肺線維芽細胞の eotaxin 産生に対する leukotriene C₄ の影響

石田 明・宮國友治・高藤 繁*

Effects of leukotriene C₄ on eotaxin production by human lung fibroblasts

Cysteinyl leukotrienes (CysLTs) play important roles in the pathogenesis of bronchial asthma, and induce not only the increase of mucus secretion and smooth muscle contraction but also eosinophil recruitment into airways. However, mechanism of eosinophil recruitment by CysLTs has not been thoroughly elucidated. In this study, we examined the LTC₄ on eotaxin production by human lung fibroblasts.

The fibroblasts were cultured with chemical mediators including LTC₄ in the absence or presence of IL-4 for up to 48 h. At the end of the culture period, eotaxin in the supernatants was measured by ELISA.

IL-4 clearly enhanced eotaxin production by fibroblasts. LTC₄ alone had no effect on eotaxin production. When fibroblasts were cultured with IL-4 plus LTC₄, eotaxin production was significantly enhanced in comparison with IL-4 alone.

These results suggest that CysLTs may increase eotaxin production by fibroblasts in the presence of IL-4 and that CysLTs may induce eosinophil recruitment into airways through the effect on eotaxin production by fibroblasts in allergic inflammation.

Rec. 9/17/2001, Acc. 11/2/2001, pp75~79

*Akira Ishida・Yuji Miyakuni・Shigeru Takafuji**

key words : eotaxin, fibroblast, LTC₄, IL-4, eosinophil

気管支喘息の病態において好酸球性炎症は重要な役割を果たし、気道過敏性形成などに関与することが強く示唆されている。最近、組織に発現し炎症細胞を局所に遊走、活性化させるケモカインが、アレルギー疾患との関連で注目されている。好酸球はケモカインレセプターCCR3を発現しており、CCR3リガンドのうち eotaxin はCCR3に特異的で親和性が強く、好酸球に対して強力な遊走活性を持つケモカインである。eotaxin は線維芽細胞¹⁾、血管内皮細胞²⁾、気道上皮細胞³⁾、T細胞⁴⁾、好酸球⁵⁾など多くの細胞から産生されるが、特に線維芽細胞は大量の eotaxin を産生する⁶⁾。そして、Th2 サイトカインである IL-4 は線維芽細胞からの eotaxin 産生を増強することが明らか

にされている⁷⁾。したがって、線維芽細胞による eotaxin 産生は好酸球の局所浸潤に対して重要な役割を果たす可能性が考えられる。

一方、cysteinyl leukotrienes (CysLTs) は、マスト細胞や好酸球から産生、遊離される脂質メディエーターであり、アレルギー性炎症において重要な役割を担う。気管支喘息においては、強力な気道平滑筋収縮、気道の粘液分泌亢進、血管透過性亢進、好酸球の局所への動員作用が現在まで明らかとされている⁸⁾。また、LT 受容体拮抗薬の有効性も注目されており、臨床においては気管支喘息治療の重要な薬剤の一つと認識されている。LTC₄ は気道平滑筋増殖に影響するという報告もあり、気道のリモデリングにも関与する可能性も考えられる。

LTC₄ の重要な作用の一つである好酸球の局所への動員については、そのメカニズムについては

* Department of Internal Medicine, St. Marianna University School of medicine, Kawasaki-City, Kanagawa, Japan 聖マリアンナ医科大学内科学講座

いまだ明らかにされていない。そこで今回、筆者らは肺線維芽細胞の eotaxin 産生に対する LTC₄ の影響について検討を行った。

材料と方法

(1) 肺線維芽細胞の培養

ヒト胎児肺線維芽細胞(HFL-1)は American Type Tissue Culture Collection(Rockville, Md., USA)より入手した。培養液は非動化した10% fetal bovine serum(Gibco, Grand Island, N. Y., USA)と1% penicillin/streptomycin(Gibco)を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)(Gibco)を用いた。HFL-1 はほかの線維芽細胞と同様に type I と type III コラーゲンを産生し、15~20 世代のものを使用した⁹⁾。HFL-1 は 24 well の tissue culture plate を用いて 1 well 当たり $1.5 \sim 2.0 \times 10^5$ の細胞浮遊液 (2 ml) とし培養器で 37°C, 5%CO₂ の環境で培養した。開始後 3~4 日で HFL-1 は confluent となった。

(2) 試薬

LTC₄, platelet-activating factor (PAF), prostaglandin D₂ (PGD₂) は Sigma 社 (St Louis, Mo., USA), histamine は和光純薬 (大阪, 日本), recombinant human IL-4 (IL-4) は Genzyme 社 (Cambridge, Ma., USA) より入手した。PAF, PGD₂ は ethanol で、それぞれ 10^{-2} M, 10^{-3} M の濃度に溶解した。histamine は 0.01 N HCl で 10^{-2} M の濃度に溶解し 4°C で保存した。LTC₄, IL-4, PAF, PGD₂ は -70°C で保存した。

(3) Eotaxin の産生

HFL-1 が confluent になった時点で、各 well に 500 μ l ずつ DMEM を加え、IL-4 あるいは各ケミカルメディエーターを添加し培養を行った。48 時間培養したのち上清を回収し、測定まで -70°C で保存した。eotaxin の定量は ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, Mn., USA) を用いて行った。

(4) データの解析

すべての実験は duplicate で行い、少なくとも 3 回繰り返し行った。有意差検定は Wilcoxon 符号付順位和検定を用いて行った。

図 1 Effects of chemical mediators and IL-4 on eotaxin production by fibroblast

Confluent fibroblast monolayers were cultured with culture medium alone (control), medium containing 10^{-6} M histamine, 10^{-6} M LTC₄, 10^{-6} M PAF, 10^{-6} M PGD₂, or 100 ng/ml IL-4 for 48 h. Each column represents the mean $\pm$ SEM obtained from seven experiments performed in duplicate. *signify $P < 0.05$ significance between control fibroblast and cytokine-treated fibroblast.

結 果

(1) 線維芽細胞による eotaxin 産生に対するケミカルメディエーターの効果

図 1 には、線維芽細胞の eotaxin 産生に対する種々のケミカルメディエーターおよび IL-4 の影響を示す。IL-4 はコントロールにくらべ eotaxin 産生の有意な増強を惹起した ($n=7$, $p < 0.05$)。一方、種々のケミカルメディエーター、すなわち histamine, LTC₄, PAF, PGD₂ はいずれも eotaxin 産生に対し有意な効果を示さなかった。なお、濃度は既報¹⁰⁾のごとく設定した。

(2) 線維芽細胞による eotaxin 産生に対する IL-4 存在下での LTC₄ の効果

種々のケミカルメディエーターのうち、LTC₄ 単独は、eotaxin 産生に対し有意ではないが軽度の増強傾向を示したため、ついで IL-4 存在下での LTC₄ の効果について検討した。

図 2 に示すように、IL-4 は線維芽細胞による eotaxin 産生を増強するが、IL-4 とともに LTC₄ を添加すると、IL-4 単独にくらべさらに有意に

図2 Effects of IL-4 and LTC₄ on eotaxin production by fibroblast

Fibroblasts were cultured with or without 10^{-6} M LTC₄ in the absence or presence of 100 ng/ml IL-4 for 48 h. Each column represents the mean $\pm$ SEM obtained from seven experiments performed in duplicate. *signify $P < 0.05$ significance between control and IL-4 treatment, or IL-4 treatment and IL-4+LTC₄ treatment.

eotaxin 産生は増強した。すなわち、LTC₄はIL-4 存在下で eotaxin 産生に対する有意な増強効果を示した。

(3) LTC₄の濃度に関する検討

図3は、線維芽細胞の eotaxin 産生に対する IL-4(100 ng/ml)存在下での、LTC₄の濃度の影響を検討した結果である。図から明かなように、IL-4 存在下で LTC₄は eotaxin 産生を濃度依存性に増強し、その効果は 10^{-6} M で最大となった。

(4) Eotaxin 産生の時間経過に対する検討

図4には、mediumのみ、LTC₄、IL-4あるいはIL-4+LTC₄によって惹起される eotaxin 産生の時間経過を示す。IL-4による eotaxin 産生の増強効果は12時間後より発現した。そして、IL-4単独群との比較によるLTC₄併用によるさらなる増強効果は48時間後に明らかとなった。

考 察

今回の研究において、筆者らは肺線維芽細胞の eotaxin 産生に対する LTC₄の作用を検討した。肺線維芽細胞の eotaxin 産生に対し、LTC₄は単

図3 Dose dependence of LTC₄ on eotaxin production by fibroblast

Fibroblasts were cultured with LTC₄ at the concentrations indicated in the presence of 100 ng/ml IL-4 for 48 h. Data are mean $\pm$ range of duplicate cultures in a representative of three separate experiments.

独では有意な増強効果を示さなかった。しかしながら、eotaxin 産生に対し増強効果をもつ IL-4 とともに LTC₄を培養系に添加すると、IL-4 単独にくらべて有意に eotaxin 産生は増強した。したがって、LTC₄は一定の条件下で肺線維芽細胞からの eotaxin 産生を増強することが明らかにされた。

これまで CysLTs(LTC₄/D₄/E₄)には局所への好酸球の動員作用があることが明らかになっている。しかしながら、CysLTsの好酸球に対する直接の遊走活性はPAFやeotaxinにくらべて明らかに弱いことが示されている¹¹⁾。

Underwoodらの報告では、モルモットにおいて、LTD₄吸入で惹起された好酸球浸潤はCysLT受容体拮抗薬のみならず、抗IL-5抗体によって抑制されたことが示されている¹²⁾。したがって、CysLTsによる好酸球の局所への動員作用は直接的、間接的にほかの炎症細胞や組織細胞、あるいはそれらに由来するサイトカインも関与したうえで惹起される可能性がある。

Eotaxinは、抗原負荷した喘息モルモットのBALFから好酸球の組織集積を指標として分離されたケモカインである¹³⁾。in vivoでは投与局所

図4 Time course of eotaxin production
Fibroblasts were cultured with (closed triangles) or without (closed circles) 10^{-6} M LTC₄ in the presence of 100 ng/ml IL-4 for the time indicated. Fibroblasts were cultured with LTC₄ in absence of IL-4 (open triangles). As control, fibroblasts were cultured without LTC₄ in the absence of IL-4 for various times (open circles). Data are mean $\pm$ range of duplicate cultures in a representative of three separate experiments.

に好酸球を集積させ、*in vitro* ではケモカインのなかで最も強い好酸球遊走活性を示す。eotaxinの産生細胞は線維芽細胞¹⁾、血管内皮細胞²⁾、上皮細胞³⁾などであり、特に*in vitro* では線維芽細胞は大量のeotaxinを産生する⁶⁾。eotaxin産生はIL-4⁷⁾、TNF- α ¹⁴⁾、IL-13¹⁵⁾により増強することが、報告されている。

今回、筆者らの検討でLTC₄はIL-4存在下で肺線維芽細胞からのeotaxin産生を増強した。そこで、CysLTsの局所への好酸球動員作用は肺線維芽細胞からのeotaxin産生増強を介する可能性が示された。一方、マウスにおいてeotaxin腹腔内投与によって腹腔洗浄液中好酸球は増加するが、このeotaxinの作用が5-lipoxygenase inhibitorにより抑制されることが報告されている¹⁶⁾。このことは、eotaxinは好酸球の遊走、さらに活性化に働いてCysLTsを産生させ、CysLTsは線維芽細胞に作用して、さらにeotaxinを産生させて好酸球を局所に動員する。このような線維芽細胞と好酸球の相互作用の繰り返しにより好酸球浸潤が進

行していく可能性も考えられる。

今回、筆者らの系におけるeotaxin産生の時間経過において、IL-4+LTC₄によるeotaxin産生はIL-4単独の場合に比較して24時間以降に増強している。一方、実験的喘息においてCysLTsを投与しても、抗原惹起においても好酸球の局所への遊走は惹起数時間後に起きており、12時間以降では好酸球の局所への浸潤は終わっている。この点に関して、前述のようにCysLTsによる好酸球の局所への動員作用は、直接的間接的に線維芽細胞のみならずほかの細胞も関与したうえで、そして、それらに由来するほかのサイトカインも関与したうえで惹起されると考えられる。

したがって、IL-4存在下でのCysLTsによる線維芽細胞からのeotaxin産生増強の機序は、初期の好酸球浸潤への関与というよりも、局所での持続的な好酸球浸潤の増強という形に働いている可能性も考えられる。

最近、CysLTsに対する受容体であるCysLT₁受容体、CysLT₂受容体が相ついでクローニングされ、いずれもG蛋白共役型7回膜貫通型受容体である^{17,18)}ことが明らかにされた。IL-4存在下でLTC₄によりeotaxin産生増強を認めたメカニズムについて、HFL-1上のCysLT受容体を介するものとすれば、それはCysLT₁受容体拮抗薬によって阻害されるはずであり、現在同方向の検討を進めている。また細胞内のシグナル伝達への影響についても、今後の検討が必要とされる。

気管支喘息において、好酸球性炎症は主要病態の一つである。今回、筆者らはIL-4存在下でLTC₄が肺線維芽細胞からのeotaxin産生を増強することを示した。上記結果は、Th2サイトカイン優位である気管支喘息のアレルギー性炎症において、CysLTsの線維芽細胞からのeotaxin産生増強作用が、好酸球浸潤のメカニズムの一つとなっている可能性を示すものである。

稿を終えるに当たりご指導、ご校閲を賜りました聖マリアンナ医科大学呼吸器・感染症内科 中川武正教授に深謝申し上げます。また、実験にご協力いただきました石井絵里加研究補助員、加藤紀

美江研究補助員にも感謝致します。

文 献

- 1) Bartres J, Schluter C, Richter E, Noso N, Kulke R, Christophers E, Schroder JM : Human dermal fibroblasts express eotaxin : molecular cloning, mRNA expression, and identification of eotaxin sequence variants. *Biochem Biophys Res Commun* 225 : 1045-1051, 1996.
- 2) Rothenberg ME, Luster AD, Leder P : Murine eotaxin : an eosinophil chemoattractant inducible in endothelial cells and in interleukin 4-induced tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 8960-8964, 1995.
- 3) Lilly CM, Nakamura H, Kesselman H, Nagler AC, Asano K, Garcia ZE, Rothenberg ME, Drazen JM, Luster AD : Expression of eotaxin by human lung epithelial cells : induction by cytokines and inhibition by glucocorticoids. *J Clin Invest* 99 : 1767-1773, 1997.
- 4) Lamkhioeu B, Renzi PM, Abi-Younes S, Garcia-Zepeda EA, Allakhverdi Z, Ghaffar O, Rothenberg MD, Luster AD, Hamid Q : Increased expression of eotaxin in broncho alveolar lavage and airways of asthmatics contributes to the chemotaxis of eosinophils to the site of inflammation. *J Immunol* 159 : 4593-4601, 1997.
- 5) Mattoli S, Stacey MA, Sun G, Bellini A, Marini M : Eotaxin expression and eosinophilic inflammation in asthma. *Biochem Biophys Res Commun* 236 : 299-301, 1997.
- 6) Miyamasu M, Nakajima T, Misaki Y, Izumi S, Tsuno N, Kasahara T, Yamamoto K, Morita Y, Hirai K : Dermal fibroblasts represent a potent major source of human eotaxin : *in vitro* production and cytokine-mediated regulation. *Cytokine* 103 : 751-758, 1999.
- 7) Mochizuki M, Bartels J, Mallet AI, Christophers E, Schroder JM : IL-4 induces eotaxin : a possible mechanism of selective eosinophil recruitment in helminth infection and atopy. *J Immunol* 160 : 60-68, 1998.
- 8) Arm JP, Lee TH : Sulphidopeptide leukotrienes in asthma. *Clin Sci* 84 : 501-510, 1993.
- 9) Breul SD, Bradley KH, Hance AJ, Schafer MP, Breg RA, Crystal RG : Control of collagen production by human diploid lung fibroblasts. *J Biol Chem* 255 : 2129-2139, 1980.
- 10) Takafuji S, Tadokoro K, Ito K, Nakagawa T : Release of granule proteins from human eosinophils stimulated with mast-cell mediators. *Allergy* 53 : 951-956, 1998.
- 11) Barnes PJ, Kroegel C, Yutaka T, Dent G, Chung KF : Pharmacology of eosinophils : In eosinophils, Allergy and Asthma. (Kay AB eds), Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK : 1990, p 144-57.
- 12) Underwood DC, Osborn RR, Newsholme SJ, Torphy TJ : Persistent airway eosinophilia after LTD₄ administration in the guinea pig : modulation by the LTD₄ receptor antagonist, pranlukast, or an IL-5 monoclonal antibody. *Am J Respir Crit Care Med* 154 : 850-857, 1996.
- 13) Jose PJ, Griffiths JD, Collins PD, Walsh DT, Moqbel R, Totty NF, Truong O, Hsuan JJ, Williams TJ : Eotaxin : a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *J Exp Med* 179 : 881-887, 1994.
- 14) Ghaffar O, Hamid Q, Renzi PM, Allakhverdi Z, Molet S, Hogg JC, Shore SA, Luster AD, Lamkhioeu B : Constitutive and cytokine-stimulated expression of eotaxin by human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med* 159 : 1933-1942, 1999.
- 15) Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, Zhang Y, Elias JA : Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest* 103 : 779-788, 1999.
- 16) Harris RR, Komater VA, Maret RA, Wilcox DM, Bell RL : Effect of mast cell deficiency and leukotriene inhibition on the influx of eosinophils induced by eotaxin. *J Leukoc Biol* 62 : 688-691, 1997.
- 17) Lynch KR, O'Neill GP, Liu Q, Im DS, Sawyer N, Metters KM, Coulombe N, Abramovitz M, Figueroa DJ, Zeng Z, Connolly BM, Bai C, Austin CP, Chateau-neuf A, Stocco R, Greig GM, Kargman S, Hooks SB, Hosfield E, Williams DL Jr, Ford-Hutchinson AW, Caskey CT, Evans JF : Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT₁ receptor. *Nature* 399 : 789-793, 1999.
- 18) Nothacker HP, Wang Z, Zhu Y, Reinscheid RK, Lin SH, Civelli O : Molecular cloning and characterization of a second human cysteinyl leukotriene receptor : discovery of a subtype selective agonist. *Mol Pharmacol* 58 : 1601-1608, 2000.