

学位論文
Doctor's Thesis

肝肉芽腫形成における CC ケモカイン受容体 2 の役割
(The role of C-C chemokine receptor 2 in hepatic granuloma formation)

陣内克紀
Katsunori Jinnouchi

指導教官

熊本大学大学院医学研究科博士課程 内科学第三
富田 公夫 教授

熊本大学医学研究科 病理学第二
竹屋 元裕 教授

2004 年度

目 次

1. 要 旨
2. 参考論文
3. 謝 辞
4. 略語一覧
5. 研究の背景と目的
 - 5－（1）研究の背景
 - 5－（2）研究の目的
6. 材料と方法
 - 6－（1）使用したマウス
 - 6－（2）光顕標本作製
 - 6－（3）電顕標本作製
 - 6－（4）免疫組織化学的解析
 - 6－（5）RT-PCR
 - 6－（6）ELISA
7. 実験結果
 - 7－（1）肝肉芽腫の数と大きさの変化
 - 7－（2）電子顕微鏡による肉芽腫の解析
 - 7－（3）肉芽腫形成細胞の免疫組織化学的解析
 - 7－（4）肝肉芽腫形成における炎症性サイトカインの mRNA の発現
 - 7－（5）血清のサイトカインレベルの変化
8. 考 察
9. 結 語
10. 参考文献

1. 要旨

【目的】肉芽腫の形成初期においては、局所で産生されるサイトカンが深く関与し、肉芽腫中へのマクロファージの浸潤と集積については、CC ケモカインである monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) とその主要な受容体である CC ケモカイン受容体 2 (CCR2) が重要な役割を果たすものと想定される。本研究では、肝肉芽腫形成における MCP-1/CCR2 系の役割を明らかにするため、CCR2 欠損マウスにゼイモザン A 誘発肝肉芽腫を作成し、肉芽腫形成における MCP-1/CCR2 の役割を検討した。

【方法】10~20 週令の CCR2 欠損マウスおよびコントロールマウスにゼイモザン A (1 mg/匹) を尾静脈より投与し、肝肉芽腫形成過程を HE 染色、免疫組織化学ならびに電顕的に検討した。サイトカン産生に関しては、RT-PCR および ELISA にて検討を加えた。

【結果】コントロールマウスでの肉芽腫形成は、その数と大きさが投与後 10 日をピークに増加したのに対し、CCR2 欠損マウスでは 5 日に低いピークを示し、以後は漸減した。CCR2 欠損マウスの肉芽腫は 5 日から 21 日まで、コントロールマウスに比べて有意に数が少なく、直径も小さかった。免疫染色によって細胞種別の動態を検討すると、コントロールマウスでは 2 日から 10 日にかけて肉芽腫中への単球の集積がみられたが、CCR2 欠損マウスではその集積に乏しかった。一方、CCR2 欠損マウスではいずれの時点でも肉芽腫中の顆粒球の割合がコントロールマウスに比し高値を示した。また、CCR2 欠損マウスでは、コントロールマウスではほとんど見られなかった多核巨細胞の出現が目立った。サイトカンの検索では、CCR2 欠損マウスでは IFN- γ の産生が抑制されており、肝臓での IFN- γ の発現が遅延し、血中の IFN- γ も低値であった。

【考察・結論】CCR2 欠損マウスでは肉芽腫形成の遅延がみられたが、これには局所への単球浸潤の抑制が大きく関与すると考えられた。さらに、CCR2 欠損マウスでは IFN- γ の産生が抑制されており、肉芽腫形成に IFN- γ が重要な役割を果たすと考えられる。多核巨細胞はマクロファージの最終分化段階の細胞と考えられ、単球流入の少ない CCR2 欠損マウスにおける特殊な環境下で多核巨細胞形成が促進されたものと推定された。

Summary

Granulomas are characterized histologically by a nodal collection of macrophages with occasional admixture of epithelioid cells, multinucleated giant cells, and other immune competent cells. Chemokines are considered to play an important role in the recruitment of these constituent cells of granulomas. In this study, we examined the effect of a deficiency of C-C chemokine receptor-2 (CCR2) on hepatic granuloma formation induced by a single injection of Zymosan A. In CCR2^{+/+} mice, the numbers and sizes of granulomas gradually increased until they reached peak values at 10 days after the injection. In CCR2^{-/-} mice, in contrast, both the numbers and the sizes of granulomas were smaller than those in the CCR2^{+/+} mice from days 5 to 21. They showed low peaks at day 5, after which the numbers and the sizes of the granulomas gradually decreased. Immunohistochemical analysis of the constituent granuloma cells with the use of cell type-specific monoclonal antibodies, revealed rapid accumulation of blood monocytes, with subsequent differentiation to macrophages, in CCR2^{+/+} mice during days 2-10. This process was greatly impaired in CCR2^{-/-} mice, and granulomas remained small. At all time points, the percentage of polymorphonuclear cells in granuloma constituent cells was higher in CCR2^{-/-} mice than CCR2^{+/+} mice. Interestingly, multinucleated giant cells were frequently observed in granulomas in CCR2^{-/-} mice, whereas these cells rarely appeared in CCR2^{+/+} mice. Profiles of liver cytokine RNA levels as well as serum cytokine levels revealed reduced expression of the gene for the Th1 cytokine IFN- γ in CCR2^{-/-} mice. These data clearly indicate that signaling through CCR2 has many effects on the normal growth and development of hepatic granulomas.

2. 参考論文

1) 関連論文

Jinnouchi K, Terasaki Y, Fujiyama S, Tomita K, Kuziel WA, Maeda N, Takahashi K, Takeya M.

Impaired hepatic granuloma formation in mice deficient in C-C chemokine receptor 2.
J.Pathol 2003 Jul;200(3):406-416

2) その他の論文

1. Takaku M, Wada Y, Jinnouchi K, Takeya M, Takahashi K, Usuda H, Naito M, Kurihara H, Yazaki Y, Kumazawa Y, Okimoto Y, Umetani M, Noguchi N, Niki E, Hamakubo E, Kodama T.

An in vitro coculture model of transmigrant monocytes and foam cell formation
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 19: 2330-2339, 1999.

2. Takeya M, Tomokiyo R, Jinnouchi K, Sakaguchi H, Hagiwara S, Honda M, Wada Y, Suzuki H, Kodama T, Takahashi K.

Macrophage scavenger receptors: Structure, function and tissue distribution (review).
Acta Histochem. Cytochem. 32: 47-51, 1999.

3. Takahashi K, Takeya M, Sakashita N, Yoshimatsu M, Jinnouchi K.

The role of macrophage scavenger receptors in atherogenesis.
Seminars in Clin. Immunol. 1: 29-38. 2000.

4. Takahashi K, Takeya M, Sakashita N, Yoshimatsu M, Jinnouchi K.

The role of macrophage scavenger receptors in atherogenesis. in Atherosclerosis and Autoimmunity
(Y Shoenfeld, D Harants and G Wick eds.), Elsevier Science, pp29-40, 2001.

5. Sakashita N, Ando Y, Jinnouchi K, Yoshimatsu M, Terazaki H, Obayashi K, Takeya M.

Familial amyloidotic polyneuropathy (ATTR Val30Met) with widespread cerebral amyloid angiopathy and lethal cerebral hemorrhage.
Pathol Int. 51: 476-480, 2001.

6. Tomokiyo R, Jinnouchi K, Honda M, Wada Y, Hamada N, Hiraoka T, Suzuki H, Kodama T, Takahashi K, Takeya M.

Production, characterization, and interspecies reactivities of monoclonal antibodies against human class A macrophage scavenger receptors.

Atherosclerosis 161: 123-132. 2002.

7. Takeya M, Tomokiyo R, Jinnouchi K, Honda M, Wada Y, Suzuki H, Kodama T, Takahashi K.

CD204: Macrophage scavenger receptor, a new differentiation marker for macrophages.

In Leucocyte Typing VII. White Cell Differentiation Antigens (Mason D et al. eds), Oxford University Press, pp378-380, 2002.

8. Takeya M, Jinnouchi K, Tomokiyo R, Hayashida J, Honda M, Wada Y, Suzuki H, Kodama T, Takahashi K.

CD204: macrophage scavenger receptor, a novel differentiation marker for macrophages.

Lymphoreticular Cells and Diseases (Proceedings of the 7th Korean-Japanese Lymphoreticular Workshop) (Lee HJ, Akagi T, Kim I, Takeya M. eds), Seoul, Korea, Hematolymphoreticular Study Group, The Korea Society of Pathologists, 15-21, 2002.

3. 謝 辞

本研究の機会を賜り、ご指導いただきました熊本大学大学院医学研究科内科学第三講座の冨田公夫教授に深く感謝いたします。

本研究は熊本大学医学研究科病理学第二講座の高橋潔前教授ならびに竹屋元裕教授のご指導のもとに行っており、本当に多面のご指導を賜りました竹屋元裕教授に深謝致します。

さらに、研究にご協力頂いた中川雄伸技官をはじめとする熊本大学医学研究科病理学第二講座の諸兄ならびに熊本大学動物資源開発研究センターと遺伝子実験施設のスタッフに感謝の意を捧げます。

4. 略語一覽

CCL: CC chemokine ligand

CCR: CC chemokine receptor

cDNA: complementary DNA

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

G3PDH: glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase

GM-CSF: granulocyte macrophage colony-stimulating factor

IFN: interferon

IL: interleukin

MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1

M-CSF: macrophage colony-stimulating factor

mRNA: messenger RNA

PCR: polymerase chain reaction

PLP: periodate-lysine-paraformaldehyde

TNF: tumor necrosis factor

5. 研究の背景と目的

5 - (1) 研究の背景

肉芽腫形成は慢性炎症で生じる特徴的な組織学的過程の一つである。種々の慢性炎症性疾患、例えば、結核、真菌感染症、サルコイドーシスなどにおいて組織学的にも特徴的な肉芽腫形成が観察される。生体防御の側面から考えると、肉芽腫は種々の炎症性刺激をおこす有害物質を周囲の組織から孤立させる防御反応と位置付けることもできるが、一方で病原体を免疫反応から隔離することで、持続的な感染を引き起こす要因ともなる。組織学的には、肉芽腫は、マクロファージ、類上皮細胞ならびに多核巨細胞の結節状の集簇を特徴とし、これらの細胞以外の構成細胞として、リンパ球、形質細胞、あるいは好酸球や好中球等の多核白血球も参画することがある[1]。

ケモカインは、細胞遊走を主要な作用とするサイトカン群で、ヒトでは 45 種にもものぼるケモカインが発見され、これらに対応する 18 種のケモカイン受容体がみついている。ケモカインにはよく保存された 4 つのシステイン残基が存在し、そのうち N 末端側の 2 個の形成するモチーフによって、CXC、CC、C、CX3C (X は他のアミノ酸) の 4 つのサブファミリーに分類されている。ケモカイン受容体は、すべて 7 回膜貫通型 3 量体 G タンパク質共役型受容体の構造をとり、他の多くのシグナル伝達型受容体と共通の構造を示す。

ケモカインファミリーの特徴として、2) CXC ケモカイン群は主に好中球を遊走し、それらの遺伝子は第 4 染色体にクラスターを形成する、2) CC ケモカイン群は主に単核球を遊走し、遺伝子は第 17 染色体にクラスターを形成する、3) 1 つのリガンドが複数の受容体に作用するとともに、1 つの受容体が複数のリガンドを認識するという、「受容体の交雑性」と「リガンドの重複性」という複雑な反応様式があげられる [2]。

5 - (2) 研究の目的

肉芽腫形成に関係する様々な生体反応の中で、肉芽腫の主要構成細胞であるマクロファージの浸潤は、肉芽腫形成過程を解析する上で最も重要な要素の一つである。炎症局所への浸潤マクロファージの多くは血液単球由来であり、単球の局所浸潤には、CC ケモカイン群が重要な役割を果たす。なかでも、1989 年に発見された MCP-1/CCL2 は CC ケモカイン群のプロトタイプと考えられ、

多くの炎症局所への単球浸潤に重要な役割を果たしている[3, 4, 5]。肉芽腫形成においても MCP-1/CCL2 は重要な役割を果たしており、例えば、サルコイドーシスの患者では血中の MCP-1/CCL2 が増加していること[4]、*Propionibacterium acne* によるウサギ肺肉芽腫形成モデルでは血清 MCP-1/CCL2 レベルが肉芽腫形成に先んじて増加し、抗 MCP-1/CCL2 抗体投与により肉芽腫形成が抑制されることが報告されている[5]。CCR2 は MCP-1/CCL2 に対する主要な受容体であり[6]、CCR2 欠損マウスでは、肺や肝臓の肉芽腫形成が抑制されることが報告されている[7, 8]。しかしながら、肉芽腫を構成する細胞やケモカインの時系列での正確な解析は報告されていない。この研究では CCR2 欠損マウスを用いてグルカン誘発肝肉芽腫を惹起し、肉芽腫を構成する様々な細胞の動態を解析することによって、肉芽腫形成における MCP-1/CCL2-CCR2 系の役割を解明した。

6. 材料と方法

6- (1) マウス

CCR2 欠損マウス (129/Ola x C57BL/6) は、テキサス大学の W.A. Kuziel らによって作出されたもの[8]を導入した。CCR2 欠損マウスは C57BL/6 マウスに4世代以上逆交配したものを扱い、同様の処置で得られた野生型マウスをコントロールマウスとして用いた。飼育は、熊本大学動物資源開発研究センターで SPF で行い、すべての動物実験手技は、熊本大学動物実験指針に従って行われた。

実験には3~5月齢の CCR2 欠損マウスならびにコントロールマウスを用い、肝肉芽腫の惹起には Zymosan A (1.0mg/マウス、Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) を尾静脈から投与した。投与後、2、5、8、10、14、21 日目にエタノール麻酔にて屠殺して肝臓を採取し、一部を mRNA 解析用に液体窒素にて凍結し、残りは形態解析のために固定した。それぞれの時系列で少なくとも6匹ずつの CCR2 欠損マウスとコントロールマウスを使用した。

6- (2) 光顕標本作製

肝臓を 10%ホルムアルデヒドで固定し、パラフィンに包埋し、3 μ m で薄切し、HE 染色を施行した。

6- (3) 電顕標本作製

肝組織を 2%グルタルアルデヒドで 1 時間固定した後、1%オスミウムで後固定し、エタノールとプロピオンオキサイドで脱水後、エポキシ樹脂で包埋

した。超薄切切片を作成し、ウラニル酢酸とクエン酸鉛で染色し H-7500 電子顕微鏡 (Hitachi, Tokyo, Japan) で観察した。

6 - (4) 免疫組織化学的解析

肝臓を 2%PLP (periodate-lysine-paraformaldehyde) 液で 4℃、4 時間固定し、OCT コンパウンド (Miles, Ekhart, IN) に包埋後、液体窒素で凍結した。クリオスタットで 6 μ m 薄切し、Isobe らの方法[9]で、内因性ペルオキシダーゼ阻害後表 1 に示したモノクローナル抗体を一次抗体として間接酵素抗体法によって免疫染色を施行した。2 次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ラットイムノグロブリン抗体 [F(ab')₂] (Serotec Ltd., Raleigh, North Carolina) を使用した。3,3'-ジアミノベンチジンにて発色後ヘマトキシリンで核染色し、封入した。1 次抗体を省略し、2 次抗体のみ使用した組織を陰性コントロールとした。

表 1

Immunoreactive and Antigen Specificities of Monoclonal Antibodies Used in This Study

Monoclonal antibody	Isotype	Immunoreactive cells	Reference
F4/80	IgG2b	Promonocytes, monocytes, free or tissue-fixed macrophages, Kupffer cells, histiocytes, synovial A cells, microglial cells, phagocytes on periosteal and endosteal bone surfaces, epidermal Langerhans cells	8
ER-MP20	IgG2a	Macrophage colony-forming cells, monoblasts, promonocytes, monocytes, immature macrophages	9
ER-MP58	IgM	Myeloid precursors (granulocyte-macrophage and macrophage colony-forming cells), monoblasts	
Gr-1	IgG2b	Monocytes in the bone marrow, neutrophils in the periphery	10
Thy-1.2	IgG2b	T lymphocytes	11
NLDC-145	IgG2b	Dendritic cells, interdigitating cells, veiled cells, Langerhans cells of the skin	12, 13, 14
B7-2	IgG2a	B cells, T cells, macrophages, dendritic cells	15
B7-1	IgG2a	Dendritic cells, monocytes, peritoneal macrophages	16
B220	IgG2a	B lymphocytes	16

6 - (5) RT-PCR

肝臓からの RNA 抽出には QIAGEN (Chatsworth, CA) RNeasy kit を用いた。RNA (1 μ g) は 50ng の random primer (Gibco BRL, Rockville, MD) と混合し、混合液を 70℃、10 分煮沸し、氷上で冷却した。4 μ l の 5x RT 緩衝液、1 μ l の 10mmol/L の deoxyribonucleotide 3-phosphates mix (dNTPs mix) (Perkin-Elmer Corp., Branchburg, NJ)、1 μ l の reverse transcriptase (RT) (200 U/ml, Gibco BRL)、2 μ l の 0.1mol/L DDT (Dithiothreitol) を加え、精製水を足して総量を 20 μ l にし、その混合液を 25℃で 10 分、37℃で 60 分、70℃で 15 分インキュベートした。PCR 増

幅は Gene Amplification PCR System 2400 (Perkin-Elmer Corp.)を使用した。反応液は cDNA 1 μ l と 10X PCR 増幅緩衝液(Qiagen, Catworth, CA) 2 μ l、10mmol/L dNTPs 混合液 0.4ml、50 μ mol/L プライマー0.2 μ l、Taq ポリメラーゼ(5U/ μ l.Qiagen, Catworth, CA)0.1 μ l、最後に精製水 16.3 μ l で総量を 20 μ l にした。この実験で使用したプライマーは表 2 に示した。別の混合液は 95 $^{\circ}$ C で 15 分インキュベートし、94 $^{\circ}$ C で 30 秒を 30~38 回繰り返す、54~64 $^{\circ}$ C で 30 秒後 72 $^{\circ}$ C を 1 分間。最後の elongation は 72 $^{\circ}$ C を 1 分行った。陰性コントロールとして脳からサンプルを採取し精製水を使用したものを使った。すべてのサンプルは 0.5 μ l/ml のエチジウムブロマイドを混ぜた 2%アガロースゲルに入れ、バンドは紫外線写真で撮影した。

表 2
Sequences of Oligonucleotide Primers Used for RT-PCR

mRNA	Primers	Sequences (5' to 3')	Products (bp)
CCL2	Sense	GCCAACTCTCACTGAAGCC	58
	Anti-sense	AGGCATCACAGTCCGAGTCA	
IFN- γ	Sense	GGAAGTGGCAAAGGATGGT	76
	Anti-sense	GACACATTCGAGTGCTGTGT	
TNF- α	Sense	GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTG	30
	Anti-sense	ACATTCGAGGCTCCAGTGAATTCG	
IL-10	Sense	ATAAGAGCAAGGCAGTTGGA	57
	Anti-sense	ACTCTCTTTAGGAGCTCTGAAC	
G3PDH	Sense	GGAAAGCTGTGGCGTGAT	38
	Anti-sense	CTGTTGCTGTAGCCGTAATC	

6 - (6) ELISA

血清の CCR2 (Mouse JE/CCR2 kit, R&D Systems Inc.)、TNF- α 、IFN- γ 、IL-4 (Mouse IFN-gamma, TNF-alpha, IL-4 ELISA kit, Endogene, Inc.) 濃度は ELISA kit を用いて測定した。

7. 実験結果

7 - (1) 肝肉芽腫の数と大きさの変化

図 1 に Zymosan A の静脈投与による肝肉芽腫の形成過程を示した。投与後 2 日目でコントロールマウスと CCR2 欠損マウスの何れにも小型の肝肉芽腫が観察された。これらの初期の小型肉芽腫はどちらも主に多核白血球によって形成されている (図 1A、1B)。コントロールマスでは 10 日までに肝肉芽腫の数と

大きさが徐々に増加し、10日目にピークに達した（図1E、図2）。

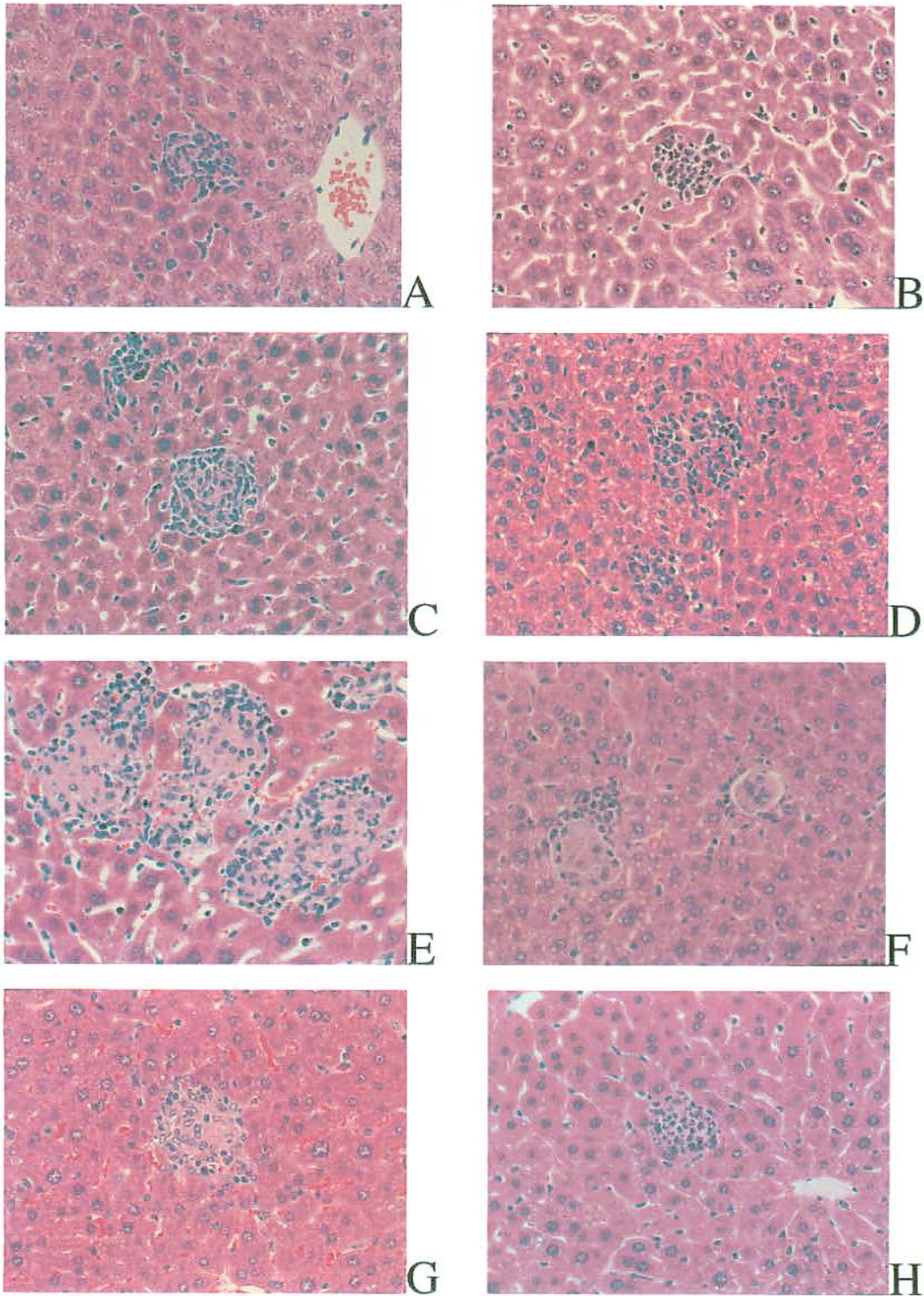


図1 HE染色

コントロールマウス (A, C, E, G) と CCR2^{-/-}マウス (B, D, F, H)

Zymosan A 静注後の2日目 (A, B)、5日目 (C, D)、10日目 (E, F)、21日目 (G, H)

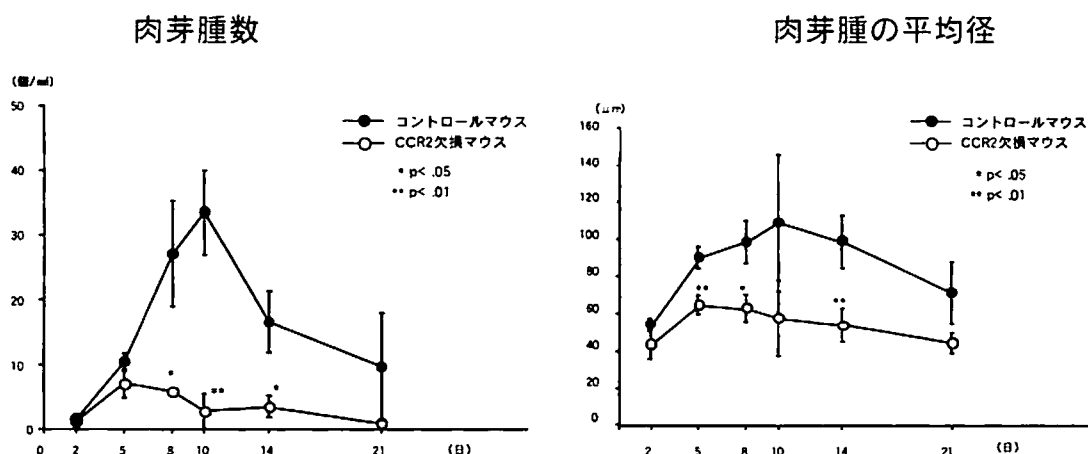


図2 コントロールマウスとCCR2^{-/-}マウスの肉芽腫数と平均径の推移

10日目以降には数と大きさは徐々に減少した。コントロールマウスでは、8日目と10日目の切片では、肉芽腫中に豊富な細胞質を持ち細胞境界が不明瞭な類上皮細胞の出現を伴っていた(図1E)。これとは対照的に、CCR2欠損マウスでは肉芽腫形成は強く抑制されており、肝肉芽腫の数と大きさはZymosan静注後5日目に小さいピークを迎え(図1D)、その後減少を示した(図2)。どの観察日でもコントロールマウスと比べて肉芽腫の数が少なく、小型であった。コントロールと比較するとCCR2欠損マウスの肉芽腫数は8日目、10日目、14日目で有意に少なく、5日目、8日目、14日目で有意に小型であった(図2)。ピーク時で肉芽腫数を比較すると、コントロールマウスの10日目とCCR2欠損マウスの5日目の肉芽腫数には有意な差がみられた(33.5 ± 6.57/mm² vs. 7.0 ± 2.17/mm²)。また、大きさにおいてもコントロールマウスのピーク時(10日目)とCCR2欠損マウスのピーク時(5日目)の間で、有意な差が認められた(108 ± 37.07 μm vs. 64.7 ± 4.93 μm)。また、CCR2欠損マウスの肉芽腫形成では多核巨細胞が目立った(図1Fと図3)。

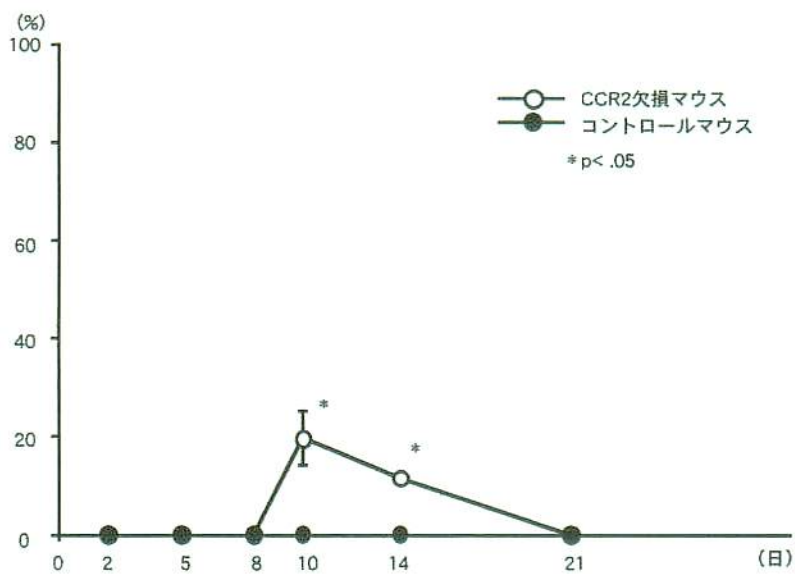


図3 肉芽腫における巨細胞の割合

7 - (2) 電子顕微鏡による肉芽腫の解析

肉芽腫を構成する細胞を特徴づけるため、まず電子顕微鏡での解析を行った。10日目のコントロールマウスの肉芽腫には大型マクロファージが密集しており(図4)、多核白血球は少数しか観察されなかった。一方、CCR2欠損マウスの肉芽腫は概して小さく、マクロファージは少なく周囲に多くの多核白血球を認められた(図4)。また、マクロファージの胞体内には Zymosan A の取込みが観察された(図4B)。

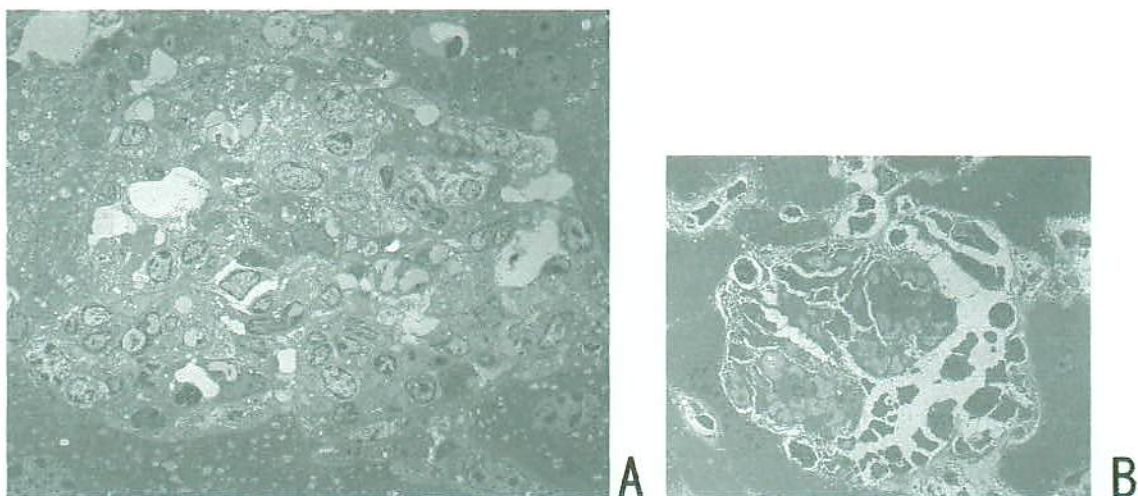


図4 Zymosan A 投与後10日目のコントロールマウス (A) と CCR2^{-/-}マウス (B) の電子顕微鏡写真

7 - (3) 肉芽腫形成細胞の免疫組織化学的解析

肉芽腫の構成細胞の細胞種を特定するとともに、その動態を解析するために各種細胞に特異的なモノクローナル抗体を用いて、免疫染色を行い、陽性細胞数をカウントした。コントロールマウスではマクロファージマーカーである F4/80 陽性細胞の割合が 10 日目まで時間経過とともに増加したが、CCR2 欠損マウスの肉芽腫での F4/80 陽性細胞[10]はいずれの日も少なかった (図 5、図 6 A)。

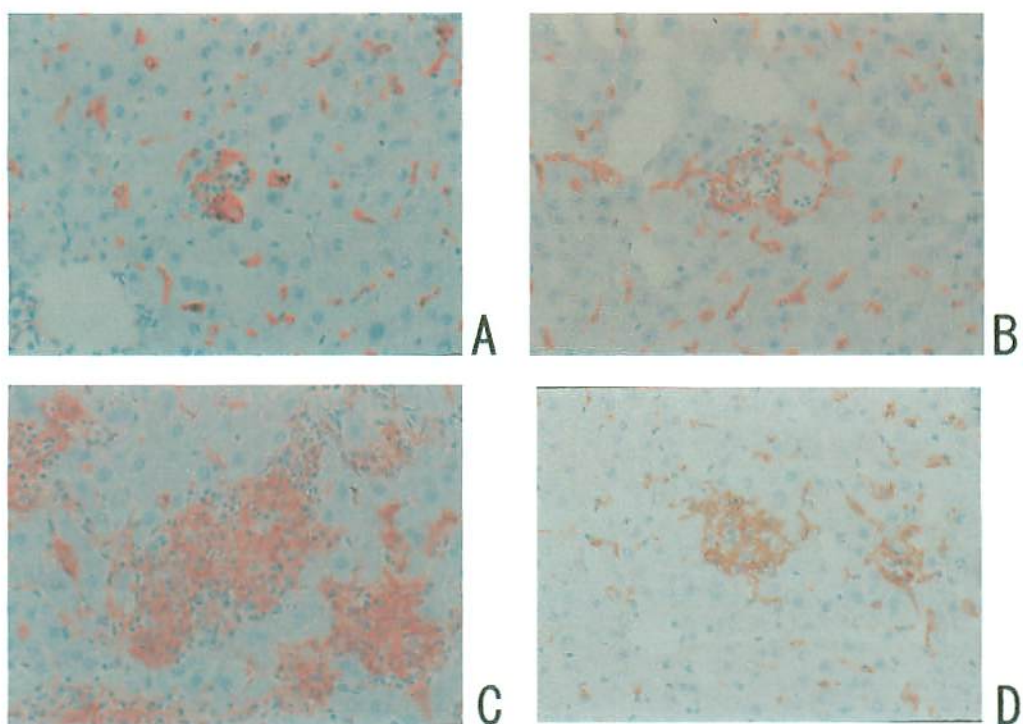


図 5 肉芽腫中の免疫組織化学染色 (F4/80 陽性細胞)

コントロールマウスの 2 日目 (A) と 10 日目 (C)

CCR2^{-/-}マウスの 2 日目 (B) と 10 日目 (D)

単球および単球から分化した早期のマクロファージを認識する ER-MP 20 の染色ではコントロールマウスでの陽性細胞の割合が 10 日目までに劇的な増加を示した。一方、CCR2 欠損マウスでは 2 日目から 10 日目まで ER-MP 20 陽性細胞[11]の割合に増加はみられなかった (図 6 B)。このことから、CCR2 欠損マウスでの肉芽腫形成では、血中単球からのマクロファージの動員が非常に少

ないことが示唆される。

肉芽腫内の Gr-1 陽性細胞（顆粒球）[12]の割合は、コントロールマウスに比べ CCR2 欠損マウスにおいて、いずれの日でも高値を示し（図 6 C）、とくに 2 日目、8 日目、21 日目では有意差がみられた。Thy-1.2 陽性細胞（T 細胞）[13]の割合には有意差はみられなかった（図 6 D）。ER-MP 58（骨髄前駆細胞）[14]、NLDC145（樹状細胞）[15]、B220（B 細胞）[16. 17]、B7-2 ならびに B7-1 陽性細胞[18]はいずれのグループでも少数で（1%未満）、有意差はみられなかった。

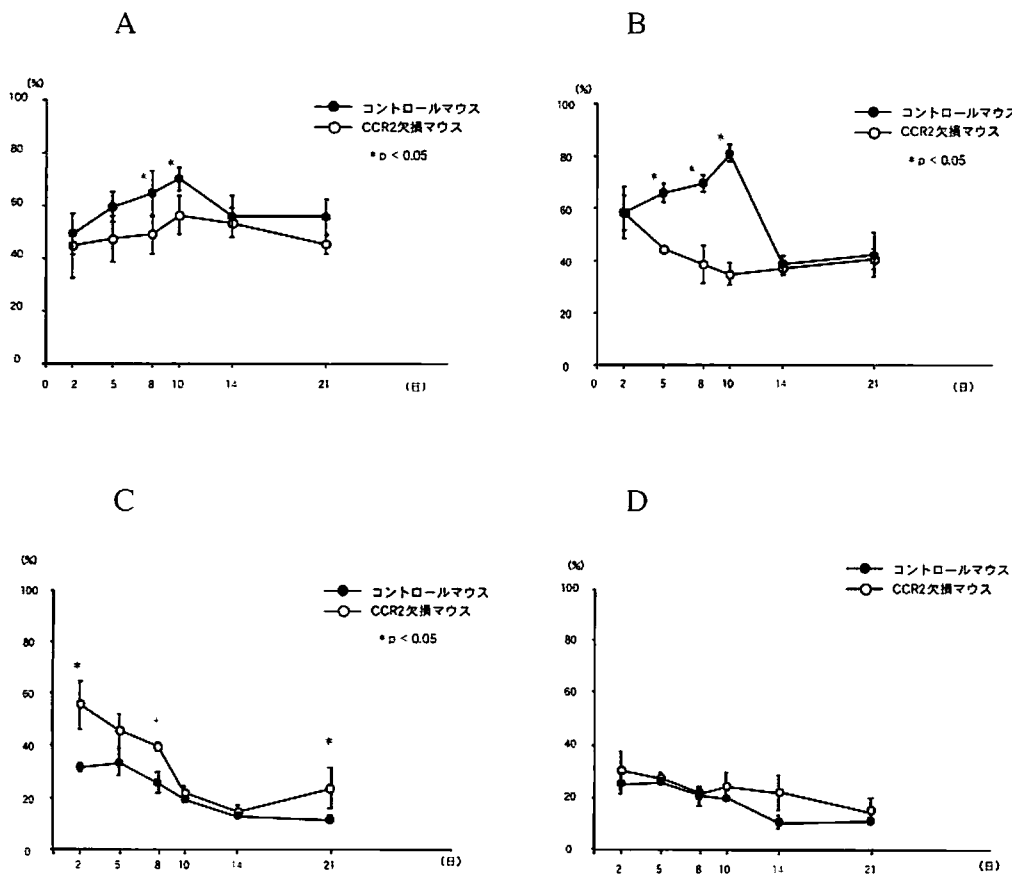


図 6 肉芽腫内の構成細胞の割合

A : F4/80 陽性細胞 B : ER-MP 20 陽性細胞
 C : Gr-1 陽性細胞 D : Thy-1.2 陽性細胞

7- (4) 肝肉芽腫形成における炎症性サイトカインの mRNA の発現

肝肉芽腫形成過程における肝臓での炎症性サイトカインの mRNA 発現を RT-PCR によって検討した (図7)。コントロールマウスではタイプ I サイトカインである IFN- γ は5日目に発現がみられ、14日目まで持続した。一方、CCR2 欠損マウスでは5日目にのみに発現が認められた。MCP-1/CCL2、TNF- α 、IL-10 の mRNA 発現に関しては、両者間で大きな違いはみられなかった。



図7 コントロールマウスと CCR2^{-/-}マウスにおける肝臓での MCP-1、IFN- γ 、TNF- α およびIL-10 の mRNA 発現

7- (5) 血清のサイトカインレベルの変化

血清のサイトカインの測定では、コントロールマウスと CCR2 欠損マウス間にサイトカインレベルの違いが明らかとなった。コントロールマウスでは5日目から14日目まで血清中の IFN- γ の著明な上昇が観察された (図8A) これに対して、CCR2 欠損マウスでは、血清 IFN- γ は低値のままであった。血清中の MCP-1/CCL2 値は何れのマウスでも上昇がみられたが (図8B)、2日目と21日目では CCR2 欠損マウスで有意に高値を示した。IL-4 と TNF- α の血清濃度には両者間に有意差はみられなかった (未掲載)。

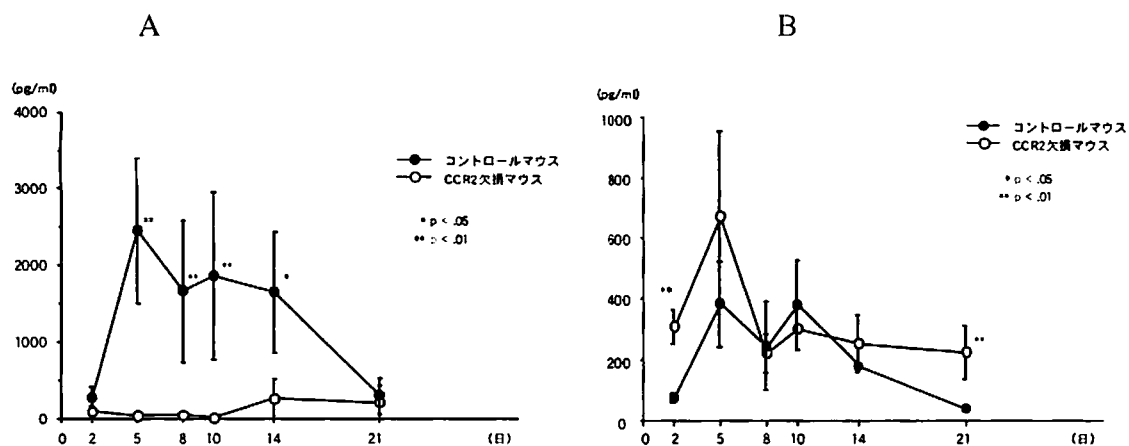


図8 血清のサイトカイン濃度 (A: IFN- γ , B: MCP-1)

8. 考察

本研究では、肉芽腫形成における MCP-1/CCL2-CCR2 系の役割を明らかにするため、CCR2 欠損マウスにおける Zymosan A で誘発される肝肉芽腫形成過程を解析し、野生型マウスと比較した。コントロールマウスでは、肉芽腫の大きさと数は経時的に増加し 10 日目にピークを迎えた。一方、CCR2 欠損マウスでは肉芽腫の数と大きさが有意に低値で、いずれも 5 日目で小さなピークを迎えた後、徐々に退縮し、肉芽腫形成に MCP-1/CCL2-CCR2 系が深く関わるものと考えられた。

CCR2 欠損マウスの肉芽腫を電顕的に見ると、肉芽腫は小型であるとともに、細胞の密集度が低く細胞間の結合が疎であった。MCP-1/CCL2 は単球の血管内皮への接着の契機となる CD11b、CD11c および common beta chain (CD18) を誘導することが知られており[20,21]。これらのインテグリンは内皮細胞だけでなく細胞外タンパク物質との結合にも関わることから[20]、CCR2 欠損によって MCP-1/CCL2 を介したインテグリン発現が抑制されることが、疎な肉芽腫が形成される要因の一つと考えられた。

特異抗体を用いた免疫組織化学的解析から、コントロールマウスでは、F4/80 陽性マクロファージが 10 日目まで経時的に増加していることが確認された。CCR2 欠損マウスではこのような F4/80 陽性マクロファージの急速な増加は見られなかった。単球ならびに浸潤初期の単球由来マクロファージを認識する ER-MP20[11]の染色では、コントロールマウスの肉芽腫においては 10 日目まで ER-MP20 陽性細胞が劇的に増加したが、CCR2 欠損マウスの肉芽腫では 2 日目

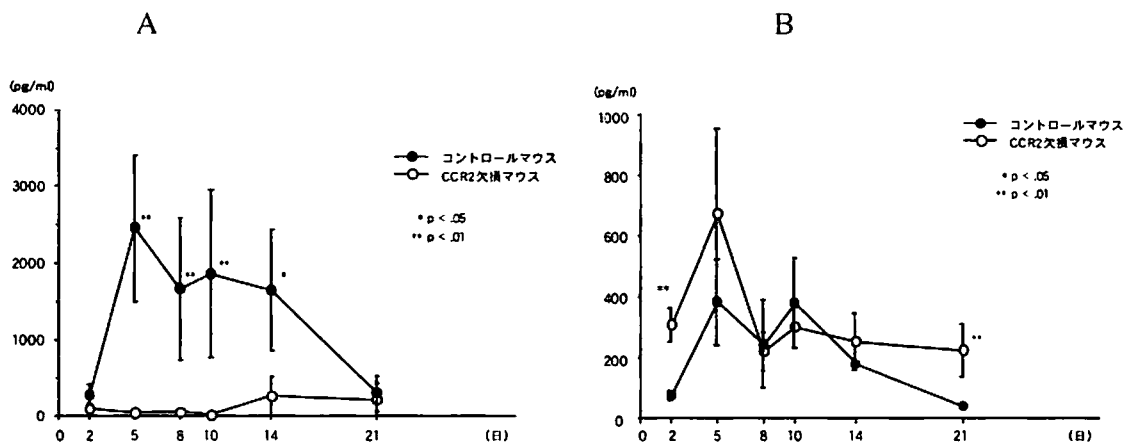


図8 血清のサイトカイン濃度 (A : IFN- γ 、B : MCP-1)

8. 考察

本研究では、肉芽腫形成における MCP-1/CCL2-CCR2 系の役割を明らかにするため、CCR2 欠損マウスにおける Zymosan A で誘発される肝肉芽腫形成過程を解析し、野生型マウスと比較した。コントロールマウスでは、肉芽腫の大きさと数は経時的に増加し 10 日目にピークを迎えた。一方、CCR2 欠損マウスでは肉芽腫の数と大きさが有意に低値で、いずれも 5 日目で小さなピークを迎えた後、徐々に退縮し、肉芽腫形成に MCP-1/CCL2-CCR2 系が深く関わるものと考えられた。

CCR2 欠損マウスの肉芽腫を電顕的に関すると、肉芽腫は小型であるとともに、細胞の密集度が低く細胞間の結合が疎であった。MCP-1/CCL2 は単球の血管内皮への接着の契機となる CD11b、CD11c および common beta chain (CD18) を誘導することが知られており[20,21]。これらのインテグリンは内皮細胞だけでなく細胞外タンパク物質との結合にも関わることから[20]、CCR2 欠損によって MCP-1/CCL2 を介したインテグリン発現が抑制されることが、疎な肉芽腫が形成される要因の一つと考えられた。

特異抗体を用いた免疫組織化学的解析から、コントロールマウスでは、F4/80 陽性マクロファージが 10 日目まで経時的に増加していることが確認された。CCR2 欠損マウスではこのような F4/80 陽性マクロファージの急速な増加は見られなかった。単球ならびに浸潤初期の単球由来マクロファージを認識する ER-MP20[11]の染色では、コントロールマウスの肉芽腫においては 10 日目まで ER-MP20 陽性細胞が劇的に増加したが、CCR2 欠損マウスの肉芽腫では 2 日目

から 10 日目にかけて ER-MP20 陽性細胞の有意な増加はなく、肉芽腫構成細胞中の割合は徐々に低下した。これらの検討から、CCR2 欠損マウスにおける肉芽腫形成過程では、血中由来の単球の急速な動員が欠如していることが、肉芽腫の低形成の主要な原因であると考えられた。肉芽腫内の T リンパ球の比率はコントロールマウスと CCR2 欠損マウス間で有意な差はみられなかった。T リンパ球は単球と同様に MCP-1/CCL2 に反応して遊走を示すが[23]、少なくともこの肉芽腫形成モデルでは、リンパ球遊走に関する MCP-1/CCL2 の関与は低いと考えられる。しかし、T リンパ球が肉芽腫形成に重要な役割を果たすことはよく知られた事実で、肉芽腫内の T 細胞がサイトカイン産生に関与していることは間違いない。CCR2 欠損マウスでは疎な肉芽腫形成がみられたが、CCR2 依存性のある種の T リンパ球サブセットが密な肉芽腫形成に関与する可能性は否定できない。

肉芽腫中の顆粒球の割合は、いずれの時点でも CCR2 欠損マウスにおいて優位であった。ある種の慢性炎症下では CCR2 が好中球へ直接作用することが報告されているが [24]、これまでの CCR2 欠損マウスを用いた急性炎症モデルにおいても[8,25]、顆粒球の集簇が観察されており、CCR2 が顆粒球の遊走へ直接作用しないことを示している。

MCP-1/CCL2 の受容体に関しては、最近 CCR2 だけでなく、CCR1 や CCR5 も MCP-1/CCL2 をリガンドとして認識することが報告されており [26]、これらの受容体以外にも、平滑筋細胞 [27]や肝星状細胞[28]に新しい MCP-1/CCL2 の受容体の存在を示唆する報告がなされている。しかし、今回の CCR2 欠損モデルの結果は、これまで動脈硬化[29,30]や慢性関節リウマチ[31,32]あるいは肺線維症[33]などの炎症病態や CCR2 欠損マウスを用いた炎症モデル[8,34-36]の解析で示されたと同様に、CCR2 が MCP-1/CCL2 を介する単球遊走の主要な受容体であることを示している。

CCR2 欠損マウスでは多核巨細胞が多く見られたことは特筆すべき点である。CCR2 欠損マウスでは、10 日目および 14 日目の退縮をはじめた肉芽腫中に多核巨細胞が観察された。このような多核巨細胞はコントロールマウスでは、殆ど観察されなかった。IFN- γ は培養下での多核巨細胞の形成を促進するといわれているが[37]、CCR2 欠損マウスでは血中の IFN- γ 値は低値で、IFN- γ の関与は小さいと考えられる。肉芽腫中の多核巨細胞は、最終分化段階の成熟したマクロファージと考えられるが[38]、CCR2 欠損マウスでは単球の遊走が抑制されてお

り、肉芽腫の構成細胞は成熟したマクロファージが主体と考えられ、多核巨細胞形成への準備状況が整っているものと想像される。IFN- γ 以外に多核巨細胞への分化を促進するサイトカンとして、IL-3、IL-4、IL-6、GM-CSF、M-CSFなどが挙げられるが[37,39]、今後、これらのサイトカインを測定することで多核巨細胞形成の機序が明らかになるものと思われる。

CCR2 欠損マウスでの肉芽腫モデルとして、これまでに肺肉芽腫形成の報告があるが[7]、経時的な肉芽腫の数や大きさの変化や構成細胞に関する詳細な解析はなされていない。住血吸虫抗原を用いた肺肉芽腫形成モデルでは、CCR2 欠損による肉芽腫形成の抑制は、4日目までの初期段階でしか観察されず、それ以降はコントロールマウスとの間に有意な差がみられていない[7]。肺は実質臓器ではなく空気により簡単に伸縮するため、肉芽腫の数や大きさの定量的解析が十分ではないことが、その理由の一つとして挙げられる。肝臓は肝細胞と類洞細胞の配列が規則的な均一な組織であり、肉芽腫の数と大きさを比較定量することが容易であるという利点を有する。また、細胞特異的な抗体を用いた免疫染色によって肉芽腫の構成細胞を識別することで、構成細胞の定量的解析が可能であった。

サイトカインの解析では、コントロールマウスでの血清 IFN- γ の著明な上昇と肝臓での IFN- γ mRNA の誘導があり、Zymosan A の静脈投与が TH1 タイプの反応を誘導するものと考えられる。一方、CCR2 欠損マウスでは、血中の IFN- γ の上昇や肝臓での IFN- γ mRNA の発現が抑制され、CCR2 シグナリングの欠如が血清 IFN- γ の上昇と肝臓での mRNA の発現を抑制したものと考えられる。Boring ら[36]は、CCR2 欠損マウスではマイコバクテリア抗原による肺肉芽腫形成が抑制されることを観察し、欠損マウスで IFN- γ の発現が抑制されることがその一因であることを報告しているが、我々のデータも彼らのデータと合致するものである。一方、このような CCR2 欠損マウスでの IFN- γ 産生の抑制が Th2 サイトカイン産生の増加に関係しているとの報告もみられる[40,41]。Peters ら[42]は CCR2 欠損マウスでの抗原提示細胞の局所への浸潤抑制が IFN- γ 産生の減少に関係している可能性と示唆している。最近の研究[43,44]では未熟樹状細胞に CCR2 の発現が観察されており、抗原提示細胞の所属リンパ節への移動に CCR2 が関与する可能性が示唆される。

本研究で、血清 MCP-1/CCL2 のレベルはコントロールマウスおよび欠損マウスのいずれにおいても、2 峰性パターンを示した (図 8)。グルカン誘発ラッ

ト肺肉芽腫モデルにおいても、肺での MCP-1/CCL2 遺伝子の発現は刺激後 1 時間後と 6-24 時間後に増強し、2 峰性を示すことが報告されている。この報告では、in situ hybridization と免疫組織化学的解析から、最初のピークは気管支や血管壁の構成細胞に由来し、2 番目のピークは、肉芽腫内に集積したマクロファージ由来の MCP-1/CCL2 が主体を占めるものと考察している[45]。肝臓での MCP-1/CCL2 産生に関しては、肝の構成細胞である胆管上皮[46,47]や星細胞[47,48]ならびに肝細胞[49]などから産生されることが報告されている。本研究では MCP-1/CCL2 産生細胞を特定することはできなかったが、このモデルでの最初のピークは、このような肝の構成細胞による MCP-1/CCL2 産生が反映されたものと考えられる。一方、2 番目のピークは、肉芽腫を構成するマクロファージをはじめとする免疫担当細胞[30,45]に由来すると想像される。血中の MCP-1/CCL2 レベルを両群で比較すると、2 日目と 21 日目で CCR2 欠損マウスにおいて、著明な高値を示した。CCR2 欠損マウスでの MCP-1/CCL2 レベルの上昇に関しては、肝障害[50]や肺肉芽腫モデル[7]で報告されている。また、cryptococcus neoformans の感染モデルでの気管支肺胞洗浄液においても、CCR2 欠損マウスで MCP-1/CCL2 の有意な上昇が報告されている [40]。この現象の明確な機構は十分に明らかではないが、血中からの MCP-1/CCL2 のクリアランスに CCR2 が関与する可能性が示唆されている[50]。更に MCP-1/CCL2 産生に関し、MCP-1/CCL2-CCR2 系のシグナルがネガティブフィードバックの役割を担っている可能性[40]も考えられる。

近年、免疫担当細胞以外の非血液細胞が、MCP-1/CCL2 によって刺激されるという報告が増加している。Weber ら[51]と Ponce ら[52]は内皮細胞によって CCR2 が発現され、血管形成過程に MCP-1/CCL2-CCR2 系が直接的に関与する可能性を報告している。血管新生は炎症病態を左右する重要な要因の一つであることから、CCR2 欠損マウスでは CCR2 の欠如に伴う血管形成の障害が肉芽腫形成に影響を与えた可能性も考慮される。CCR2 以外の MCP-1/CCL2 受容体として、Schechter ら[28]は、CCR2 の発現のない平滑筋細胞において、MCP-1/CCL2 の刺激で組織因子の発現が誘導されることを報告し、CCR2 と異なる新しい CCL2 受容体の存在を示唆した。肝臓では、星細胞に CCR2 とは異なる新規の CCL2 受容体の発現が想定されている[28]。このような観点から、本研究においても MCP-1/CCL2 産生細胞と CCR2 発現細胞の局在に関して、詳細な解析が必要と考えられる。さらに、同じ実験プロトコルを用いて CCR2 欠損マウスと

CCL2 欠損マウスの病態を比較することによって、CCR2 および CCR2 以外の受容体の関係がより明らかになるものと期待される。

9. 結語

本研究では、CCR2 の欠損によって肉芽腫形成が抑制される過程を明らかにできた。CCR2 の欠損は、単球・マクロファージをはじめとする CCR2 発現免疫担当細胞の遊走を直接的に阻止するとともに、これらの細胞からの CCR2 を介するサイトカイン産生抑制を通して間接的に肉芽腫形成に影響を与えたものと考えられた。今後、MCP-1/CCL2 産生細胞と CCR2 発現細胞同定や、CCR2 以外の MCP-1/CCL2 受容体の解析を通して、MCP-1/CCL2 と肉芽腫形成の関連が明らかになるものと期待される。

10. 参考文献

1. Takahashi K, Takeya M, Miyakawa K, Hagiwara S-I, Wynn AA, Naito M, Yamada M. The multiple roles of macrophages in hepatic granuloma formation in mice. In *Liver Diseases and hepatic Sinusoidal Cells*. Tanikawa K, Ueno T (eds). Springer-Verlag: Tokyo. 1999; 128-140.
2. Yoshie O, Imai T, Nomiyama H. Chemokines in immunity. *Adv Immunol* 2001;78:57-110.
3. Yoshimura T, Yuhki N, Moore SK, Appella E, Lerman MI, Leonard EJ. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. *FEBS Lett* 1989 Feb 27;244(2):487-493.
4. Hashimoto S, Nakayama T, Gon Y, Hata N, Koura T, Maruoka S, Matsumoto K, Hayashi S, Abe Y, Horie T. Correlation of plasma monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and monocyte inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) levels with disease activity and clinical course of sarcoidosis. *Clin Exp Immunol* 1998; 111: 604-610.
5. Ichiyasu H, Suga M, Matsukawa A, Iyonaga K, Mizobe T, Takahashi T, Ando M. Functional roles of MCP-1 in propionibacterium acnes-induced, T cell-mediated

CCL2 欠損マウスの病態を比較することによって、CCR2 および CCR2 以外の受容体の関係がより明らかになるものと期待される。

9. 結語

本研究では、CCR2 の欠損によって肉芽腫形成が抑制される過程を明らかにできた。CCR2 の欠損は、単球・マクロファージをはじめとする CCR2 発現免疫担当細胞の遊走を直接的に阻止するとともに、これらの細胞からの CCR2 を介するサイトカイン産生抑制を通して間接的に肉芽腫形成に影響を与えたものと考えられた。今後、MCP-1/CCL2 産生細胞と CCR2 発現細胞同定や、CCR2 以外の MCP-1/CCL2 受容体の解析を通して、MCP-1/CCL2 と肉芽腫形成の関連が明らかになるものと期待される。

10. 参考文献

1. Takahashi K, Takeya M, Miyakawa K, Hagiwara S-I, Wynn AA, Naito M, Yamada M. The multiple roles of macrophages in hepatic granuloma formation in mice. In *Liver Diseases and hepatic Sinusoidal Cells*. Tanikawa K, Ueno T (eds), Springer-Verlag: Tokyo. 1999: 128-140.
2. Yoshie O, Imai T, Nomiyama H. Chemokines in immunity. *Adv Immunol* 2001;78:57-110.
3. Yoshimura T, Yuhki N, Moore SK, Appella E, Lerman MI, Leonard EJ. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. *FEBS Lett* 1989 Feb 27;244(2):487-493.
4. Hashimoto S, Nakayama T, Gon Y, Hata N, Koura T, Maruoka S, Matsumoto K, Hayashi S, Abe Y, Horie T. Correlation of plasma monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and monocyte inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) levels with disease activity and clinical course of sarcoidosis. *Clin Exp Immunol* 1998; 111: 604-610.
5. Ichiyasu H, Suga M, Matsukawa A, Iyonaga K, Mizobe T, Takahashi T, Ando M. Functional roles of MCP-1 in propionibacterium acnes-induced, T cell-mediated

- pulmonary granulomatosis in rabbits. *J Leuk. Biol* 1999; 65: 482-491.
6. Charo IF, Myers SJ, Herman A, Franci C, Connolly AJ, Coughlin SR. Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2752-2756.
 7. Warmington KS, Boring L, Ruth JH, Sostein J, Hogaboam CM, Curtis JL, Kunkel SL, Charo IR, Chensue SW. Effect of C-C chemokine receptor 2 (CCR2) knockout on type-2 (schistosomal antigen-elicited) pulmonary granuloma formation: analysis of cellular recruitment and cytokine responses. *Am J Pathol* 1999; 154: 1407-1416.
 8. Kuziel WA, Morgan SJ, Dawson TC, Griffin S, Smithies O, Ley K, Maeda N. Severe reduction in leucocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 12053-12058.
 9. Isobe Y, Nakane PK, Brown WR. Studies on translocation of immunoglobulins across intestinal epithelium. I. Improvements in the peroxidase-labeled antibody method for application to study of human intestinal mucosa. *Acta. Histochem. Cytochem.* 1977; 10: 161-171.
 10. Hume DA, Gordon S. The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Identification of resident macrophages in renal medullary and cortical interstitium and juxtaglomerular complex. *J Exp Med* 1983; 157: 1704-1709.
 11. Leenen PJM, Melis M, Slieker WAT, van Ewijk W. Murine macrophage precursor characterization II. Monoclonal antibodies against macrophage precursor antigens. *Eur J Immunol* 1990; 20: 27-34.
 12. Dubois CM, Neta R, Keller JR, Jacobsen SE, Oppenheim JJ, Ruscetti F. Hematopoietic growth factors and glucocorticoids synergize to mimic the effects of IL-1 on granulocyte differentiation and IL-1 receptor induction on bone marrow cells in vivo. *Exp Hematol* 1993; 21: 303-310.
 13. Seaman WE, Wofsy D, Greenspan JS., Ledbetter JA. Treatment of autoimmune MRL/lpr mice with monoclonal antibody to Thy-1.2: a single injection has sustained effects on lymphoproliferation and renal disease. *J Immunol* 1983; 130: 1713-1718.
 14. Kraal G, Breel M, Janse M, Bruin G. Langerhans' cells, veiled cells, and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. *J Exp Med* 1986; 163: 981-987.

15. Breel M, Mebius RE, Kraal G. Dendritic cells of the mouse recognized by two monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 1987; 17: 1555-1559.
16. Vliet V, Melis E, Ewik VW. Monoclonal antibodies to stromal cell types of the mouse thymus. *Eur J Immunol* 1984; 14: 524-529.
17. Asensi V, Kimeno K, Kawamura I, Sakumoto M, Nomoto K. Treatment of autoimmune MRL/lpr mice with anti-B220 monoclonal antibody reduces the level of anti-DNA antibodies and lymphadenopathies. *Immunology* 1989; 68: 204-208.
18. Larsen CP, Ritchie ST, Hendrix R, Linsley PS, Hathcock KS, Hodes RJ, Lowry RP, Pearson TC. Regulation of immunostimulatory function and costimulatory molecule (B7-1 and B7-2) expression on murine dendritic cells. *J Immunol* 1994; 152: 5208-5219.
19. Hagiwara SI, Takeya M, Suzuki H, van der Laan LJ, Kraal G, Kitamura N, Takahashi K. Role of macrophage scavenger receptors in hepatic granuloma formation in mice. *Am J Pathol* 1999; 154: 705-720.
20. Jiang Y, Beller DI, Frendl G, Graves DT. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol* 1992; 148:2423-2428.
21. Vaddi K, Newton RC. Regulation of monocyte integrin expression by beta-family chemokines. *J Immunol* 1994; 153: 4721-4732.
22. Bökel C, Brown NH. Integrins in development: Moving on, responding to, and sticking to the extracellular matrix. *Developmental Cell* 2002; 3:311-321.
23. Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, Springer TA. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 91: 3652-3656.
24. Johnston B, Burns AR, Suematsu M, Issekutz TB, Woodman RC, Kubes P. Chronic inflammation upregulates chemokine receptors and induces neutrophil migration to monocyte chemoattractant protein-1. *J Clin Invest*. 1999. 103:1269-1276
25. Blease K, Mehrad B, Standiford TJ, Lukacs NW, Gosling J, Boring L, Charo IF, Kunkel SL, Hogaboam CM. Enhanced pulmonary allergic responses to *Aspergillus* in CCR2^{-/-} mice. *J Immunol* 2000. 165: 2603-2611.
26. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 2000; 152: 145-176.

27. Schechter AD, Rollins BJ, Zhang YJ, Charo IF, Fallon JT, Rossikhina M, Giesen PLA, Nemerson Ym, Taubman MB. Tissue factor is induced by monocyte chemoattractant protein-1 in human aortic smooth muscle and THP-1 cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 28568-28573.
28. Marra F, Romanelli RG, Giannini C, Failli P, Pastacaldi S, Arrighi MC, Pinzani M, Laffi G, Montalto P, Gentilini P. Monocyte chemotactic protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999; 29: 140-148.
29. Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Sarkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, Witztum JL, Steinberg D. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in macrophage-rich area of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5252-5256.
30. Takeya M, Yoshimura T, Leonard EJ, Takahashi K. Detection of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerotic lesions by an anti-monocyte chemoattractant protein-1 monoclonal antibody. *Hum Pathol* 1993; 24: 534-539.
31. Koch AE, Kunkel SL, Harlow LA, Johnson B, Evanoff HL, Haines GK, Burdick MD, Pope RM, Strieter RM. Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*; 1992; 90:772-779.
32. Ogata H, Takeya M, Yoshimura T, Takagi K, Takahashi K. The role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the pathogenesis of collagen-induced arthritis in rats. *J Pathol* 1997; 182: 106-114.
33. Iyonaga K, Takeya M, Saita N, Sakamoto O, Yoshimura T, Ando M, Takahashi K. Monocyte chemoattractant protein-1 in idiopathic pulmonary fibrosis and other interstitial lung diseases. *Hum Pathol* 1994; 25: 455-463.
34. Lu B, Rutledge BJ, Gu L, Fiorillo J, Lukacs NW, Kunkel SL, North R, Gerard C, Rollins BJ. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med* 1998; 187: 601-608.
35. Kurihara T, Warr G, Loy J, Bravo R. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J Exp Med* 1997; 186: 1757-1762.
36. Boring L, Gosling J, Chensue SW, Kunkel SL, Farese RVJr, Broxmeyer HE, Charo IF. Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J Clin Invest* 1997; 100: 2552-2561.
37. Enelow RI, Sullivan GW, Carper HT, Mandell GL. Induction of multinucleated

giant cell formation from in vitro culture of human monocytes with interleukin-3 and interferon-gamma: comparison with other stimulating factors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 6: 57-62.

38. Kreipe H, Radzun HJ, Rudolph P, Barth J, Hansmann ML, Heidorn K, Parwaresch MR. Multinucleated giant cells generated in vitro. Terminally differentiated macrophages with down-regulated c-fms expression. *Am J Pathol*. 1988; 130: 232-243.

39. McNally AK, Anderson JM. Interleukin-4 induces foreign body giant cells from human monocytes/macrophages. Differential lymphokine regulation of macrophage fusion leads to morphological variants of multinucleated giant cells. *Am J Pathol* 1995; 147: 1487-1499.

40. Traynor TR, Kuziel WA, Toews GB, Huffnagle GB. CCR2 expression determines T1 versus T2 polarization during pulmonary cryptococcus neoformans infection. *J Immunol* 2000; 164: 2021-2027.

41. Sato N, Ahuja SK, Quinones M, Kosteki V, Reddick RL, Melby PC, Kuziel WK, Ahuja SS. CC chemokine receptor (CCR)2 is required for Langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cells. *J Exp Med* 2000; 192: 205-218.

42. Peters W, Dupuis M, Charo IF. A mechanism for the impaired IFN-g production in C-C chemokine receptor 2 (CCR2) knockout mice: role of CCR2 in linking the innate and adaptive immune responses. *J Immunol* 2000; 165:7072-7077.

43. Vecchi A, Massimiliano L, Ramponi S, Luini W, Bernasconi S, Bonecchi R, Allavena P, Parmentier M, Mantovani A, Sozzani S. Differential responsiveness to constitutive vs. inducible chemokines of immature and mature mouse dendritic cells. *J Leukocyte Biol* 1999; 66:489-494.

44. Vanbervliet B, Homey B, Durand I, Massacrier C, Ait-Yahia Sm de Bouteiller O, Vicari Am Caux C. Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cells recruitment: possible role at inflamed epithelioid surfaces. *Eur J Immunol* 2002; 32:231-242.

45. Flory CM, Jones ML, Warren JS. Pulmonary granuloma formation in the rat is partially dependent on monocyte chemoattractant protein-1. *Lab Invest* 1993; 69: 396-404.

46. Tsuneyama K, Harada K, Yasoshima M, Hiramatsu K, Mackay CR, Mackay IR, Gershwin ME, Nakanuma Y. Monocyte chemoattractant protein-1, -2, -3 are distinctively expressed in portal tracts and granuloma in primary biliary cirrhosis: implications for

pathogenesis. *J Pathol* 2001; 193:102-109.

47. Mara F, DeFranco R, Grappone C, Milani S, Pastacaldi S, Pinzani M, Romanelli RG, Laffi G, Gentilini P. Increased expression of monocyte chemotactic protein-1 during active hepatic fibrogenesis: correlation with monocyte infiltration. *Am J Pathol* 1999; 152:423-430.

48. Sprenger H, Kaufmann A, Garn H, Lahme B, Gemsa D, Gressner AM. Differential expression of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) in transforming rat hepatic stellate cells. *J Hepathol* 1999; 30:88-94.

49. Dong W, Simeonova PP, Gallucci R, Matheson J, Fannin R, Montuschi P, Flood L, Luster MI. Cytokine expression in hepatocytes: role of oxidant stress. *J Interferon Cytokine Res* 1998; 18:629-638.

50. Dambach D, Watson LM, Gray KR, Durham SK, Laskin DL. Role of CCR2 in macrophage migration into the liver during acetaminophen-induced hepatotoxicity in the mouse. *Hepatology* 2002; 35:1093-1103.

51. Weber KSC, Nelson PJ, Gröne H-J, Weber C. Expression of CCR2 endothelial cells implications for MCP-1 mediated wound injury repair and in vivo inflammatory activation of endothelium. *Arterioscler Thomb Vasc Biol* 1999; 19:2085-2093.

52. Ponce RSL, Young HA, Wasseman YK, Ward JM, Kleiman HH, Oppenheim JJ, Murphy MJ. Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* 2002; 96: 34-40.

肝肉芽腫形成におけるCCケモカイン受容体2の役割

陣内克紀

2004年度