  - 16) Matsukawa A : Regulation of innate immune response by Stat proteins during septic peritonitis : in *The biological response to planned and unplanned injuries : Cellular, molecular and genetic aspects*, Ogawa M, Yamamoto T, Hirota M, eds, Excerpta Medica International Congress Series 1255, Elsevier, Amsterdam, Netherlands (2003) pp 7-14.
  - 17) Matsukawa A, Kudo S, Maeda T, Numata K, Watanabe H, Takeda K, Akira S and Ito T : Stat3 in Resident Macrophages as a Repressor Protein of Inflammatory Response. *J Immunol* (2005) **175**, 3354-3359.
  - 18) Matsukawa A, Kudoh S, Sano G, Maeda T, Ito T, Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL and Lira S : Absence of CC Chemokine Receptor 8 Enhances Innate Immunity during Septic Peritonitis. *FASEB J* (2006) **20**, 302-304.
  - 19) Matsukawa A, Lukacs NW, Standiford TJ, Chensue SW and Kunkel SL : Adenoviral-mediated overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 differentially alters the development of Th1 and Th2 type responses in vivo. *J Immunol* (2000) **164**, 1699-1704.
  - 20) Matsukawa A, Lukacs NW, Hogaboam CM, Chensue SW and Kunkel SL : Chemokines and other mediators, 8. Chemokines and their receptors in cell-mediated immune responses in the lung. *Microsc Res Tech* (2001) **53**, 298-306.