

好酸球における活性化抗原 CD 69 の発現

奈良県立医科大学第2内科学教室

森井武志

EXPRESSION OF ACTIVATION ANTIGEN CD69 ON EOSINOPHILS

TAKESHI MORII

The Second Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Received May 30, 1995

Abstract: The activation antigen, CD69, has been shown to be expressed on activated lymphocytes. CD69 has also been shown to be associated with the signal transduction process. In this study, the author performed flowcytometric analysis of CD69 expression on eosinophils obtained from the bronchoalveolar lavage fluid (BALF), pleural effusion, or peripheral blood (PB) of various patients. Whatever the diseases were, lung eosinophils obtained from BALF or pleural effusion expressed significant levels of CD69, whereas most PB eosinophils did not express CD69. Further, CD69 expression was induced on PB eosinophils by the activation of interleukin-3 (IL-3), IL-5, granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), interferon- α (IFN- α) and phorbol myristate acetate (PMA), but platelet activating factor (PAF) did not induce CD69 expression. CD69 expression induced by IL-3 or GM-CSF was in a dose and time dependent manner. The expression could be induced significantly at low concentration of 10 pg/ml and was detected after stimulation for two hours. These findings suggest that CD69 expressions are restricted to local eosinophils, and that local eosinophils may stand at a different activating state from PB eosinophils.

Index Terms

bronchoalveolar lavage fluid, CD69, eosinophils, pleural effusion

緒 言

従来から好酸球はアレルギー性炎症疾患で局所組織に集積することが知られている。近年、好酸球の特異顆粒中に含まれる major basic protein(MBP), eosinophil cationic protein(ECP), eosinophil-derived neurotoxin(EDN), eosinophil peroxidase(EPO)の組織障害作用が明らかとなり¹⁾, 好酸球はアレルギー反応による組織障害では最も重要な細胞と考えられるようになってきている²⁾³⁾。従って、アレルギー性炎症疾患のコントロールには好酸球がどのように組織破壊を起こすのかを知る必要があるが、局所での好酸球活性化の機序は未だ明らかではない。

一般に好酸球の活性化の指標として好酸球の低比重化が知られており、それに伴う形態的・機能的変化も報告されている⁴⁾⁷⁾。しかし、低比重好酸球は局所に浸潤する以前の末梢血中にも存在しており⁸⁾, 特異顆粒や活性物質の放出が行われる生体局所では、好酸球は、低比重化でみられる活性化とは異なる活性化状態にあることが想定される。

今回著者は、リンパ球の初期活性化抗原として知られている CD69 抗原⁹⁾の発現について末梢血中および局所浸潤白血球成分を検討中に、末梢血中の好酸球では低比重好酸球・正比重好酸球にかかわらずほとんど発現していないが、局所に浸潤した好酸球では例外なく発現していることをみいだした。CD69 抗原は、従来よりシグナル

伝達に関与する機能分子であることがリンパ球や血小板で明らかにされており¹⁰⁻¹³⁾, 好酸球でも同様に機能分子として機能するならば, 好酸球の局所での活性化過程に何らかの機能を果たしている可能性があり, 局所好酸球活性化の機序を考えるうえで非常に興味深い分子であると考えられる. そこで本研究で著者は活性化抗原 CD69の好酸球での発現をフローサイトメトリー法を用いて詳細に検討し, 新しい知見をみいだしたので報告する.

対象および方法

1) 対象

対象は気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid: BALF)中あるいは胸水中に好酸球を認めた各種疾患患者で, それぞれ BALF あるいは胸水採取と同時に末梢血をヘパリンナトリウム(ミドリ十字, 大阪)加採血し検体とした. 好酸球増多性疾患では好酸球性肺炎(EP) 7例から BALF を, hypereosinophilic syndrome

(HES) 2例から BALF と胸水とを採取した. 好酸球増多性疾患以外の疾患では 7例(肺癌: 1例, シェーグレン症候群: 1例, 強皮症: 1例, 特発性間質性肺炎: 3例, サルコイドーシス: 1例)から BALF を, 6例(自然気胸: 3例, 肺癌: 1例, 細菌性肺炎: 1例, 麻疹肺炎: 1例)から胸水を採取した(Table 1).

BALF は型のごとく気管支鏡オリンパス 2 T-10(オリンパス, 東京)を肺陰影の最も強い場所の亜区域支にウェッジし, 滅菌生理食塩水 50 ml の注入と回収とを 3回, 計 150 ml 行った. 得られた BALF を二層ガーゼで濾過, 粘液を除去後, 遠沈し(250 G, 4°C, 10 分間), 沈渣を 0.1% sodium azide, 2% FCS 含有燐酸緩衝生理食塩水 (calcium magnesium free phosphate buffered saline, PBS(-))中に浮遊させた. 胸水も同様に濾過後, 細胞浮遊液を作製した. この一部で塗抹標本を作製し May-Grünwald-Giemsa 染色を行い細胞分画を算定した. ヘパリン加末梢血 10 ml には 3% デキストラン含有 PBS

Table 1. Characteristics of the patients

Case	Disease	Sex	Age (yr)	PB		BALF	PE
				WBC (/ μ l)	Eos (%)	Eos (%)	Eos (%)
1	EP	M	62	11,600	14	69	ND
2	EP	F	39	5,700	32	11	ND
3	EP	M	22	16,200	47	57	ND
4	EP	F	36	8,600	36	20	ND
5	EP	M	74	9,500	29	37	ND
6	EP	M	54	7,300	14	42	ND
7	EP	F	42	11,600	23	87	ND
8	HES	M	58	8,500	29	12	15
9	HES	F	46	18,600	47	34	12
10	LC	M	65	6,100	5	10	ND
11	SjS	F	70	5,900	8	6	ND
12	PSS	F	60	5,800	1	1	ND
13	IIP	M	54	4,800	2	6	ND
14	IIP	M	52	4,400	1	2	ND
15	IIP	M	67	9,900	7	3	ND
16	SAR	M	20	5,600	4	1	ND
17	SP	F	32	8,300	4	ND	38
18	SP	M	73	6,200	3	ND	20
19	SP	F	43	12,100	6	ND	65
20	LC	M	43	29,100	7	ND	5
21	BP	M	48	21,000	2	ND	6
22	MP	F	26	10,100	2	ND	14

Abbreviation: PB; Peripheral blood, BALF; bronchoalveolar lavage fluid, PE; pleural effusion, EP; eosinophilic pneumonia, HES; hypereosinophilic syndrome, LC; lung cancer, SjS; Sjögren's syndrome, PSS; progressive systemic sclerosis, IIP; idiopathic interstitial pneumonia, SAR; sarcoidosis, SP; spontaneous pneumothorax, BP; bacillogenic pneumonia, MP; measles pneumonia, ND; not determined.

(一)3 ml を加え混和後 30 分間静置, 上清の白血球浮遊液を採取し, 遠沈後同様に細胞浮遊液を作製した. これらの細胞浮遊液は赤血球溶解液(0.83% NH_4Cl , 0.1% KHCO_3 , 0.37% EDTA-2 Na , PH 7.4)を用いて混入する赤血球を溶血後検体とした.

各症例の検体中の好酸球比率は好酸球増多性疾患では末梢血中 14~47%, BALF 中 11~87%, 胸水中 12~15% といずれも比較的高値であった. 一方好酸球増多性疾患以外の疾患では, 末梢血中で 1~8% と低値であり, BALF 中でも 1~10% と低値であった. 胸水中では気胸に伴った胸水症例で 20~65% と高値であったが, 他の 3 例は 5%, 6%, 14% であった(Table 1).

一部の症例で末梢血好酸球を Percoll 比重遠心法を用いて正比重好酸球と低比重好酸球とに分離し検体とした¹⁴⁾. すなわち Percoll 原液を Hanks'液で希釈して比重 1.082 g/ml に調整の上, 白血球浮遊液を重層し, 比重遠心法で下層の好酸球を正比重好酸球, 上層の好酸球を低比重好酸球とした. また in vitro 刺激試験には健常人の末梢血好酸球を用いた.

2) 試料および機器

使用した試料は cycloheximide, propidium iodide (PI)(Sigma Chemical, St. Louis, MO); recombinant human interleukin-2(rhIL-2)(塩野義製薬, 大阪); recombinant human granulocyte colony stimulating factor(rhG-CSF)(中外製薬, 東京); rhIL-3, rhIL-5, rhIL-6, recombinant human granulocyte macrophage colony stimulating factor(rhGM-CSF)(Genzyme, Boston, MA); recombinant human interferon α -2a (rhIFN- α)(武田製薬, 大阪); RPMI-1640(Gibco BRL, Grand Island, NY); Lymphoprep(Nycomed, Norway); dextran T 500, Percoll(Pharmacia, Sweden); fetal calf serum(FCS), phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA), platelet activating factor(PAF), sodium azide(和光純薬, 大阪); fluorescein isothiocyanate (FITC)標識 Leu-23 モノクローナル抗体, FITC 標識コントロール抗体, phycoerythrin(PE)標識 Leu-11 c モノクローナル抗体(Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA)を用いた. フローサイトメトリの測定と解析とは FACScan, CONSORT 30 software(Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA)を使用した.

3) 免疫染色およびフローサイトメトリー法

検体はまずマウス血清で非特異的抗原抗体反応をブロックした後, PE 標識 Leu-11 抗体(CD16)と FITC 標識 Leu-23 抗体(CD69)あるいは FITC 標識コントロ

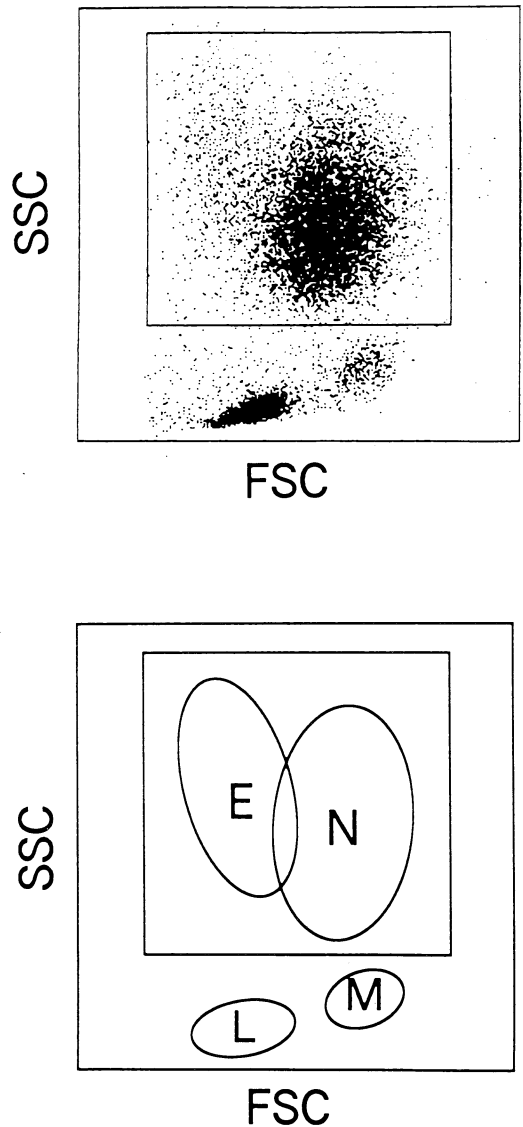


Fig. 1. The method for flow cytometric analysis. Panels show bivariate distribution of the forward and side scatter intensities of peripheral blood leukocytes. Different cell clusters were identified on the display. The live gate (rectangle) was set to the granulocyte cluster comprising of eosinophils and neutrophils. The fluorescence intensities of only live gated cells were measured. The lower panel is an illustration of the upper panel. FSC; forward scatter. SSC; side scatter. E; eosinophils. N; neutrophils. L; lymphocytes. M; monocytes.

ール抗体で二重染色を行い(4℃, 30分間反応)FACScanで測定した。フローサイトメトリー法では前方散乱光と側方散乱光の2パラメーター表示により各白血球をそれぞれ細胞集団として識別することができ、測定時に2パラメーター表示を用いて顆粒球集団のみに live gate を設定し蛍光強度を測定した(Fig. 1)。この集団中には好酸球と好中球とが含まれるが、解析時にはCD16 抗原陰性の好酸球集団のみを解析対象とした(Fig. 2)。すなわち、好酸球集団の control IgG FITC(Fig. 2-A)とCD69 FITC(Fig. 2-B)との蛍光強度をヒストグラムで比較し(Fig. 2-C)、CD69 抗原発現の陽性率とした。また細胞表面に発現する抗原量の指標として、CD69 FITC と control IgG FITC の平均蛍光強度の差から Δ mean fluorescence intensity (Δ MFI) を算出した。

4) in vitro 刺激

末梢血から Percoll 比重遠心法で分離した好酸球を培養液(10% FCS 加 RPMI-1640)中に浮遊し、 1.0×10^6 個/ml, 37℃, 5% CO₂ の条件下で培養した。培養液には単独あるいはPMA, PAF, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, G-CSF, GM-CSF, IFN- α を加えて、培養刺激によるCD69 抗原の発現を検討した。またGM-CSF のCD69 抗原発現誘導作用におよぼす蛋白合成阻害薬 cycloheximide の影響も検討した。細胞浮遊培養液は培養刺激後即座に4℃の0.1% sodium azide, 2% FCS 含有 PBS (-) と混和して反応を止め、洗浄後免疫染色を行った。さらにPI染色を行い、フローサイトメトリー測定時にPI陽性の死細胞を除外して生細胞のみのCD69 抗原の発現を測定した。

結 果

1) 末梢血好酸球および局所好酸球におけるCD69 抗原の発現

まず、健常人の末梢血好酸球のCD69 抗原はまったく発現していなかった(Fig. 3)。

そこで各種疾患の末梢血好酸球と局所好酸球とのCD69 抗原の発現を検討した。局所好酸球としてBALF中好酸球と胸水中好酸球とを検討した。まず好酸球増多性疾患であるEP症例で検討したところ、健常人と同様に末梢血好酸球にはCD69 抗原が全く発現していなかった(Fig. 4-A)。ところが局所好酸球であるBALF好酸球の検討ではEPの全例にCD69 抗原が明らかに発現しており、好酸球にも活性化抗原であるCD69 抗原が発現することが明らかになった(Fig. 4-B)。そこで末梢血好酸球をさらに正比重好酸球と低比重好酸球とに分離し、それぞれのCD69 抗原の発現を検討したが、正比重好酸

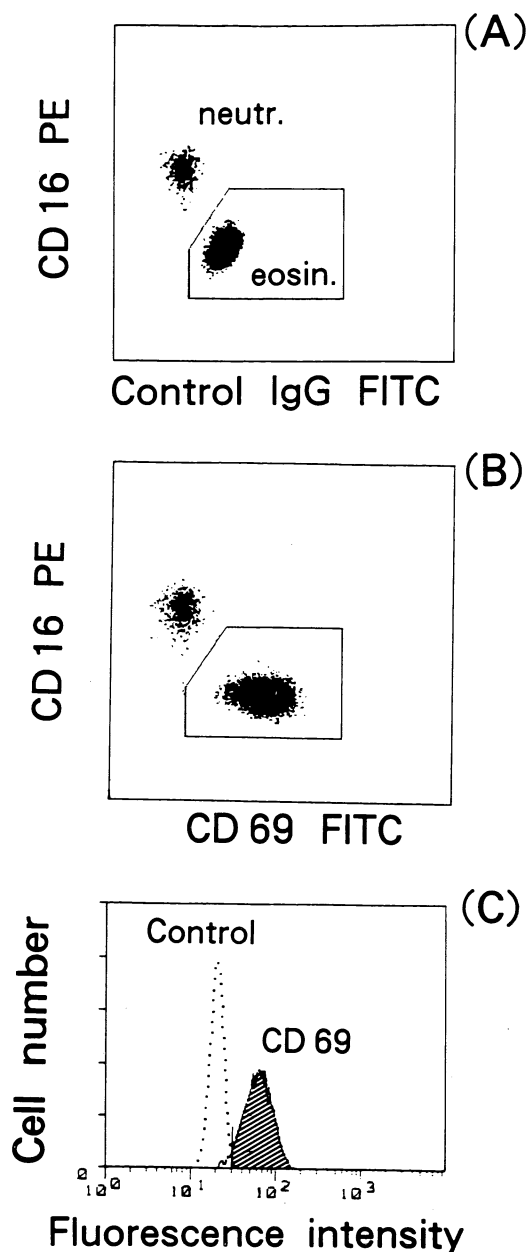


Fig. 2. The method for flow cytometric analysis. Panels (A) and (B) show fluorescence bivariate distribution of granulocytes. The analyse gate was set on CD16 negative cell cluster. Then the histogram of gated cells' fluorescence intensity was obtained by the gated flow cytometric analysis. (C) CD69 positive cell rate was calculated from the histogram of control FITC and that of CD69 FITC.

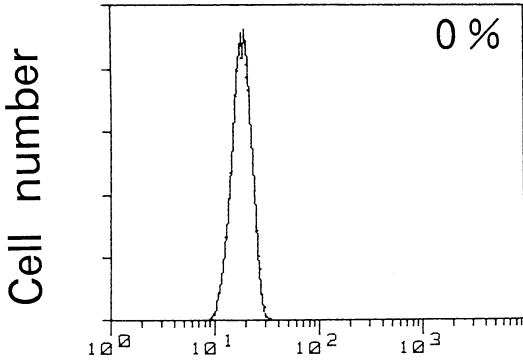


Fig. 3. Representative histogram for CD69 expression (solid line) of peripheral blood eosinophils in a normal healthy individual. The fluorescence intensity of control antibody is also shown (dotted line). The solid line and the dotted line show the just same histogram.

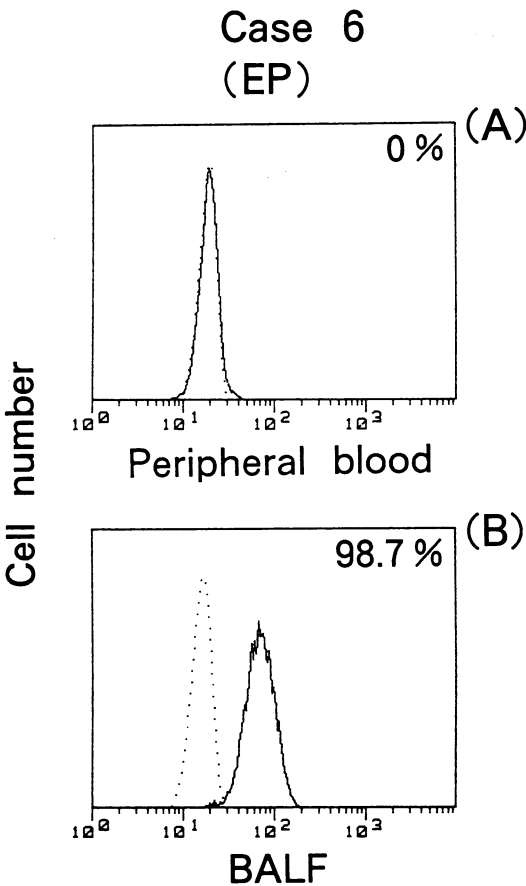


Fig. 4. Representative histograms for CD69 expression (solid line) of peripheral blood (A) or BALF (B) eosinophils in the patient with EP (Case 6). The control histograms are also shown (dotted line).

球ばかりか低比重好酸球でも CD69 抗原の発現は全く認めなかった(Fig. 5). また, 好酸球増多性疾患である HES 症例でも検討したが, 局所好酸球の BALF 中好酸球や胸水中好酸球で CD69 抗原の明らかな発現が EP におけるのと同様に見られた(Fig. 6-A, B). ただ, HES では末梢血好酸球にも CD69 抗原のわずかな発現がみられた(Fig. 6-C). これら好酸球増多性疾患における好酸球上の CD69 抗原発現の結果を示した(Fig. 7).

次に, 局所に好酸球浸潤の著明でない疾患や病態为好酸球増多とは無関係と考えられる疾患で検討をおこなった. 検討したすべての症例で末梢血好酸球に CD69 抗原の発現は全くみられなかったが, 好酸球増多性疾患と同様に BALF 中と胸水中との局所好酸球には明らかな

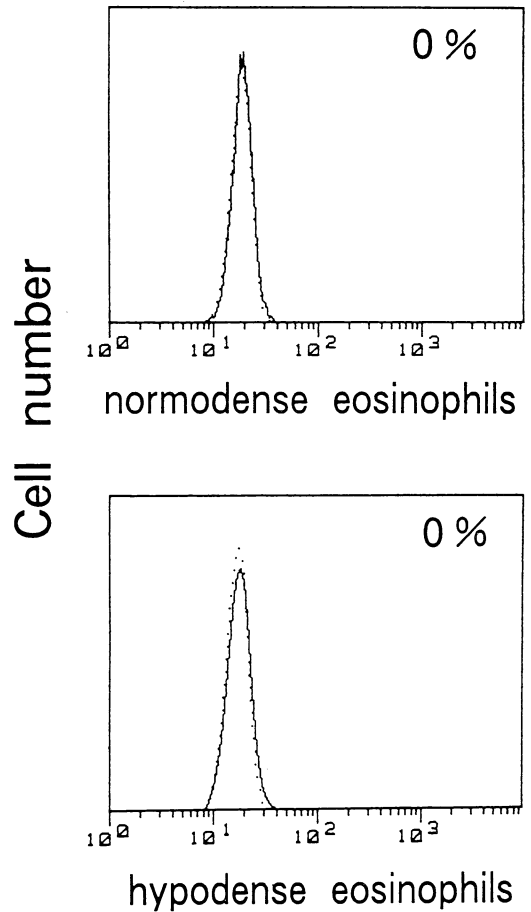


Fig. 5. Representative histograms for CD69 expression (solid line) of normodense or hypodense eosinophils in the patient with EP (Case 6). The control histograms are also shown (dotted line).

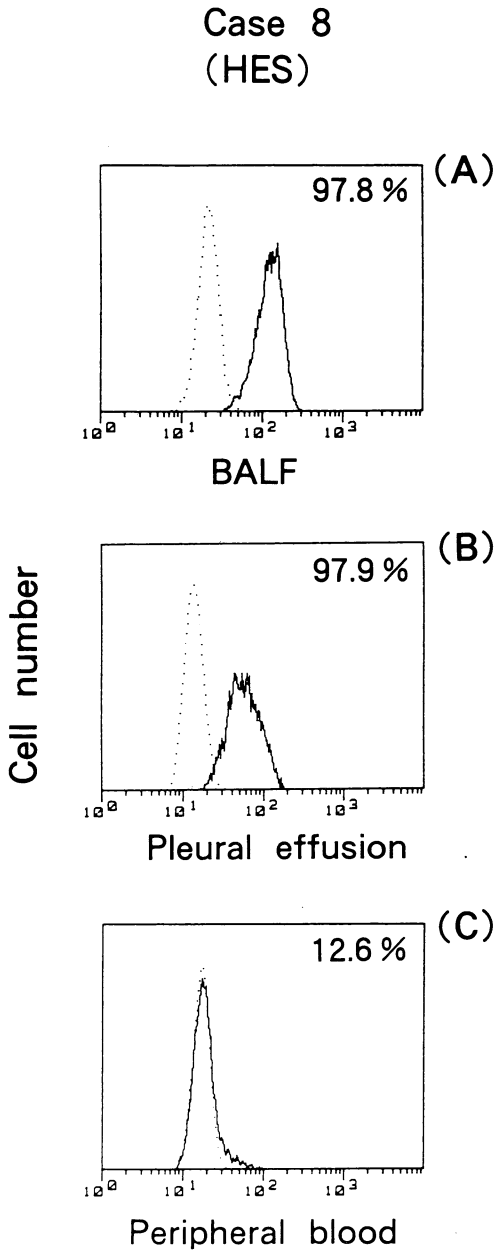


Fig. 6. Representative histograms for CD69 expression (solid line) of BALF (A), pleural (B) or peripheral blood (C) eosinophils, in the patient with HES (Case 8). The control histograms are also shown (dotted line).

CD69 抗原の発現がみられた(Fig. 8, 9, 10).

2) in vitro 好酸球刺激による CD69 の発現

局所好酸球に発現する CD69 抗原がリンパ球と同様に好酸球の活性化により発現しうるかどうかを検討するた

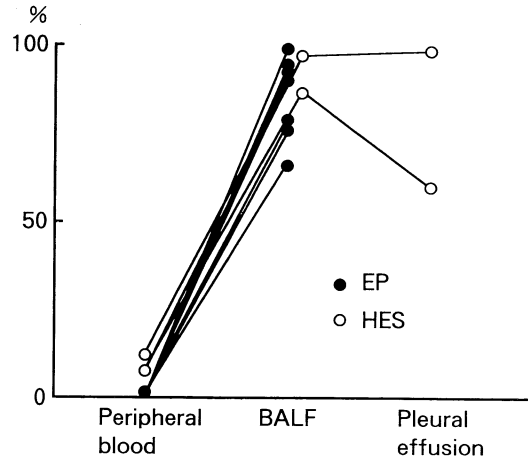


Fig. 7. CD69 positive cell rate of peripheral blood, BALF or pleural eosinophils in eosinophilic patients.

EP; eosinophilic pneumonia, HES; hyper-eosinophilic syndrome.

めに, CD69 抗原を発現していない健康人の末梢血好酸球を用いて in vitro 刺激実験を行った. 結果は PMA および IL-3, IL-5, GM-CSF, IFN- α による刺激で発現が誘導されたが, PAF, IL-2, IL-6 および G-CSF による刺激では発現は誘導されなかった(Fig. 11). この発現誘導は濃度依存的に作用し, IL-3, GM-CSF による刺激では 10 pg/ml の低濃度でも明らかな発現が誘導された(Fig. 12). 発現誘導の kinetics では刺激 2 時間後の早期に発現がみられ, 約 10 時間でほぼ plateau に達した(Fig. 13). 蛋白合成阻害薬 cycloheximide の併用により GM-CSF による発現誘導作用は一部抑制された(Fig. 14). また患者胸水上清(10 倍希釈)による刺激でも患者末梢血好酸球に CD69 の発現が誘導された.

考 察

CD69 抗原はリンパ球活性化抗原として知られており, 活性化 T 細胞¹⁵⁾⁻¹⁸⁾, 活性化 B 細胞¹⁵⁾¹⁶⁾, 活性化 natural killer(NK)細胞¹⁷⁾や CD3^{bright} 胸腺細胞¹⁹⁾での発現が報告されている. リンパ球の in vitro 刺激実験で刺激 1 時間後の早期に de novo の発現がみられることからリンパ球初期活性化抗原とも呼ばれ, その発現には新たな RNA 合成・蛋白合成が必要とされている¹⁶⁾. T・B 細胞では抗原・マイトージェン・phorbol myristate acetate (PMA)刺激による発現が, NK 細胞では IL-2・IFN- α 刺激による発現が報告されている¹⁵⁾⁻¹⁸⁾. CD69 抗原は共通の core protein を有するが, 異なる糖鎖付加のため分

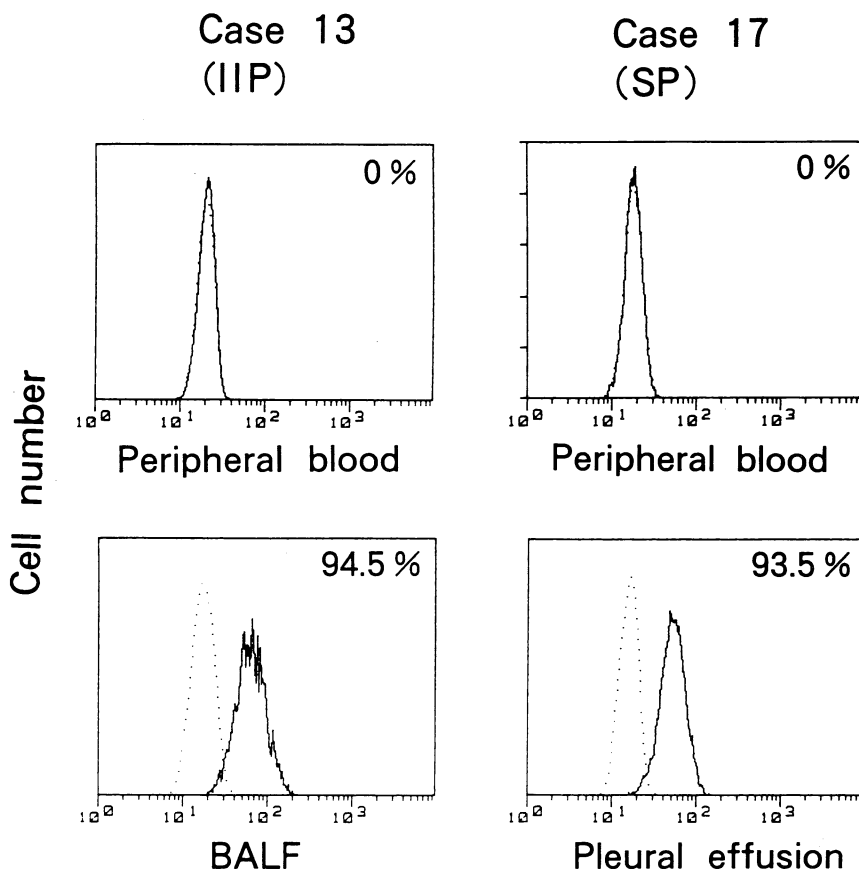


Fig. 8. Representative histograms for CD69 expression (solid line) of peripheral blood, BALF or pleural eosinophils in non-eosinophilic patients with IIP (Case 13) or SP (Case 17). The control histograms are also shown (dotted line). IIP; idiopathic interstitial pneumonia, SP; spontaneous pneumothorax.

子量の異なる二分子の糖蛋白(34/28 kDa)から構成される60 kDaのホモ二量体(homodimer)である²⁰⁾。core proteinは199個のアミノ酸からなり、そのアミノ酸配列からCタイプ(Ca²⁺依存性)のアニマルレクチンファミリーに分類される^{21)–23)}。このファミリーにはlymphokine activated killer(LAK)細胞やNK細胞に発現するNKG2²⁴⁾、低親和性IgEレセプターでありCD21のリガンドでもあるCD23²⁵⁾、CD5のリガンドであるCD72等が属し²⁶⁾、いずれも2型のレセプターでシグナル伝達に関与していることが知られている。CD69抗原もCD69抗体を用いた架橋反応により細胞内カルシウム濃度の上昇¹⁰⁾、c-fosの発現増強やAP-1活性の増強が認められ¹¹⁾、GTP結合蛋白との関連¹²⁾など細胞内シグナル伝達との関係が指摘されている。機能的にはT細胞¹³⁾・B細胞²⁷⁾・胸腺細胞²⁷⁾では増殖、NK細胞¹⁷⁾では細胞障害活性

との関係が報告されている。

このようにCD69抗原は刺激後早期にリンパ球表面に発現し、シグナル伝達に関与すると考えられている非常に興味深い分子であるが、最近これら活性化リンパ球ばかりでなく、血小板でもCD69抗原の構成的な発現と血小板凝集への関与とが報告されている¹³⁾²⁸⁾。これまでリンパ球活性化マーカーとして知られていたCD69抗原であるが、リンパ球に限らず広く血液細胞の活性化に何らかの重要な機能を担っている可能性が考えられる。

今回、著者は好酸球におけるCD69抗原の発現をフローサイトメトリー法を用いて詳細に検討した。対象は局所に明らかな好酸球浸潤をきたす典型例であるEP、HES、およびBALF中や胸水中に好酸球を認めたそれ以外の種々の疾患であり、局所浸潤好酸球比率は1–65%と好酸球の浸潤が少なく好酸球が病態に積極的に関与

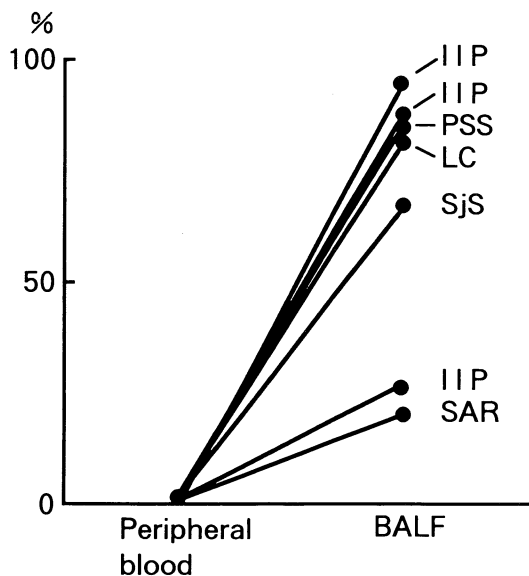


Fig. 9. CD69 positive cell rate of peripheral blood and BALF eosinophils in non-eosinophilic patients.

IIP; idiopathic interstitial pneumonia, PSS; progressive systemic sclerosis, LC; lung cancer, Sjs; Sjögren's syndrome, SAR; sarcoidosis.

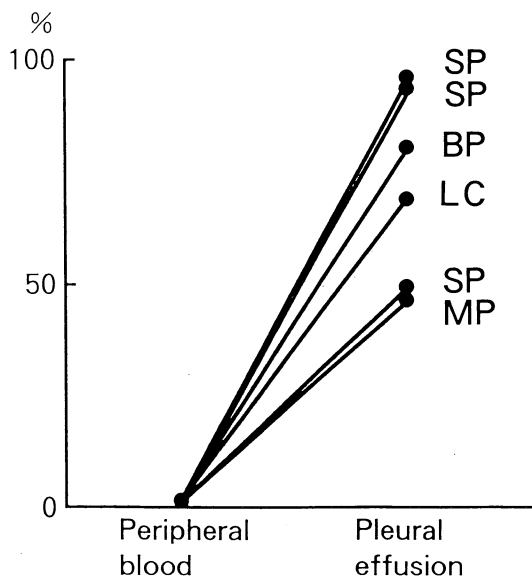


Fig. 10. CD69 positive cell rate of peripheral blood and pleural eosinophils in non-eosinophilic patients.

SP; spontaneous pneumothorax, BP; bacillogenic pneumonia, LC; lung cancer, MP; measles pneumonia.

しているとは考え難い症例も含めた。従来、好酸球での CD69 抗原の発現の報告はなく、今回の検討でも末梢血好酸球にはほとんど発現を認めなかった。しかし、BALF 中あるいは胸水中局所好酸球に明らかな発現がみられ、好酸球でも活性化抗原 CD69 が発現することが今回の研究によって初めて明らかとなった。

従来、好酸球の活性化の指標として好酸球の低比重化があり、低比重好酸球は形態的・機能的に活性化状態であると報告されている^{4)~7)}。EP でも低比重好酸球が末梢血中に増加し、末梢血管内での好酸球の活性化が示唆されているが⁸⁾、CD69 抗原の発現は認めず、CD69 抗原の発現は従来より考えられている好酸球の活性化状態を直接反映するものではないと思われる。一方、局所好酸球では好酸球増多性疾患に限らず検討したすべての症例で明らかな CD69 抗原の発現がみられ、特に局所好酸球浸潤の少ない症例や非特異的炎症である気胸に伴う胸水中好酸球でも例外なく CD69 抗原の発現がみられたことは非常に興味深い所見である。

そこで好酸球の CD69 抗原発現と活性化との関係を知るため、CD69 抗原を発現していない末梢血好酸球を用いて各種好酸球刺激物質による CD69 の発現誘導を *in vitro* で検討した。まず、生理的な好酸球活性化物質である好酸球関連サイトカインの IL-3, IL-5, GM-CSF によって CD69 抗原の発現が明らかに誘導された。これらのサイトカインは好酸球に対する寿命延長、低比重化、antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC) 活性増強、leukotrien C₄ (LTC₄) 産生促進、食食促進などの活性化作用が報告されており^{29)~33)}、これらの活性化刺激により発現が誘導されたことから CD69 抗原の発現と好酸球の活性化との関係が示唆された。一方、低比重化、LTC₄ 産生促進、脱顆粒などの好酸球活性化作用^{34)~36)}が知られている PAF による刺激では CD69 抗原の発現はまったく誘導されず、CD69 抗原の発現誘導には刺激特異性があると考えられた。また、リンパ球で報告されているのと同様に、protein kinase C (PKC) activator である PMA による好酸球の刺激でも CD69 は発現し、好酸球においても PKC を介したシグナルで発現が誘導され得ることが示唆された。また IFN- α でも発現誘導がみられたが、従来 IFN- α の好酸球活性化作用は知られておらず、今後 IFN- α の好酸球に対する作用を検討する必要があると考えられた。最近フィブロンネクチンの接着刺激による好酸球の IL-3・GM-CSF 産生促進作用とそのオートクライン機構による寿命延長作用とが報告され、血管から組織に浸潤した好酸球が細胞外マトリックスに接着して自らサイトカインを分泌する

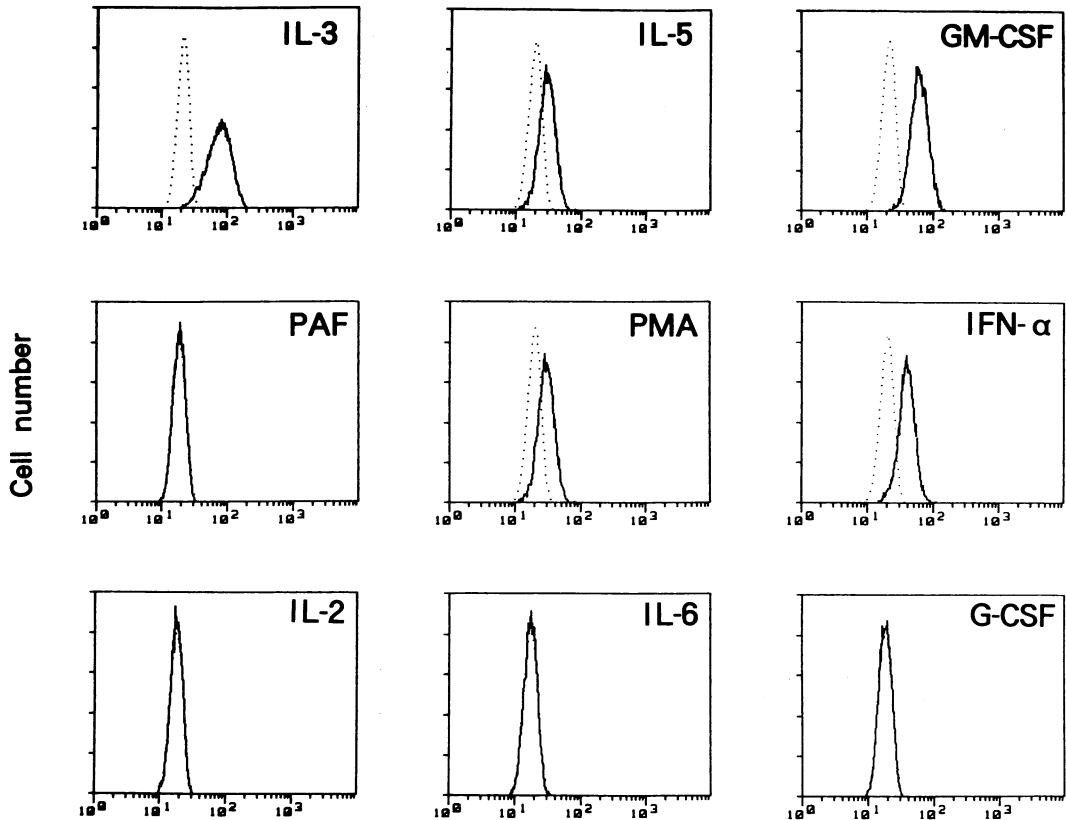


Fig. 11. Effects of cytokines, PAF or PMA on the induction of CD69 expression on peripheral blood eosinophils. Eosinophils were cultured for 6 hr with IL-3 (10 ng/ml), IL-5 (100 ng/ml), GM-CSF (10 ng/ml), PAF (100 ng/ml), PMA (4 ng/ml), IFN- α (10000 U/ml), IL-2 (100 U/ml), IL-6 (100 U/ml) or G-CSF (100 U/ml). Representative histograms for CD69 expression after culture with various reagents (solid line) or medium alone (dotted line).

可能性が想定された³⁷⁾。今回 10 pg/ml の低濃度の IL-3 や GM-CSF 刺激で CD69 抗原の発現が誘導され、胸水上清に発現誘導作用をみとめたことから、生体内でもこのような機序によりサイトカインを介して CD69 抗原が発現する可能性が考えられた。また、発現誘導のカイネティクスではリンパ球での報告と同様に刺激 2 時間後の早期から発現が見られたが、蛋白合成阻害薬 cycloheximide の併用による発現抑制が見られたことから発現する抗原の一部は刺激後に新たに蛋白合成されると考えられた。

以上のように、活性化抗原 CD69 の発現は局所好酸球に特異的に見られ、従来の低比重化を指標とする好酸球の活性化状態を反映していなかった。しかし、好酸球関連サイトカイン等による *in vitro* での活性化刺激により発現が誘導されたことから、CD69 抗原の発現は従来言われている活性化状態とは異なった活性化状態を示して

いると考えられた。つまり局所好酸球は末梢好酸球とは異なる活性化状態にあることが推測され、これまでに知られていない局所特異的な活性化状態の存在が想定された。さらに CD69 抗原は単に活性化の指標であるばかりでなく、リンパ球や血小板では機能分子として活性化に関与することが知られており、好酸球でも局所での活性化過程に何らかの役割を果たしている可能性が考えられた。近年好酸球のアレルギー反応の組織障害作用が明らかになり局所での好酸球活性化の機序の解明が注目されているが、その観点から局所好酸球での CD69 抗原の発現は非常に興味深く、今後さらにその機能分子としての役割を解明する必要があると考えられた。

結 語

好酸球の CD69 抗原の発現について、フローサイトメトリー法を用いて詳細な検討を行い、以下の結果を得た。

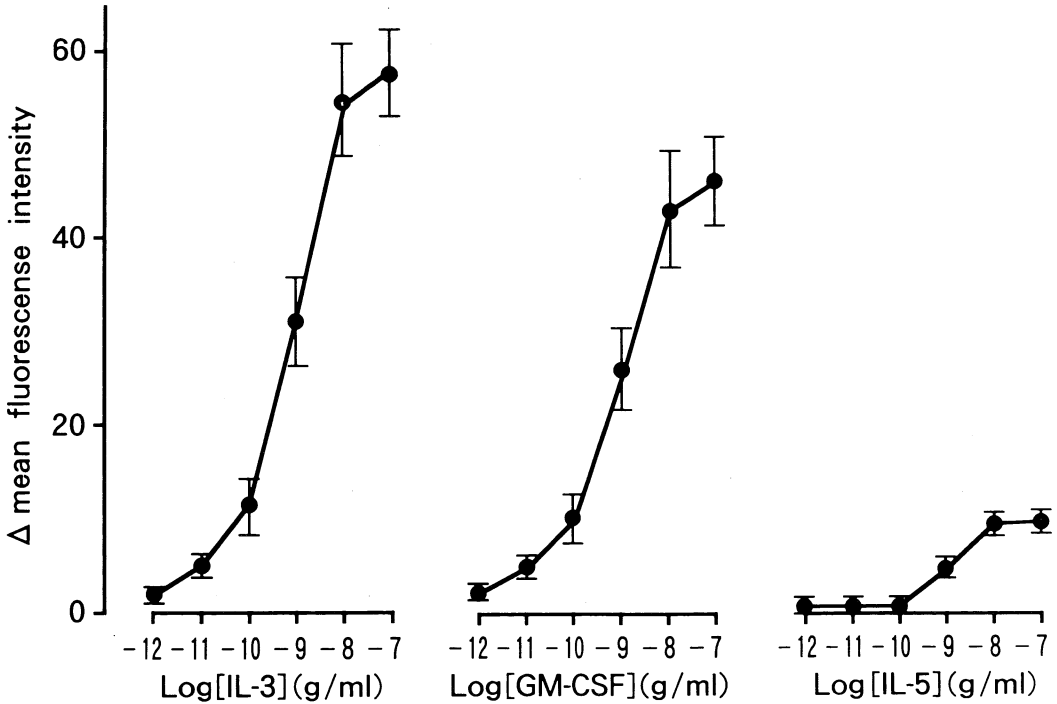


Fig. 12. CD69 expression on peripheral blood eosinophils after culture for 6 hr with a concentration range of IL-3, GM-CSF or IL-5. The concentration of cytokine is shown on a log scale, for example, -12 shows 1×10^{-12} . The results are presented as means \pm SD of three experiments.

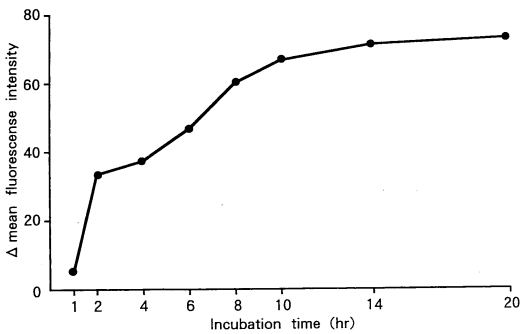


Fig. 13. CD69 expression on peripheral blood eosinophils after various periods in culture with IL-3 at 10 ng/ml.

1) FSC-SSC 表示で顆粒球集団のデータを測定し、さらに CD16 陰性の細胞集団にゲートを設定することにより、フローサイトメトリー法による好酸球表面抗原の解析を行うことができた。

2) 末梢血好酸球では病態にかかわらず、正比重好酸球ばかりか低比重好酸球にも CD69 抗原の発現はほとんどみられなかった。

3) 一方、BALF 中や胸水中の局所好酸球では病態に

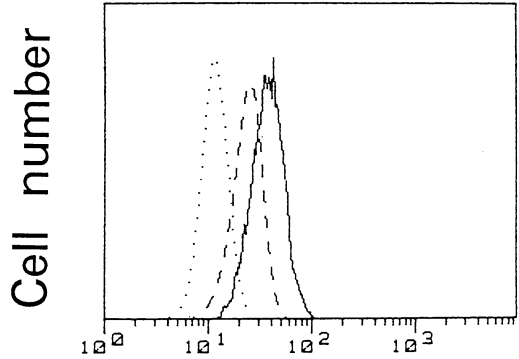


Fig. 14. The fluorescence intensity of CD69 expression of eosinophils after stimulation with GM-CSF (10 ng/ml) for 6 hr in the absence (solid line) or presence (broken line) of cycloheximide (5×10^{-6} M). The control histogram is also shown (dotted line).

かかわらず CD69 抗原が明らかに発現していた。

4) CD69 抗原は *in vitro* における好酸球関連サイトカインによる刺激で末梢血好酸球に発現し、CD69 抗原の発現と活性化との関係が示唆された。

5) CD69 抗原は PMA 刺激でも発現し、PKC を介し

たシグナルでも発現が誘導され得ることが示唆された。また IFN- α でも発現誘導がみられた。しかし、CD69 抗原は好酸球刺激物質である PAF による刺激では発現せず、その発現の誘導に刺激特異性が見られた。

6) IL-3, GM-CSF 刺激では低濃度で発現が誘導され、胸水上清に発現誘導作用をみとめたことから、生体内での発現にこれらのサイトカインが関与する可能性が考えられた。

7) CD69 抗原は刺激 2 時間後の早期から発現したが、その一部は刺激後に新たな蛋白合成を必要とすると考えられた。

以上から、局所好酸球には病態にかかわらず活性化抗原 CD69 が特異的に発現していること、また好酸球関連サイトカイン等による好酸球活性化刺激は早期に CD69 抗原の発現を誘導しようという新しい知見を得、生体局所では好酸球が局所特異的な活性化状態にある可能性をみいだした。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を戴いた第 2 内科学教室成田亘啓教授に心より感謝の意を表しますとともに、御校閲を賜りました白井利彦教授ならびに吉岡章教授に深謝申し上げます。さらに本研究の遂行にあたって終始御指導戴いた第 2 内科学教室西川 潔講師に心より感謝いたします。また御協力を賜った産婦人科学教室斎藤 滋講師ならびに第 2 内科学教室諸兄姉に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Gleich, G. J. and Adolphson, C. R. : The eosinophilic leukocyte: structure and function. *Adv. Immunol.* **39**: 177-253, 1986.
- 2) Kay, A. B. : Eosinophils as effector cells in immunity and hypersensitivity disorders. *Clin. Exp. Immunol.* **62**: 1-12, 1985.
- 3) Venge, P., Hakansson, L. and Peterson, C. G. B. : Eosinophil activation in allergic disease. *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.* **82**: 333-337, 1987.
- 4) DeSimone, C., Donelli, G., Meli, D., Rosati, F. and Sorice, F. : Human eosinophils and parasitic diseases II. Characterization of two cell fractions isolated at different densities. *Clin. Exp. Immunol.* **48**: 249-255, 1982.
- 5) Winqvist, I., Olofsson, T., Olsson, I., Persson, A. M. and Hallberg, T. : Altered density, metabolism and surface receptors of eosinophils in eosinophilia. *Immunology* **47**: 531-539, 1982.
- 6) Prin, L., Capron, M., Tonnel, A. B., Bletry, O. and Capron, A. : Heterogeneity of human peripheral blood eosinophils: Variability in cell density and cytotoxic ability in relation to the level and the origin of hypereosinophilia. *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.* **72**: 336-346, 1983.
- 7) Peters, M. S., Gleich, G. J., Dunnette, S. L. and Fukuda, T. : Ultrastructural study of eosinophils from patients with the hypereosinophilic syndrome: A morphological basis of hypodense eosinophils. *Blood* **71**: 780-785, 1988.
- 8) Prin, L., Capron, M., Gosset, P., Wallaert, B., Kusnierz, J. P., Bletry, O., Tonnel, A. B. and Capron, A. : Eosinophilic lung disease: immunological studies of blood and alveolar eosinophils. *Clin. Exp. Immunol.* **63**: 249-257, 1986.
- 9) Schwarting, R., Niedobitek, G. and Stein, H. : Cluster report: CD69. *in* Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens (Knapp, W., Dörken, B., Gilks, W. R., Rieber, E. P., Schmidt, R. E., Stein, H. and von dem Borne, A. E. G. Kr., eds.). Oxford University Press, Oxford, p428-432, 1989.
- 10) Nakamura, S., Sung, S. J., Bjorndahl, J. M. and Fu, S. M. : Human T cell activation IV. T cell activation and proliferation via the early activation antigen EA 1. *J. Exp. Med.* **169**: 677-689, 1989.
- 11) Tugores, A., Alonso, M. A., Sánchez-Madrid, F. and O. De Landázuri, M. : Human T cell activation through the activation-inducer molecule/CD69 enhances the activity of transcription factor AP-1. *J. Immunol.* **148**: 2300-2306, 1992.
- 12) Risso, A., Smilovich, D., Capra, M. C., Baldissarro, I., Yan, G., Bargellesi, A. and Cosulich, M. E. : CD69 in resting and activated T lymphocytes. Its association with a GTP binding protein and biochemical requirements for its expression. *J. Immunol.* **146**: 4105-4114, 1991.
- 13) Testi, R., Pulcinelli, F., Frati, L., Gazzaniga, P. P. and Santoni, A. : CD69 is expressed on platelets and mediates platelet activation and aggregation. *J. Exp. Med.* **172**: 701-707, 1990.
- 14) Fukuda, T. and Makino, S. : Eosinophil heter-

- ogeneity. *in* Eosinophils in Asthma (Morley, J. and Colditz, I., eds.). Academic Press, London, p125-140, 1989.
- 15) **Corte, G., Moretta, L., Damiani, G., Mingari, M. C. and Bargellesi, A.** : Surface antigens specifically expressed by activated T cells in humans. *Eur. J. Immunol.* **11** : 162-164, 1981.
 - 16) **Hara, T., Jung, L. K. L., Bjorn Dahl, J. M. and Fu, S. M.** : Human T cell activation III. Rapid induction of a phosphorylated 28 kD/32 kD disulfide-linked early activation antigen (EA 1) by 12-*o*-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, mitogens, and antigens. *J. Exp. Med.* **164** : 1988-2005, 1986.
 - 17) **Lanier, L. L., Buck, D. W., Rhodes, L., Ding, A., Evans, E., Barney, C. and Phillips, J. H.** : Interleukin 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu-23 activation antigen. *J. Exp. Med.* **167** : 1572-1585, 1988.
 - 18) **Cebrián, M., Yagüe, E., Rincón, M., López-Botet, M., O. De Landázuri, M. and Sánchez-Madrid, F.** : Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. *J. Exp. Med.* **168** : 1621-1637, 1988.
 - 19) **Testi, R., Phillips, J. H. and Lanier, L. L.** : Constitutive expression of a phosphorylated activation antigen (Leu-23) by CD3^{bright} human thymocytes. *J. Immunol.* **141** : 2557-2563, 1988.
 - 20) **Cosulich, M. E., Risso, A., Mazza, M. R., Smilovich, D., Capra, M. C., Massa, A., Costanzi, S., Baldissarro, I., Droge, W. and Bargellesi, A.** : Functional and biochemical characterization of the activation CD69 antigen defined by A 40 (MLR 3) mAb. *in* Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens (Knapp, W., Dörken, B., Gilks, W. R., Rieber, E. P., Schmidt, R. E., Stein, H. and von dem Borne, A. E. G. Kr., eds.) . Oxford University Press, Oxford, p432-435, 1989.
 - 21) **Hamann, J., Fiebig, H. and Strauss, M.** : Expression cloning of the early activation antigen CD69, a type II integral membrane protein with a C-type lectin domain. *J. Immunol.* **150** : 4920-4927, 1993.
 - 22) **Ziegler, S. F., Ramsdell, F., Hjerrild, K. A., Armitage, R. J., Grabstein, K. H., Hennen, K. B., Farrah, T., Fanslow, W. C., Shevach, E. M. and Alderson, M. R.** : Molecular characterization of the early activation antigen CD69: a type II membrane glycoprotein related to a family of natural killer cell activation antigens. *Eur. J. Immunol.* **23** : 1643-1648, 1993.
 - 23) **López-Cabrera, M., Santis, A. G., Fernández-Ruiz, E., Blacher, R., Esch, F., Sánchez-Mateos, P. and Sánchez-Madrid, F.** : Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors. *J. Exp. Med.* **178** : 537-547, 1993.
 - 24) **Houchins, J. P., Yabe, T., McSherry, C. and Bach, F. H.** : DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J. Exp. Med.* **173** : 1017-1020, 1991.
 - 25) **Kikutani, H., Inui, S., Sato, R., Barsumian, E. L., Owaki, H., Yamasaki, K., Kaisho, T., Uchibayashi, N., Hardy, R. R., Hirano, T., Tsunasawa, S., Sakiyama, F., Suemura, M. and Kishimoto, T.** : Molecular structure of human lymphocyte receptor for immunoglobulin E. *Cell* **47** : 657-665, 1986.
 - 26) **Nakayama, E., von Hoegen, I. and Parnes, J. R.** : Sequence of the Lyb-2 B-cell differentiation antigen defines a gene superfamily of receptors with inverted membrane orientation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** : 1352-1356, 1989.
 - 27) **Sánchez-Mateos, P., Cebrián, M., Acevedo, A., López - Botet, M., O. De Landázuri, M. and Sánchez-Madrid, F.** : Expression of a 33/27,000 MW activation inducer molecule (AIM) on human lymphoid tissues. Induction of cell proliferation on thymocytes and B lymphocytes by anti-AIM antibodies. *Immunology* **68** : 72-79, 1989.
 - 28) **Testi, R., Pulcinelli, F. M., Cifone, M. G., Botti, D., Grosso, E. D., Rioldino, S., Frati, L., Gazzaniga, P. P. and Santoni, A.** : Preferential involvement of a phospholipase A₂-dependent

- pathway in CD69-mediated platelet activation. *J. Immunol.* **148**: 2867-2871, 1992.
- 29) Silberstein, D. S., Owen, W. F., Gasson, J. C., DiPersio, J. F., Golde, D. W., Bina, J. C., Soberman, R., Austen, K. F. and David, J. R. : Enhancement of human eosinophil cytotoxicity and leukotriene synthesis by biosynthetic (recombinant) granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol.* **137**: 3290-3294, 1986.
- 30) Lopez, A. F., Williamson, D. J., Gamble, J. R., Begley, C. G., Harlan, J. M., Klebanoff, S. J., Waltersdorff, A., Wong, G., Clark, S. C. and Vadas, M. A. : Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates in vitro mature human neutrophil and eosinophil function, surface receptor expression, and survival. *J. Clin. Invest.* **78**: 1220-1228, 1986.
- 31) Rothenberg, M. E., Owen, Jr. W. F., Silberstein, D. S., Woods, J., Soberman, R. J., Austen, K. F. and Stevens, R. L. : Human eosinophils have prolonged survival, enhanced functional properties, and become hypodense when exposed to human interleukin 3. *J. Clin. Invest.* **81**: 1986-1992, 1988.
- 32) Lopez, A. F., Sanderson, C. J., Gamble, J. R., Campbell, H. D., Young, I. G. and Vadas, M. A. : Recombinant human interleukin 5 is a selective activator of human eosinophil function. *J. Exp. Med.* **167**: 219-224, 1988.
- 33) Rothenberg, M. E., Petersen, J., Stevens, R. L., Silberstein, D. S., McKenzie, D. T., Austen, K. F. and Owen, Jr. W. F. : IL-5-dependent conversion of normodense human eosinophils to the hypodense phenotype uses 3T3 fibroblasts for enhanced viability, accelerated hypodensity, and sustained antibody-dependent cytotoxicity. *J. Immunol.* **143**: 2311-2316, 1989.
- 34) Bruynzeel, P. L. B., Koenderman, L., Kok, P. T. M., Hameling, M. L. and Verhagen, J. : Platelet-activating factor (PAF-acether) induced leukotriene C₄ formation and luminol dependent chemiluminescence by human eosinophils. *Pharmacol. Res. Commun. Suppl.* **18**: 61-69, 1986.
- 35) Kroegel, C., Yukawa, T., Dent, G., Venge, P., Chung, K. F. and Barnes, P. J. : Stimulation of degranulation from human eosinophils by platelet-activating factor. *J. Immunol.* **142**: 3518-3526, 1989.
- 36) Yukawa, T., Kroegel, C., Evans, P., Fukuda, T., Chung, K. F. and Barnes, P. J. : Density heterogeneity of eosinophil leucocytes: Induction of hypodense eosinophils by platelet-activating factor. *Immunology* **68**: 140-143, 1989.
- 37) Anwar, A. R. F., Moqbel, R., Walsh, G. M., Kay, A. B. and Wardlaw, A. J. : Adhesion to fibronectin prolongs eosinophil survival. *J. Exp. Med.* **177**: 839-843, 1993.