

学位論文題名

Neutrophils secrete MIP-1 β after adhesion to laminin contained in basement membrane of blood vessels.

(血管基底膜中のラミニンへ接着した好中球は MIP - 1 β を分泌する)

学位論文内容の要旨

【背景・目的】

好中球は微生物に対する生体の抵抗力において重要な役割を担っている。なかでも貪食細胞として微生物に対する防御反応の第一線において重要な働きをしていると考えられている。細菌感染局所にはまず好中球が浸潤し、ついでマクロファージや樹状細胞が浸潤し、最終的にはリンパ球の浸潤が起こると考えられている。こうした感染巣への各種免疫応答細胞の遊走と活性化は非特異的免疫応答と特異的免疫応答機構においては重要なステップであり、これによって生体は微生物を効果的にかつ能率よく除去している。最近鈴木らは、granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) が、好中球を刺激して epithelial-cell-derived-neutrophil-activating-factor-78 (ENA-78) の産生を誘導し、好中球の遊走を刺激することを発表した。この報告は、好中球自身が感染巣で好中球の集積を増強する可能性を示唆している。つまり好中球が貪食作用等の抗菌作用以外に、ケモカインの産生を介した免疫応答細胞の感染局所への遊走カスケードを刺激する作用を持っている可能性を示唆している。本研究においては、好中球の寿命が数時間と短命であると言う事実から、好中球が血管内から感染局所に移動する途中で何らかのケモカインを産生し、免疫応答細胞の遊走を刺激していると言う仮説を立て、その検証を行った。具体的には血管基底膜中の細胞外基質タンパクであるフィブロネクチン、ラミニン、マトリゲルへ接着後、好中球がどのようなケモカインを産生するのかを検討した。

【方法】

1) ヒト好中球の単離と細胞外マトリックス蛋白との接着

末梢血を正常ボランティアより 20ml 採取し、まず Ficoll-Paque にて単核球を分離後、2%メチルセルロースにて赤血球と好中球に分離した。好中球分画に残存した赤血球は hypotonic shock にて除去した。この方法で得られた好中球分画は、99%以上が好中球で占められ、残りの 1%以下は好酸球であった。アガロース、フィブロネクチン、ラミニン、マトリゲルを各コーティングした dish を作成し、各コーティングデイッシュで単離されたヒト好中球を 2-24 時間培養した。培養後に培養上清と好中球を各々回収した。

2) 好中球のケモカイン mRNA 発現

培養好中球の各種ケモカイン mRNA 発現を Real time PCR 法にて検討した。

3) 培養上清中への MIP-1 β 分泌の検討

培養上清中の macrophage inflammatory protein (MIP)-1 β を ELISA 法 (Quantikine Human MIP-1 β immunoassay) で測定した。

4) ヒト樹状細胞の培養

ヒト樹状細胞は正常ボランテアの末梢血より、末梢血単核細胞 (PBMC) を Ficoll-Paque 勾配遠心分離によって単離後 1 時間培養し、接着細胞 (adherent cell) のみを分離した。この接着細胞を GM-CSF と IL-4 で 6 日間培養後、LPS で 1 日培養して樹状細胞とした。この細胞は CD83 陽性であり樹状細胞であることが確認された。

5) ノーザンプロット法および Real time PCR

回収された好中球から RNA を抽出し、ノーザンプロット法で MIP-1 β の mRNA の発現を確認した。Real time PCR で、各コーティングデッシュ上で培養した好中球の MIP-1 β の発現を検討した。

6) ラミニンへの接着

ラミニンへの接着に関与する接着因子の検討は、好中球を固相化ラミニン上で培養し、抗 α 1、抗 α 2、抗 α 6 抗体を添加して接着阻止がおこるかどうかが検討した。

7) トランスウエル・チャンバー・アッセイ

各種培養上清をチャンバー下室へ、樹状細胞をチャンバー上室へ入れ 4 時間培養後、下室側へ遊走してきた樹状細胞を顕微鏡でカウントし、各種培養上清の樹状細胞遊走刺激能を検討した。また樹状細胞の遊走が抗 MIP-1 β 抗体で阻止されるか否かも検討した。

【結果】

1. MIP-1 β の mRNA 発現量はラミニン、マトリゲルで培養した好中球で有意に高かった。
2. ラミニンへの接着因子を検討したところ、好中球のラミニンへの接着は抗 α 6 抗体にて抑制された。同時に好中球の MIP-1 β の mRNA 発現量も抗 α 6 抗体にて抑制された。
3. 好中球は α 6 を発現していた。
4. MIP-1 β の分泌量はアガロース 80 p g/m l、フィブロネクチン 75 p g/m l、ラミニン 250 p g/m l、マトリゲル 200 p g/m l で、ラミニン、マトリゲル下で培養した好中球の培養上清が有意に高かった。
5. ラミニン、マトリゲルで培養した好中球の培養上清で樹状細胞の遊走が有意に高かった。
6. 樹状細胞の遊走は抗 MIP-1 β 抗体で阻止された。

【考察】

血管内腔から炎症組織へ遊走してくる好中球は、血管内から血管外へ移動する為には血管内皮細胞と血管基底膜を通過しなければならない。その際、血管基底膜中の各種の細胞外マトリックス蛋白と接着しながら移動する。従来報告では、好中球は感染局所に移動した後 LPS 等の細菌由来の物質によって刺激されて MIP-1 β を分泌するとされてきた。しかしながら、好中球の寿命は数時間と短命であり、感染局所に移動する前に何らかのケモカインを産生して遊走カスケードを動かすほうが生体防御においては有利であると考えられる。また、実際の生体内でも各種の免疫応答細胞の遊走カスケードが働いていることを考えると、生体内でも同様の現象が起こっていると推測できる。本研究の結果は、好中球が血管外へ移動する際、血管基底膜に含まれるラミニンと接着し、MIP-1 β を分泌しているという可能性を示し、感染局所に移動する前に好中球が樹状細胞の遊走を刺激するケモカインを産生している可能性を示唆した。この結果より好中球が非特異的免疫応答から特異免疫応答への橋渡し役を担っている可能性が示唆された。

【結語】

好中球は血管基底膜中に特異的に存在する細胞外基質タンパクであるラミニンと接着することにより、MIP-1 β の mRNA の発現が亢進し、MIP-1 β を分泌した。さらに分泌された MIP-1 β は樹状細胞の遊走を促進すると考えられた

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 村 雅 寛

副 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 武 蔵 学

学 位 論 文 題 名

Neutrophils secrete MIP-1 β after adhesion to laminin contained in basement membrane of blood vessels.

(血管基底膜中のラミニンへ接着した好中球は MIP - 1 β を分泌する)

好中球は微生物、特にバクテリアに対する免疫応答において非特異的な反応を担う重要な細胞であり、炎症局所で細菌の LPS などの刺激でケモカインを産生することが知られている。しかし、好中球は非常に短命であり、炎症局所に到達する前に別の細胞を遊走刺激するケモカインを産生する方が、より効率的に免疫担当細胞への遊走カスケードを作動させ得ると推測される。そこで、好中球が血管内腔から基底膜を通過する際、基底膜に特異的に含まれるラミニンとの接着で好中球のケモカイン産生が亢進すると考えた。予備実験として好中球が細胞外基質タンパクであるフィブロネクチン、ラミニン、マトリゲルに接着後、好中球のケモカイン発現 (MIP-1 α 、MIP-1 β 、IL-8、ENA78、MCP1 など) を RT-PCR で検討し、好中球のラミニン接着後の MIP-1 β の発現が認められたため、その詳細な解析を行った。好中球が各細胞外基質タンパクへ接着後、好中球の MIP-1 β mRNA の発現を real time PCR 法で検討した結果、ラミニン、マトリゲルとの接着でその発現は高く、発現亢進はラミニン接着 10 分後から認められ、また、ノーザンブロット法でもマトリゲル存在下では、好中球の MIP-1 β mRNA の発現亢進が示された。次に、MIP-1 β 発現にいたる好中球のラミニン接着に使用される接着分子の同定を抗 VLA 抗体存在下で adhesion assay にて比較検討したところ、ラミニンおよびマトリゲルでの接着率が抗 $\alpha 6$ 抗体で強く抑制され、抗 $\alpha 1$ 抗体では抑制されないこと、ラミニン接着後の好中球 MIP-1 β mRNA の発現は抗 $\alpha 6$ 抗体で阻害されること、抗 $\alpha 1$ および抗 $\alpha 2$ 抗体では発現低下の認められないことが示された。また、フローサイトメトリーで約 20% の好中球細胞表面に $\alpha 6$ の発現が確認された。次に、各細胞外基質タンパクにおける好中球 MIP-1 β タンパク産生を ELISA 法で比較検討し、ラミニン接着後の MIP-1 β のタンパク産生亢進を確認した。次に、産生された MIP-1 β がヒト樹状細胞の遊走を刺激するかどうかを各細胞外基質タンパク下で好中球を培養した上清を用い、トランスウェル・チャンパー・アッセイで比較検討した結果、遊走してきた樹状細胞数はラミニン、マトリゲルで高く、それらは抗 MIP1 β 抗体で阻止された。以上より、好中球は血管基底膜中に含まれるラミニンへ $\alpha 6 \alpha 1$ を用いて接着し、接着後 MIP-1 β を産生し、樹状細胞の遊走を刺激することが結論付けられた。これらの結果より、

好中球は血管外に遊走する際、基底膜中のラミニンと接着して MIP-1 β を産生し樹状細胞の血管外への遊走を刺激し、非特異的免疫応答から特異的免疫応答への媒介役として働いている可能性が示唆された。さらに、G-CSF 投与はこれら非特異的および特異的免疫応答を修飾すると考えられた。

口頭発表後、副査の武蔵学教授より、ラミニン単独の濃度とマトリゲル中のラミニンの濃度について、ヒト樹状細胞が炎症局所へ MIP-1 β で遊走後にその局所濃度が高いまま、どのようにして所属リンパ節へ移動するのかについて質問があった。これに対して申請者は、ラミニンのコーティング濃度が 20 μ g/ml に対し、マトリゲルは 1mg/ml でコーティングしマトリゲル中の約 50%にラミニンが含まれていると回答した。ヒト樹状細胞の所属リンパ節への移動に関しては、その細胞がバクテリアを貪食後あるいは抗原提示の段階で MIP-1 β のレセプターの発現低下がおり、所属リンパ節から産生される他のケモカインによって所属リンパ節へ移動する可能性を示した。次に、副査の浅香正博教授より、抗 α 6 抗体の特異性、 α 1 や α 6 は分子特性、ラミニンは量依存性に MIP-1 β を発現亢進するのか、セレクトインの検討の有無、MIP-1 β の臨床応用の可能性について質問があった。これに対し申請者は抗 α 6 抗体が VLA6 に対する抗体であり、 α 1 や α 6 はインテグリンファミリーに属する接着分子であること、またラミニンの量依存性に関してはコーティング濃度を段階的に調整して実験は行っていないものの、今回のラミニンとマトリゲルの比較からは量依存性ではないと考えられること、セレクトインと好中球の接着におけるケモカインの発現に関しては、今回検討はしていないが、証明するためにはセレクトインをコーティングしたディッシュで好中球を培養し同様に MIP-1 β の mRNA の発現とタンパク産生の検討が必要であること、G-CSF 投与により免疫応答を増強できる可能性を示した。次に、主査の今村雅寛教授より自験例もしくは文献的に G-CSF で好中球の MIP-1 β の発現亢進があるかどうか、MIP-1 α や MCP1 など他のケモカインの検討、ケモカインで遊走された好中球の negative feed back 機構、好中球 MIP-1 β mRNA の発現亢進持続の意義、抗 α 6 抗体のみが好中球のラミニンへの接着を阻害し、また MIP-1 β の mRNA 発現を抑制している理由について質問があった。これらに対し申請者は、自験例で G-CSF による好中球の MIP-1 β の発現が確認されていると、他のケモカインに関しては、RT-PCR による予備実験で MIP-1 α や MCP1 は発現亢進が認められなかったこと、negative feed back 機構については貪食されるバクテリアなどがなくなり炎症の沈静化に伴って negative feed back の誘導が予想されること、好中球 MIP-1 β mRNA の発現亢進持続の意義は明確な回答はできないが mRNA の分解遅延が起きている可能性があること、抗 α 6 と抗 α 1 抗体は共にラミニンの接着を阻害するが、抗 α 1 抗体は他にコラーゲン IV にも親和性があり、抗 α 6 抗体の方が抗 α 1 抗体よりラミニンに対して特異性の高いことが予想されると回答した。

本研究は感染における免疫応答機構には、好中球の MIP-1 β の関与が重要であることを複数の実験系で証明した点で高く評価され、今後さらなる研究により、様々なケモカインと免疫応答機序の解明が期待される。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。