

学 位 論 文 題 名

ヒト MCAF/MCP-1 トランスジェニックマウス
におけるマクロファージ機能の解析

学位論文内容の要旨

はじめに

炎症および免疫反応における白血球遊走をコントロールするサイトカインをケモカインと総称する。monocyte chemotactic and activating factor (MCAF)、または monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) は、C-Cケモカインに属する代表的なケモカインである。MCAF/MCP-1 (以下MCP-1) は、*in vitro* においては単球だけでなく他の白血球にも走化性の亢進をもたらし、単球上の接着分子の発現を増強させる。*in vivo* においては、単球・マクロファージの浸潤が顕著な病変において、MCP-1の発現が認められ、さまざまな疾患において、MCP-1が病態形成になんらかの関与を示すことが報告されている。

本研究では、生体内における MCP-1 の生理的・病理的役割を解明する目的で、生下時より構成的に高濃度のヒト MCP-1 を発現する Tgm を作製し、各臓器における MCP-1 の発現を解析した。また、*in vitro*、*in vivo* におけるマクロファージ機能を検索した。

結 果

多臓器にヒトMCP-1を発現するTgmを作製する目的で、ベータアクチンプロモーター、ヒトMCP-1遺伝子配列とSV40 poly A鎖を結合させ、受精卵前核にマイクロインジェクションした。マウスはヒトMCP-1特異的プライマーを用いたPCRでスクリーニングを行った。実験にはトランスジェン陽性の (Tgm×C57BL/6) F1マウスを用いた (以下Tgmと略す)。RT-PCRの結果、mRNAの発現は肝臓、精巣、脳、腎臓と比べ、胸腺、脾臓などのリンパ組織で強いことが確認された。次にTgmの血中ヒトMCP-1量をELISAで測定した。ヒトMCP-1の血中濃度は、未刺激時のTgmで7-13 ng/mlであった (non-Tgmでは測定限界以下)。

mRNA レベルでMCP-1の強い発現が認められ胸腺、脾臓、リンパ節の組織学的検索を行った。Tgmでは胸腺髄質、脾臓動脈周囲リンパ球鞘、リンパ節辺縁洞における単核球の集積と、リンパ節傍皮質領域にヘモジデリンの沈着が認められた。しかし、単核球集積はリンパ組織以外の器官では認められなかった。免疫組織化学染色の結果、リンパ節のB細胞領域と脾臓辺縁帯に集積した細胞は、MOMA-1陽性マクロファージであることが判明した。しかし、B細胞とT細胞の免疫染色の結果、リンパ組織の構築そのものは、正常構造を示すことが判明した。

常住性およびチオグリコレートで誘導した滲出性腹腔細胞数は、non-Tgmと比べてTgmで

増加の傾向が認められた。腹腔細胞による食食能を評価するために、過剰量のラテックスビーズ投与後、経時的に腹腔細胞を回収してフローサイトメトリーで解析した。投与後2時間では、Tgmとnon-Tgmの間で、ビーズ食食分画に差は認められなかった。しかし、投与後4時間では、Tgmでは腹腔細胞数の著しい増加が認められるにも拘わらず、ビーズ食食分画の減少が認められた。またこの時、Tgmの血中には著しいMCP-1の増加が観察された。一方、*in vitro* で常住性腹腔細胞によるビーズの食食能を解析した結果、Tgmにおいてビーズを食食している分画の減少は見られなかった。

Tgmとnon-Tgmの間で、腹腔細胞におけるMac-1の発現に差は認められなかった。そこで、骨髓由来細胞以外にヒトMCP-1遺伝子の存在しない環境下での、Tgm由来マクロファージにおけるMac-1発現の解析を行う目的で、骨髓キメラ [Tgm→AKR] を用いて同様の検索を行った。その結果、[Tgm→AKR] は、non-Tgmをドナーとしたキメラマウス [non-Tgm→AKR] と比べて、腹腔細胞におけるMac-1発現の著明な増強が認められた。[Tgm→AKR] の血中には、無処置Tgmと比べて高濃度のMCP-1が検出された。

他のマクロファージ機能を *in vitro* で解析するために、チオグリコレートで誘導した滲出性マクロファージにおいて、インターフェロン γ (以下IFN- γ) 添加24時間後のNO産生能を測定した。Tgmとnon-Tgmを比較すると、NO産生能に有意差は認められなかった。一方、[Tgm→AKR] 由来の滲出性マクロファージでは、[non-Tgm→AKR] と比べてIFN- γ の存在下でのNO産生能の著しい増加が認められた。

in vivo におけるマクロファージ機能をさらに調べる目的で、ザイモサンの静脈内投与後の肝内肉芽腫形成を解析した。投与後9日では、Tgmとnon-Tgm間で、肉芽腫の数および大きさにおいて差は認められなかった。また、肉芽腫はMOMA-1 免疫化学染色により、主にマクロファージ様細胞で形成されていることが示された。しかし、投与後12日では、non-Tgmで肉芽腫反応の終息が認められるのに対し、Tgmでは9日目と同程度の反応が持続しており、肉芽腫反応の遷延化と考えられた。投与後15日では、Tgmにおいても肉芽腫反応の終息傾向が認められた。

次にTgmマクロファージにおける、細胞内シグナル伝達系SrcファミリーチロシンキナーゼのFgrとHckの活性を、immune complex kinase assayで解析したところ、non-Tgmと比べてTgmの腹腔細胞では、FgrとHckの自己リン酸化能の増強が認められた。

考察

in vitro でのマクロファージ機能の解析では、構成的にヒトMCP-1を発現するTgmとnon-Tgm間で反応性の差はほとんど認められなかったが、*in vivo* においては、Tgmではnon-Tgmと比べて反応性の低下が認められた。その理由として、*in vivo* 環境下ではMCP-1 mRNAの発現量の差が、そのまま濃度勾配を表し、恒常的に高濃度のMCP-1が存在するリンパ組織にマクロファージ系細胞の集積が生じる一方、これらの細胞のMCP-1に対する感受性は逆に低下していることが考えられた。この感受性の低下は、高濃度MCP-1の存在によって、MCP-1レセプターが持続的に刺激される結果、MCP-1の下流にある伝達系が一過性に抑制されるためと考えられた。しかし、高濃度MCP-1が存在しない *in vitro* 環境下では、Tgmから得たマクロファージの反応性がリセットされ、正常マウスのマクロファージとほぼ同一のレベルになるためではないかと考えられた。

骨髓キメラマウス [Tgm→AKR] におけるMac-1の発現増強やNO産生能の増加のメカニズムとして、高濃度MCP-1 以外に、他のサイトカインやアロジェニックな環境に基づく何ら

かの因子の影響が考えられた。

Tgm腹腔マクロファージにおけるSrcファミリーチロシンキナーゼの活性上昇は、他のCCRの関与や、マクロファージ機能の変化に伴う、二次的なものである可能性が考えられた。

本研究で作製されたTgmは、高MCP-1血症における、単球／マクロファージ機能を解析する良いモデルとなり、また、高ケモカイン血症におけるさまざまな感染に対する宿主の反応解析に有用であると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小野江 和 則

副 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 柿 沼 光 明

学 位 論 文 題 名

ヒト MCAF/MCP-1 トランスジェニックマウス

におけるマクロファージ機能の解析

monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) は、C-Cケモカインに属する代表的なケモカインである。*in vivo* においては、単球・マクロファージの浸潤が顕著な病変において、MCP-1の発現が認められ、さまざまな疾患において病態形成になんらかの関与を示すことが報告されている。

本研究では、生体内における MCP-1 の生理的・病理的役割を解明する目的で、生下時より構成的に高濃度のヒト MCP-1 を発現する Tgm を作製し、各臓器における MCP-1 の発現を解析した。また、*in vitro*、*in vivo* におけるマクロファージ機能を検索した。

ベータアクチンプロモーター、ヒトMCP-1 遺伝子配列とSV40 poly A鎖を結合させ、受精卵前核にマイクロインジェクションした。実験にはトランスジェン陽性の (Tgm × C57BL/6) F1 マウスを用いた (以下Tgmと略す)。RT-PCRの結果、mRNAの発現は肝臓、精巣、脳、腎臓と比べ、胸腺、脾臓などのリンパ組織で強いことが確認された。ヒト MCP-1の血中濃度は、未刺激時のTgmで7-13 ng/mlであった。

mRNA レベルでMCP-1の強い発現が認められた胸腺髄質、脾臓動脈周囲リンパ球鞘、リンパ節辺縁洞に単核球の集積、リンパ節傍皮質領域にヘモジデリンの沈着が認められた。しかし、単核球集積はリンパ組織以外の器官では認められなかった。リンパ組織に集積した細胞は、MOMA-1陽性マクロファージであることが判明した。しかし、リンパ組織の構築は、正常構造を示すことが判明した。

常住性およびチオグリコレートで誘導した滲出性腹腔細胞数は、non-Tgmと比べてTgmで増加の傾向が認められた。過剰量のラテックスビーズ投与2時間後では、Tgmとnon-Tgmの間で、ビーズ食食分画に差は認められなかったが、投与後4時間では、Tgmでビーズ食食分画の減少が認められた。またこの時、Tgmの血中ではMCP-1が著明に増加していた。*in vitro* における常住性腹腔細胞によるビーズの食食能では、Tgmとnon-Tgmの差は見られなかった。

Tgmとnon-Tgmの間で、腹腔細胞におけるMac-1の発現に差は認められなかった。そこで、骨髓キメラを用いて同様の検索を行った。その結果、[Tgm→AKR] キメラは、[non-Tgm→AKR] キメラと比べて、腹腔細胞におけるMac-1発現の著明な増強が認められ、[Tgm→AKR]の血中には高濃度のMCP-1が検出された。

滲出性マクロファージにおけるIFN- γ 添加24時間後のNO産生能は、Tgmとnon-Tgm間に有意差は認められなかった。一方、[Tgm $\rightarrow$ AKR]由来の滲出性マクロファージでは、[non-Tgm $\rightarrow$ AKR]と比べてNO産生能の著しい増加が認められた。

次にザイモサンの静脈内投与後の肝内肉芽腫形成を解析した。投与後9日では、Tgmとnon-Tgm間で、主としてMOMA-1陽性マクロファージより構成される肉芽腫の数、サイズに差は認められなかった。しかし、投与後12日では、Tgmでは肉芽腫反応の遷延化が見られた。

Tgmマクロファージにおける、細胞内シグナル伝達系Srcファミリーチロシンキナーゼ、FgrとHckの活性を解析したところ、non-Tgmと比べてTgmの腹腔細胞では、自己リン酸化能の増強が認められた。

以上、*in vitro*のマクロファージ機能の解析では、Tgmとnon-Tgm間で差は認められなかったが、*in vivo*においては、Tgmで反応性の低下が認められた。その理由として、恒常的に高濃度のMCP-1が存在するリンパ組織にマクロファージ系細胞の集積が生じる一方、これらの細胞のMCP-1に対する感受性は逆に低下していることが考えられた。

公開発表後に副査の上出教授より、解析するマクロファージ機能によるMCP-1の影響の違い、ケモカインレセプター、他のケモカインに対する反応性、肉芽腫反応の経時的解析について、柿沼教授よりヒトベータ γ -アクチンプロモーターとヒトMCP-1遺伝子を用いた理由、ケモタキシスのメカニズム、内因性MCP-1の影響、MCP-1恒常産生によるマクロファージ機能低下のメカニズム、主査の小野江よりTgmにおけるリンパ球機能、ヘモジデリン沈着に対する解釈について質問があったが、申請者は文献的考察も含め大概妥当な回答をなし得た。

本研究で作製されたTgmは、高MCP-1血症における、単球/マクロファージ機能を解析する良いモデルとなり、また、高ケモカイン血症におけるさまざまな感染に対する宿主の反応解析に有用であると考えられる。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。