

博士（医学） エンカマル ドンドグ

学位論文題名

Functional modification of a murine macrophage cell line, J774A.1, transfected with rat *csk* genes

(ラット *csk* 遺伝子導入マウスマクロファージ細胞株の機能修飾)

学位論文内容の要旨

I 緒言

Srcファミリーに属するチロシンキナーゼ (src-PTK) はリンパ造血系・神経系などに細胞系譜特異的に発現し、キナーゼドメインを欠いた細胞表面受容体と会合することによって、シグナル伝達に大きな役割を果たしている。これらのsrc-PTKの活性は、チロシン脱リン酸化酵素 (CD45) と、PTKの1種、Csk (C-terminal Src kinase) によって、それぞれ正・負に制御される。Cskはsrc-PTKのカルボキシ末端に存在するチロシン残基をリン酸化し、このリン酸化チロシンがアミノ末端側に存在するSH (Src homology)-2領域に分子内結合し、キナーゼ活性中心をマスクすることによって、src-PTKを不活性化する。Cskはすべての細胞で発現するが、このようにsrc-PTKの活性を調節することで、細胞系譜特異的な機能を有していると考えられる。Cskの個体レベルの機能を明らかにする目的で遺伝子破壊マウスが作製されたが、これらは神経管の閉鎖不全によって胎性致死となった。また、Csk発現量はきわめて厳格に制御されているために、過剰発現マウスの作製も困難である。したがってCskの機能を研究するためには、細胞株への遺伝子導入や、遺伝子破壊が必要となる。本研究ではマクロファージにCskを過剰発現させることにより、マクロファージ機能を変換し、マクロファージにおけるCskの役割を解明すると同時に、炎症制御治療の基盤を確立する目的で、Csk過剰発現マクロファージ細胞株J774A.1の機能解析を行った。

II 材料と方法

1. Csk過剰発現細胞株の作製：マウスマクロファージ細胞株J774A.1に、電気穿孔法を用いラット *csk* cDNAを発現ベクターに挿入後導入し、限界希釈法によってクローニングした。Csk発現量の異なる3つのクローン (J.Csk3 < J.Csk4 < J.Csk8) と、発現ベクターのみのコントロール (J.pBK2)、および親株を実験に用いた。
2. リポ多糖 (LPS) 刺激後の一酸化窒素 (NO)・プロスタグランдин (PG) E₂産生：細胞 (1×10^5 /ウェル) を $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のLPSで刺激し、24~48時間後の培養上清中のNOを呈色反応 (Griess-Romijn法)、PGE₂を競合的酵素免疫定量法にて測定した。
3. MAPキナーゼ (MAPK) の発現及び活性解析：細胞を可溶化し、電気泳動・ニトロセルロース膜へ転写後、抗MAPK抗体にてイムノプロットを行った。活性は、細胞ライセートを抗リン酸化MAPK抗体で免疫沈降させたのち、基質であるElk-1融合蛋白とインキュベートし、リン酸化Elk-1をイムノプロットで検出することによって解析した。
4. ラテックスビーズ・アセチル化低比重リポ蛋白 (LDL) の取り込み：FITCでラベルし

たラテックスビーズ（径 $0.75\text{ }\mu\text{m}$ ）と細胞を 37°C で3時間培養後、フローサイトメトリーにて貪食画分を算出した。また、DiIラベルしたLDLと細胞を 37°C で4時間培養後、固定し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察及び定量を行った。

5. フローサイトメトリーによるスカベンジャー受容体の検出と早期アポトーシスの検出：細胞をラット抗マウススカベンジャー受容体抗体2F8と抗ラットイムノグロブリーンFITCで蛍光染色した。また各種濃度のLPSで刺激した細胞をFITCラベルしたアネキシンVで染色した。これらの染色細胞をフローサイトメトリーで解析した。

III 結果

NO産生とPGE₂産生の関連：Cskを過剰発現させたトランスクレクタント（以下J.Csk）では、LPS刺激を加えた際のIL-1 α 、TNF- α 、IL-6などのモノカイン、NOの産生が、親株やベクターコントロールに比して低下し、PGE₂の産生が亢進していた。このNOとPGE₂の産生の逆相関関係について、LPS刺激によって産生されるPGE₂が、NOやIL-1 α の低下を誘導しているのではないことは、以前の研究によって判明している。本研究では、さらにJ.CskにおけるNOの低産生性とPGE₂産生亢進との関連を明らかにするために、まずNO産生を阻害するアミノグアニジンを培養に添加し、各細胞のPGE₂産生を測定した。その結果、NO産生の阻害によってベクターコントロールのPGE₂産生は却って低下することが判明し、またJ.CskでもNO産生阻害によってPGE₂産生が抑制された。次にJ.CskをLPSで刺激する際、NOドナーを培養中に添加し、培養中のNO濃度を親株・ベクターコントロールレベルにまで増加させたか、J.CskのPGE₂産生は減少しなかった。以上の結果より、NOとPGE₂産生の逆相関関係は、それぞれの最終生成物による相互阻害による結果ではないことが判明した。

Cskの過剰発現とMAPKの活性化の関連：J.Cskで認められる特異なNO・PGE₂産生パターンは、Cskの過剰発現によると考えられる。しかし、これらの作用機序については不明である。最近、MAPK経路の下流に、フォスフォリパーゼA₂（PLA₂）が標的として存在することが予測されている。膜脂質にPLA₂が作用して放出されるアラキドン酸はPGE₂の出発材料なので、Cskの過剰発現がPGE₂産生亢進につながる作用点として、MAPK系が考えられた。J.Cskにおいて、MAPKの発現や活性を検索した結果、p44/42 MAPKの発現量には、親株、ベクターコントロール、J.Csk間で差はなかったが、LPS刺激後のリン酸化（活性型）MAPKの発現がJ.Cskで高く、また基質であるElk-1のリン酸化も強い傾向が認められた。次に、MAPK活性の亢進とNO産生の関連を検討するために、親株あるいはJ.Csk8をLPSとIFN- γ で刺激し、その際にMAPKの阻害剤であるPD98059（PD）を作用させた。その結果、親株ではPDの添加でほぼ完全にNO産生が抑制されるのに対し、J.Csk8では抑制は部分的であり、MAPKの活性亢進の結果と一致した。

ビーズ貪食能・アセチルLDLの取り込み低下：J.Cskではビーズ貪食能・アセチルLDLの取り込みの低下が観察された。取り込み低下はCskの発現量と逆相関しており、また取り込みの低下が大きいJ.Csk4、J.Csk8において、スカベンジャー受容体発現の低い細胞分画の割合増加が認められた。

LPS刺激後の早期アポトーシス画分の増加：LPS刺激後、J.pBK2と比べJ.CskではアネキシンV陽性の細胞の増加が認められた。ただし、早期アポトーシス画分の割合の大きさと、Csk発現量の間には相関は認められなかった。

IV 考察

本研究では、マクロファージ細胞株にCskを過剰発現させることによって、ラテックス

ビーズの貪食やアセチルLDLの取り込みなどのマクロファージ機能の低下や、LPSの刺激後の早期アポトーシス亢進などが認められることが判明した。これらは、*csk*遺伝子導入を過度に活性化されたマクロファージ、例えば血球貪食症候群などのマクロファージに導入することによって、治療する可能性を示唆するものである。また、NO低下とPGE₂産生亢進が、一見それぞれの最終生成物による負のフィードバックによる制御と見えたが、これらがCsk過剰発現後に独立して誘導される現象であることが示された。また、モノカイン類の産生低下も含めて、生じたマクロファージ機能のモジュレーションの機序の一つとして、MAPK経路の活性化が示唆された。この経路の開始点にはチロシンリン酸化や脱リン酸化が介在しているので、この開始点が、Csk過剰発現によって影響されると予測された。これらのモノカイン・ケミカルメディエーターの産生パターンの変化のうち、モノカインの産生低下は炎症反応の制御に有効と考えられるが、PGE₂産生の増加が個体レベルでどのような影響を与えるかは、*csk*遺伝子導入の応用を考慮する時、重要と考えられる。

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 細川 真澄男

学位論文題名

Functional modification of a murine macrophage cell line, J774A.1, transfected with rat *csk* genes

(ラット *csk* 遺伝子導入マウスマクロファージ細胞株の機能修飾)

Src ファミリーに属するチロシンキナーゼ (src-PTK) は細胞系譜特異的に発現し、シグナルを伝達する。これらの src-PTK の活性は、PTK の 1 種、Csk (C-terminal Src Kinase) によって、負に制御される。Csk は、src-PTK の活性を調節することで、細胞系譜特異的な機能を有する。個体レベルで Csk 機能を解析する遺伝子破壊マウスは、神経管の閉鎖不全によって胎性致死となった。また、Csk 過剰発現マウスの作製も困難である。したがって Csk の機能を研究するためには、細胞株への遺伝子導入や、遺伝子破壊が必要となる。本研究ではマクロファージに Csk を過剰発現させ、マクロファージにおける Csk の役割を解明すると同時に、炎症制御治療の基盤を確立する目的で、*csk* 遺伝子導入マクロファージ細胞株の機能解析を行った。

マウスマクロファージ細胞株 J774A.1 にラット *csk* cDNA を導入し、Csk 発現量の異なる 3 つのクローン (J.Csk3 < J.Csk4 < J.Csk8) と、ベクターコントロール (J.pBK2)、および親株を用いた。これらの細胞 LPS で刺激し、24~48 時間後の培養上清中の NO を呈色反応 (Griess-Romijn 法)、PGE₂ を競合的酵素免疫定量法にて測定した。また、細胞を可溶化し、抗 MAPK 抗体にてイムノプロットを行った。活性は、細胞ライセートを抗リン酸化 MAPK 抗体で免疫沈降させ、Elk-1 融合蛋白とインキュベートし、リン酸化 Elk-1 をイムノプロットで検出・解析した。次に、FITC でラベルしたラテックスビーズと細胞を培養後、フローサイトメトリーにて貪食画分を算出した。また、DiI ラベルしたアセチル LDL を細胞と培養後、固定し、共焦点レーザー顕微鏡にて定量した。さらに、細胞をラット抗マウスカベンジャー受容体抗体 2F8 で染色した。LPS 刺激後の細胞を FITC ラベルしたアネキシン V で染色した。これらの染色細胞をフローサイトメトリーで解析した。

J.Csk では、LPS 刺激後のモノカイン、NO の産生が、親株やベクターコントロールに比して低下し、PGE₂ の産生が亢進していた。J.Csk における NO の低産生性と PGE₂ 産生亢進との関連を明らかにするために、NO 産生を阻害するアミノグアニジンを培養に添加し、PGE₂ 産生を測定した。

その結果、NO 産生の阻害によって、ベクターコントロール、J.Csk で PGE₂ 産生が阻害された。次に LPS で刺激する際、NO ドナーを培養中に添加したが、J.Csk の PGE₂ 産生は減少しなかった。以上より、NO と PGE₂ 産生の逆相関関係は、それぞれの最終生成物による相互阻害によらないことが判明した。

MAPK 経路の下流に、フォスフォリパーゼ A₂ (PLA₂) が標的として存在する。膜脂質に PLA₂ が作用して放出されるアラキドン酸は PGE₂ の出発材料なので、PGE₂ 產生亢進につながる作用点として、MAPK 系が考えられた。LPS 刺激後はリン酸化 MAPK の発現が J.Csk で高く、また基質である Elk-1 のリン酸化も強かった。次に、親株あるいは J.Csk8 を LPS と IFN-γ で刺激し、MAPK の阻害剤である PD98059 (PD) を作用させた。親株では PD の添加でほぼ完全に NO 产生が抑制されたが、J.Csk8 では抑制は部分的であった。また、J.Csk ではビーズ貪飢能・アセチル LDL の取り込みの低下が観察された。取り込みの低下が大きい J.Csk4、J.Csk8 において、スカベンジャー受容体発現の低い細胞分画の増加が認められた。さらに、LPS 刺激後、J.Csk ではアネキシン V 陽性細胞が増加した。

口頭発表にあたり、副査の上出教授より、Csk 過剰発現による Src キナーゼの活性低下と、MAPK 活性亢進が一元的に説明可能か、細川教授より、J.Csk の他の機能、アミノグアニジンによる PGE₂ 产生低下の理由、臨床応用の可能性、主査の小野江より、J.Csk の表現形、運動性などについて質問があったが、申請者はおおむね適切に回答した。

本研究は、Csk を過剰発現させることによって、マクロファージ機能の低下や、LPS 刺激後の早期アポトーシス亢進を明らかにした。これらは、csk 遺伝子を例えれば血球貪食症候群などのマクロファージに導入することによって、治療する可能性を示唆する。また、マクロファージ機能のモジュレーションによるモノカインの产生低下は、炎症反応の制御に有効と考えられる。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。