

---



---

 原 著
 

---



---

## Pentraxin 3 の潰瘍性大腸炎での発現と 好中球における動態に関する研究

井 上 聡

新潟大学大学院医歯学総合研究科

消化器内科学分野・肝臓病学分野

(指導：青柳 豊教授)

### The Expression of the Pentraxin 3 in Ulcerative Colitis and the Behavior of the Pentraxin 3 in Neutrophils

Akira INOUE

*Division of Gastroenterology and Hepatology,**Niigata University Graduate School of Medical and Dental Science**(Director: Prof. Yutaka AOYAGI)*

## 要 旨

Pentraxin 3 (以下 PTX3) は共通する C 末端 domain (pentraxin domain) を有する superfamily の一員である。炎症や免疫において重要な役割を担い、IL-1 $\beta$  などの炎症性シグナルに反応して、炎症局所においてマクロファージや好中球、血管内皮細胞など種々の細胞から産生されることが知られており、炎症を鋭敏に反映する。本研究では抗ヒト PTX3 抗体を用いて、潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis, 以下 UC) の組織を免疫組織学的に検討して UC における PTX3 発現細胞を同定し、組織学的な炎症の重症度と PTX3 の関係について検討するとともに、更に好中球における PTX3 の動態について観察した。UC の大腸生検検体 7 症例 (30 検体) と、正常対照 3 症例 (5 検体) を検討した。UC の炎症の重症度は組織学的に 3 段階に分類し、抗 PTX3 抗体や CD15, CD68, CD163, MSR-A, CD3 の各抗体を用いて免疫染色した。その結果 UC においては炎症の組織学的な重症度が高いほど好中球を主とする PTX3 陽性細胞が増加し、PTX3 の発現は炎症の程度を反映することが示された。また、*in vitro* の実験系で蛍光染色や電子顕微鏡を用いて観察すると、PTX3 は好中球の特殊顆粒内に局在し、炎症刺激によって好中球から放出され、炎症刺激によって形成された neutrophil extracellular traps (NETs) に結合することが確

Reprint requests to: Akira INOUE  
Division of Gastroenterology and Hepatology  
Niigata University Graduate School of Medical  
and Dental Science  
1-757 Asahimachi-dori Chuo-ku,  
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757  
新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器内科学分野・  
肝臓病学分野 井上 聡

認められた。NETsはUCの陰窩膿瘍にも観察され、PTX3の動態は好中球の運命と密接に関与することが明らかになった。

キーワード：Pentraxin 3, 潰瘍性大腸炎, 好中球, Neutrophil extracellular traps (NETs)

## 緒 言

PentraxinはC末端に約200個のアミノ酸から成るPentraxin domainと呼ばれる共通の環状構造を持つ蛋白質のsuperfamilyである。short pentraxinsとlong pentraxinsの2つに大別され、short pentraxinsにはC reactive protein (CRP)やserum amyloid P (以下SAP)が含まれる。CRPは、主にIL-6などの炎症性メディエーターに反応して肝細胞で産生される<sup>1)</sup>。これらは動物や人間の初期免疫において、急性相反応蛋白として重要な役割を担っている。

Long pentraxinsはpentraxin domainの他にunrelated N terminal domainを有し、PTX3はlong pentraxinsのprototypeとされている。PTX3はIL-1 $\beta$ やTNF $\alpha$ などの炎症性シグナルやToll-like receptor (TLR) agonistに反応して、炎症局所組織において、好中球、マクロファージ、樹状細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞、脂肪細胞など種々の細胞で発現する。PTX3はC1qと結合して補体の古典的回路を活性化し、特定の真菌や細菌、ウイルスをオプソニン化することで微生物の認識を容易にして、サイトカインの産生など初期免疫を活性化させる<sup>2)</sup>。

血液細胞においては、単球のみがPTX3 mRNAを発現し、リンパ球や好中球は発現しない<sup>3)</sup>。好中球では、PTX3は特殊顆粒内に貯蔵されており、微生物を認識するとすぐに細胞外に放出する準備状態にある<sup>4)</sup>。CRPは炎症刺激6時間後に血中濃度が上昇し、48時間でピークを迎えるのに対し、PTX3はより迅速に血中濃度が上昇する。ST上昇を伴う急性心筋梗塞の場合、PTX3血中濃度は6時間でピークを迎える<sup>2)</sup>。炎症刺激により活性化された好中球は、細胞外にneutrophil extracellular traps (NETs)と呼ばれる線維状の構造物を形

成する場合があります、これは真菌や細菌などの微生物を捕捉してその弱毒化や殺菌に働くが、細胞外に放出されたPTX3もこのNETsに局在するとの報告がある<sup>4)</sup>。

PTX3は鋭敏に炎症を反映することから、これまで急性心筋梗塞<sup>5)</sup>や敗血症<sup>6)</sup>、肺結核<sup>7)</sup>などの診断に応用する可能性が模索されてきた。また、様々な炎症組織での発現が免疫組織学的に明らかにされつつあるが<sup>8)</sup>、潰瘍性大腸炎(以下UC)における検討は一編のみである<sup>9)</sup>。

本研究では新たに作製された抗ヒトPTX3抗体を用いてUCの組織を免疫組織学的に検討し、UCにおけるPTX3発現細胞を同定し、大腸の組織学的な炎症の重症度とPTX3の関係について検討した。さらに血液細胞を用いて、好中球におけるPTX3の局在と動態について観察した。

## 材料と方法

### 1. 検討対象

新潟大学医歯学総合病院において、2003年から2008年の間にUCと診断された大腸生検検体7症例、30検体(男性3例、女性4例、平均54.1 $\pm$ 13.8歳、全大腸炎型3例、左側大腸炎型1例、遠位大腸炎型1例、直腸炎型2例)と、正常対照例として腺腫の経過観察目的のため大腸内視鏡検査を施行され、Group 1相当で特異的所見なしと診断された3症例、5検体(男性2例、女性1例、平均62 $\pm$ 4.3歳)を用いた(表1)。

Sutherlandらの疾患活動性分類(Ulcerative colitis disease activity index, 以下UC-DAI)<sup>10)</sup>に基づいてUC症例の疾患活動性を評価すると、軽症2例、中等症4例、重症1例であった。7例中5例は無治療のUCであり、他の2例はいずれも5-アミノサリチル酸製剤とプレドニゾン、免疫

表1 検討対象

	UC	NC
Case	7	3
Age	54.1±13.8	62.0±4.3
Sex(M/F)	3/4	2/1
Type of UC		
Proctitis	2	-
Left/rectosigmoid	2	-
Pancolitis	3	-

抑制剤を投与されていた。

生検検体は、ホルマリン固定、パラフィン包埋した後、薄切して hematoxylin eosin 染色を行った。この標本を1名の病理医により、Matts の分類<sup>11)</sup>に従って検体ごとに組織学的な炎症の程度を5段階に分類した。更に、Matts 分類の1と2に相当するものを grade 1, Matts 分類の3に相当するものを grade 2, Matts 分類の4と5に相当するものを grade 3 として、独自に分類した。

## 2. 一次抗体

抗ヒト PTX3 抗体 (clone. PPZ1228, Perseus Proteomics, Tokyo) は100倍希釈, マウス抗ヒト CD15 モノクローナル抗体 (clone C3D-1, Dako, Denmark) は50倍希釈, 抗ヒト CD68 モノクローナル抗体 (clone KP1, Dako, Denmark) は2000倍希釈して使用した。マウス抗 CD163 モノクローナル抗体 (clone 10D6, Novocastra, UK) は100倍希釈, 抗ヒトマクロファージスカベンジャーレセプター A (MSR-A: CD204) モノクローナル抗体 (clone No SRA-E5, Trans Genic Inc, Japan) は100倍希釈, マウス抗 CD3 モノクローナル抗体 (clone PS1, Novocastra, UK) は30倍希釈, マウス抗 CD34 モノクローナル抗体 (clone QBEnd/10, Novocastra, UK) は50倍希釈して使用した。

## 3. ウェスタンブロット法

材料として健康な供血者から得られた好中球を用いた。全血7ccを Mono-poly resolving medium (DS Pharma Biomedical Co, Ltd., Japan) に重層して遠心すると、第一層は単核球、第二層は好中球として分離され、 $2.4 \times 10^6$  cells/ml の好中球が得られた。

得られた好中球を溶解し、既報の方法<sup>13)</sup>に従って抗 PTX3 抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った。陽性対照として組換え蛋白 (PTX3-MH) を使用した。

## 4. 免疫組織化学

ホルマリン固定、パラフィン包埋した組織を薄切し、オートクレーブ処理 (121°C, 15分) によって抗原を賦活化して免疫染色を行った。前記の一次抗体に反応させた後、二次抗体としてヒストファインシンプルステイン MAX-PO (MULTI) (Nichirei, Tokyo) を使用して酵素標識ポリマー法 (間接法) にて染色し、発色には 3,3'-diaminobenzidine (Nichirei, Tokyo) を用いた。

二重染色では、第一抗体として抗ヒト PTX3 抗体を用いて一度免疫染色を施行し DAB 発色をした後、再びオートクレーブ処理 (121°C, 15分) を行い、次に第二抗体 (CD15, CD68, CD163, CD3, CD34) を用いて免疫染色を施行し、Vector VIP (Vector Laboratories Inc, USA) で発色した。

## 5. 蛍光染色

### 1) 好中球

ウェスタンブロット法と同様の方法で健常人の末梢血から好中球を分離し、RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich Corp., USA) で洗浄して好中球浮遊液を作成した。採取直後に好中球浮遊液を1000rpm, 1分間でスライドガラスに遠心沈殿し、4% Paraformaldehyde/PBS で固定して蛍光染色を施行した。また、Poly-L-lysine 液 (Sigma-Aldrich Corp., USA) でコートしたチャンバースライドに好中球浮遊液を入れ、炎症刺激を加える群 (炎症群) には 100ng/ml の IL-8 (R & D Systems, Inc., Minnesota, USA) を加えて 37°C で

40分間培養し、炎症刺激を加えない群(非炎症群)には同量の蒸留水を加えて同様に40分間培養し、経時変化を蛍光染色で観察した。

蛍光染色の一次抗体として抗ヒトPTX3抗体(clone PPZ1228)、好中球の指標としてマウス抗好中球エラストーゼ抗体(clone SPM205, Abcam Plc, UK)を、好中球細胞質内の特殊顆粒の指標としてウサギ抗ラクトフェリンポリクローナル抗体(Abcam Plc, UK)を用いた。二次抗体としてはAlexa Fluor 488 anti-mouse IgG, F(ab')<sub>2</sub>(Invitrogen, USA)、Alexa Fluor 568 anti-mouse IgG1(γ1)(Invitrogen, USA)、Alexa Fluor 568 anti-rabbit IgG, F(ab')<sub>2</sub>(Invitrogen, USA)を用いた。ProLong Gold antifade reagent(Invitrogen, USA)で封入する場合はHoechst 33342(Invitrogen, USA)で核染色を行い、それ以外はVECTASHIELD Mounting Medium with DAPI(Vector Laboratories Inc, USA)で封入した。観察には共焦点レーザー顕微鏡LSM 510 ver. 4.0(Carl Zeiss Co., Ltd., Germany)を用いた。

## 2) 大腸組織

パラフィン包埋されたUCの生検検体を薄切し、脱パラフィンした後にオートクレーブ処理(121℃, 15分)し、一次抗体としてウサギ抗ラクトフェリンポリクローナル抗体(Abcam Plc, UK)を、二次抗体としてAlexa Fluor 568 anti-rabbit IgG, F(ab')<sub>2</sub>(Invitrogen, USA)を用いて蛍光染色を行った。VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI(Vector Laboratories Inc, USA)で封入し、観察した。

## 6. 走査型電子顕微鏡(SEM)

上述の方法で健常人の末梢血から好中球を分離し、RPMI 1640(Sigma-Aldrich Corp., USA)で洗浄して好中球浮遊液を作成した。まず無菌のThermanox™ tissue culture cover slipsを35mmのディッシュ内に置き、Poly-L-lysine液(Sigma-Aldrich Corp., USA)でコーティングした。これを2個準備して、それぞれに好中球浮遊液を入れた。一方は炎症群として100ng/mlのIL-8(R & D Systems, Inc., Minnesota, USA)を加えて37℃の

保温庫で40分間培養し、他方は非炎症群として同量の蒸留水を加えて同様に培養した。その後浮遊液を除去してからPBSで洗浄し、2%グルタルアルデヒドで固定した。これを1%タンニン酸と1%四酸化オスミウムで固定した後にエタノールで脱水し、酢酸イソアミルを経て液体二酸化炭素を使った臨界点乾燥器で乾燥した。イオンコーターを用いてプラチナパラジウムによる金属コーティングを施し、走査電子顕微鏡(S-4300, Hitachi, Japan)で観察した。

## 7. 統計解析

統計解析には、Kruskal-Wallisの順位検定、Bonferroni補正Mann-WhitneyのU検定とSpermannの順位相関を用い、p < 0.01を有意差ありとした。

## 結 果

### 1. 抗ヒトPTX3抗体の特異性について

CHO細胞から得られたリコンビナントPTX3の抗ヒトPTX3抗体(clone PPZ1228)を用いたウエスタンブロット解析では、45kDaと90kDaに明瞭なバンドが検出され、40kDaにも薄いバンドが認められた。また、新鮮血好中球の溶解物のウエスタンブロット解析でも、ほぼ45kDaに一致してバンドが検出され、本抗体の特異性が確認できた。

### 2. 組織学的炎症と内視鏡所見の対比

UC検体については、前述の通りに組織学的炎症の程度をgrade 1~3の3段階に分類した。さらに各検体採取部位についてその内視鏡像を確認し、Mattsの内視鏡分類<sup>11)</sup>に従って内視鏡的肉眼像の重症度を4段階に分類した。それらの対比は表2に示すとおりで、内視鏡分類でgrade 1あるいは4に相当する検体は組織学的分類でもgrade 1あるいは3に相当しており、組織学的炎症の重症度は内視鏡的所見からも推測できた。また、内視鏡分類でgrade 2あるいは3の軽症、中等症の検体は、組織学的分類でもgrade 2から3

表 2 組織学的炎症所見と内視鏡所見

Endoscopic Mats' grade	1	2	3	4
Histological grade 1	10	0	0	0
2	0	6	4	0
3	0	1	7	2

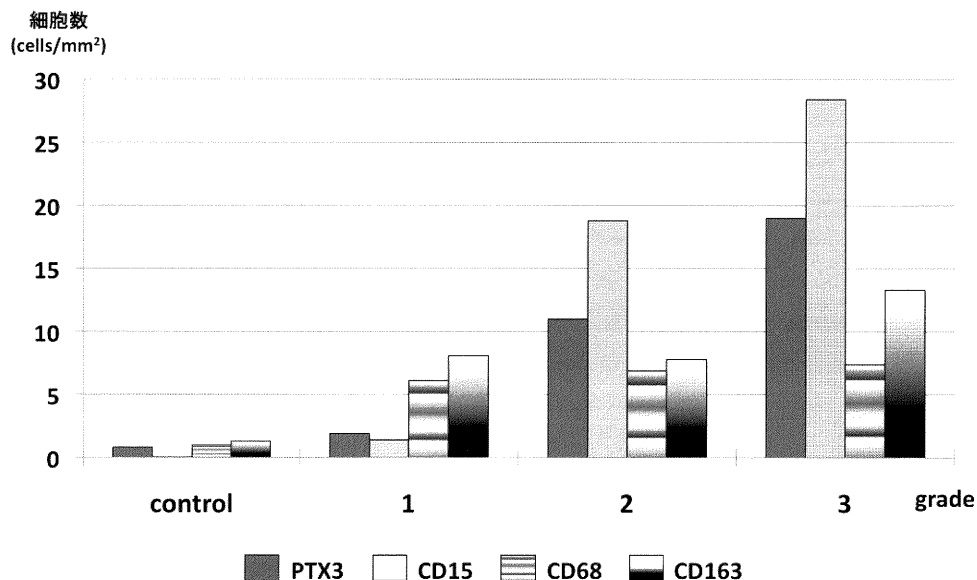


図 1 組織学的炎症 grade 毎の各抗体陽性細胞数

PTX3 と CD15 の陽性細胞数は、組織学的炎症の grade が上がるにつれて 1 視野毎の陽性細胞数が増加した。マクローファージ指標抗体 (CD68, CD163) では、正常対照例よりも UC で陽性細胞数が多かったが、grade 1 と 2 では有意差を認めなかった。

に相当しており、内視鏡的肉眼像は組織学的炎症の重症度を反映していた。

### 3. 免疫組織化学

大腸の生検検体には、殆どの場合粘膜下層より深い部分は採取されておらず、本研究では粘膜固有層までの評価を行った。同一検体に PTX3, CD15, CD68, CD163, MSR-A および CD3 に対

する抗体を用いて免疫染色し、PTX3 発現細胞、好中球、マクローファージ、リンパ球 (T 細胞) の分布を確認した。また、各検体につき無作為に 1 ~ 9 視野 (平均 6.1 視野) を選び、視野毎に各々の抗体の陽性細胞数を算定した (図 1)。

PTX3 陽性細胞は、正常対照例では粘膜固有層に少数見られたのみであった。UC 症例でも組織学的炎症 grade 1 では、少数の PTX3 陽性細胞が

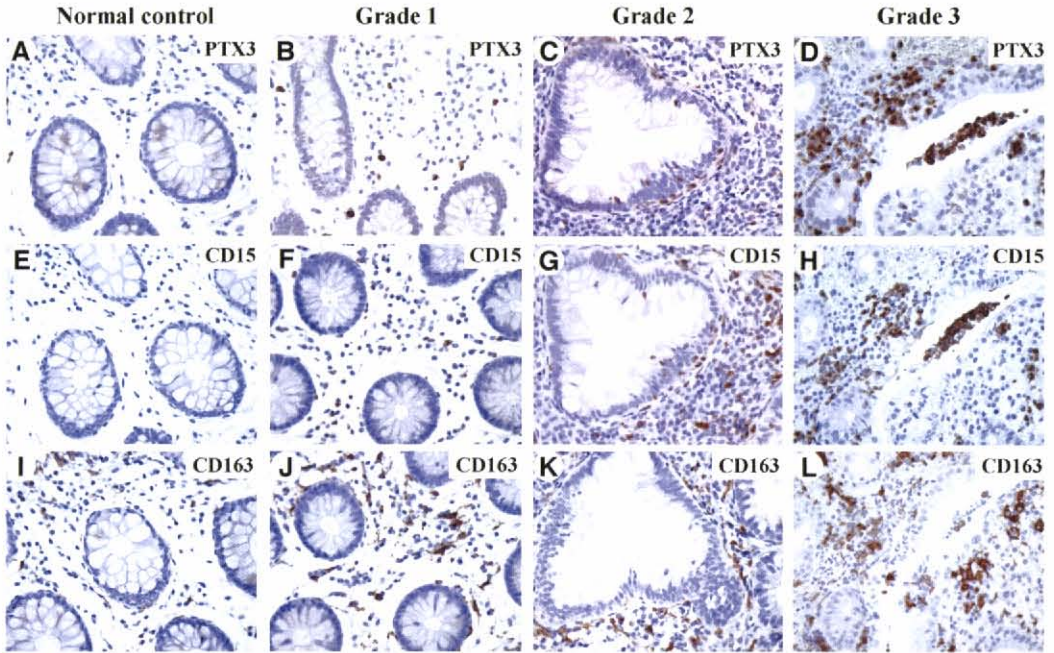


図2 組織学的炎症 grade 別の PTX3, CD15, CD163 陽性細胞

PTX3 (A～D)：正常対照例や grade 1 では陽性細胞が少数見られるのみであるが，Grade 2 では明らかに増加し，grade 3 では陰窩膿瘍内も含めて多くの陽性細胞を認める。

CD15 (E～H)：正常対照例では陽性細胞が少なく，炎症の grade が上がると陽性細胞が増えている。陰窩膿瘍内で多数の陽性細胞を認める。

CD163 (I～L)：正常対照例に比して UC では陽性細胞が多い。  
(免疫染色，×200)

見られるのみで，正常対照例と著変はなかった。しかし grade が上がるにつれて陽性細胞数は有意に多くなり，grade 3 では多数の陽性細胞が見られた(図2)。陽性細胞は主に好中球であり，マクロファージも陽性像を呈した。Grade 3 では，陰窩上皮細胞間に侵入している好中球や，陰窩膿瘍内に存在する好中球にも PTX3 の発現が観察された。リンパ球や形質細胞，血管内皮細胞には明確な PTX3 の発現は確認出来なかった。

正常対照例では CD15 陽性細胞は少なかった。UC の grade 1 では CD15 陽性細胞が散見され，grade の上昇につれて陽性細胞は有意に増加した。

陰窩膿瘍や陰窩炎における好中球にも CD15 の発現が確認された(図2)。陰窩膿瘍内好中球の中には，多核ではなく円形の核を呈する細胞も観察された。

CD68, CD163, MSR-A などのマクロファージ指標抗体を用いた免疫染色では，正常対照例の粘膜上皮，粘膜固有層表層付近に陽性細胞が散見された。UC では正常対照例よりも陽性細胞が多く，炎症の重症度が上がるにつれて陽性細胞数が増加する傾向が見られ(図2)，視野毎の陽性細胞数は grade 3 では有意に多かった。しかし grade 1 と 2 では有意差を認めなかった。

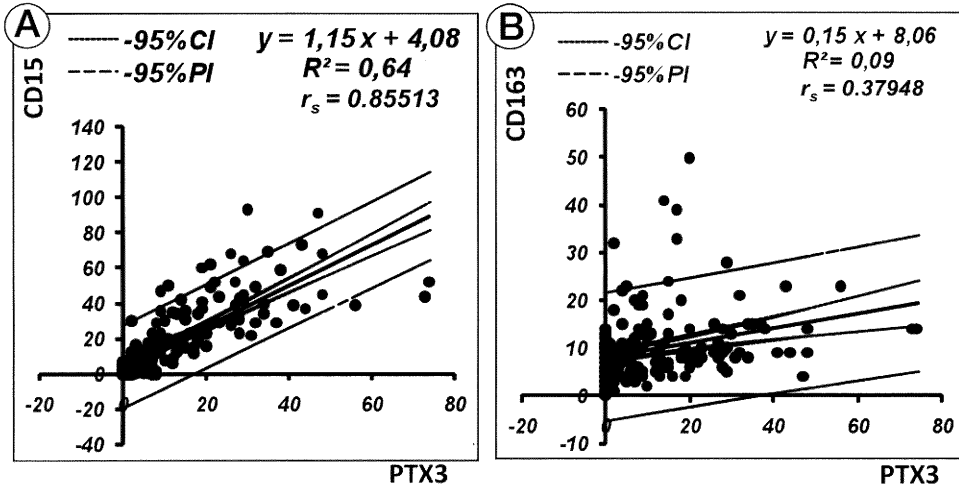


図3 PTX3とCD15, CD163陽性細胞数の相関

- A：各視野毎におけるPTX3とCD15の陽性細胞数の相関。有意な正の相関関係を認め ( $P < 0.01$ )、相関係数も大きく強い相関関係を示す ( $r_s = 0.85513$ )。
- B：各視野毎におけるPTX3とCD163の陽性細胞数の相関。有意な正の相関関係を認めるが ( $P < 0.01$ )、相関係数は小さい ( $r_s = 0.37948$ )。

Tリンパ球の指標となるCD3陽性細胞に炎症の程度に応じた差異は見られず、視野毎の陽性細胞数の比較ではgrade 1と2の間に有意差を認めるのみだった。

PTX3陽性細胞数と他各種抗体の陽性細胞数を比較してみると、PTX3とCD15, CD68, CD163, MSR-Aとの間で陽性細胞数の相関が見られ、特にPTX3とCD15間で強い相関が認められた(図3)。

二重染色では、PTX3とCD15の二重陽性細胞が多く観察された(図4A)。組織学的炎症grade 3のUC粘膜固有層10視野の計211細胞について検討したところ、PTX3・CD15二重陽性細胞は118細胞(55.9%)で、PTX3単独陽性は71細胞(33.6%)、CD15単独陽性は22細胞(10.4%)であった。陰窩膿瘍内ではさらに二重陽性細胞の比率は増加し、陰窩膿瘍3視野の計62細胞についての検討では、44細胞(71%)がPTX3・

CD15二重陽性、9細胞(14.5%)がPTX3単独陽性、9細胞(14.5%)がCD15単独陽性であった。

また、PTX3とCD68やCD163との検討では、二重陽性細胞は少数散見されたが、PTX3・CD3, PTX3・CD34二重陽性細胞は殆ど見られなかった(図4B)。

#### 4. 蛍光染色

##### 1) 新鮮好中球

新鮮な好中球の細胞質内に顆粒状にPTX3やneutrophil elastase, lactoferrinが染色された。二重染色ではPTX3とlactoferrinとの局在が一定の割合で一致し(図5A)、PTX3とlactoferrinが特殊顆粒に局在していることが示唆された。

##### 2) 炎症刺激による好中球の変化

IL-8なしに40分間培養した非炎症群の好中球では、細胞質内のPTX3の染色性は新鮮好中球と著変を認めなかった。IL-8を添加した炎症群好

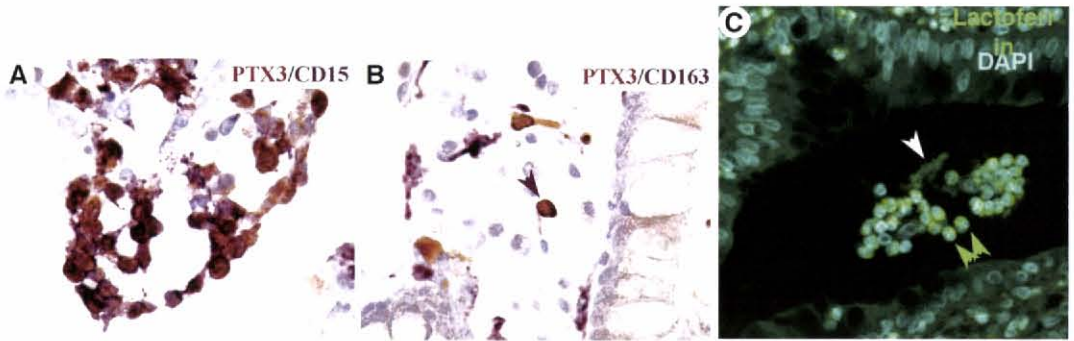


図4 大腸組織内細胞の免疫染色

- A: 陰窩膿瘍の免疫二重染色像 (×500). PTX3 (茶色) と CD15 (紫色) に染色された多数の二重陽性細胞を認める.
- B: UC 組織の二重染色像 (×500). PTX3 (茶色) と CD163 (紫色) に染色された二重陽性細胞は少数認めるのみ (矢印).
- C: UC の陰窩膿瘍における蛍光染色像 (×500). Lactoferrin を含む好中球が膿瘍内に認められ (緑矢印), その周囲に NETs と考えられる網状構造物を認める (白矢印).

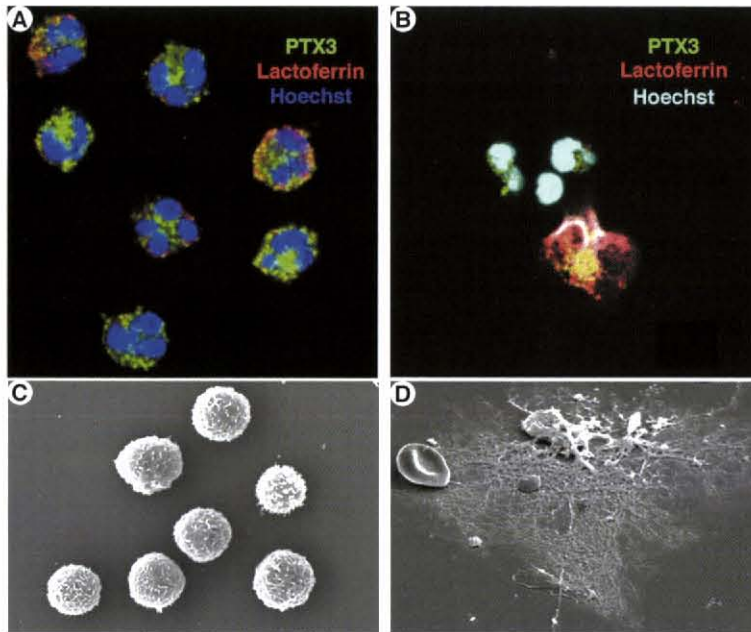


図5 好中球の蛍光染色と電顕像

- A: 新鮮好中球の蛍光染色 (×1000). PTX3 (緑) と lactoferrin (赤) の蛍光局在がほぼ一致し, PTX3 と lactoferrin が特殊顆粒に局在する.
- B: IL-8 添加群好中球の蛍光染色 (×500). 核 (水色) の周囲にわずかに PTX3 (緑) が残る細胞が見られる. また, PTX3 や lactoferrin (赤), 核 (DNA) が共局在 (白色) する NETs と考えられる構造物を認める.
- C: IL-8 非添加群好中球の走査電顕像 (×1000).
- D: IL-8 添加群好中球の走査電顕像 (×1000). 周囲に網状構造物を伴って破壊されている.



表 3 IL-8 刺激の有無による好中球の PTX3 発現と核型の差異

		PTX3(-) cells		PTX3(+) cells		
		polymorphic nucleus	round shape nucleus	polymorphic nucleus	round shape nucleus	
IL-8(-)	total	18	15	473	0	506
	%	3.56%	2.96%	93.48%	0.00%	100%
IL-8(+)	total	22	110	381	0	513
	%	4.29%	21.44%	74.27%	0.00%	100%

中球では、PTX3 陽性細胞が減少していた。また、PTX3 陰性細胞には円形核を呈しているものが多かった。

炎症群と非炎症群好中球をそれぞれ約 500 個観察し、核の形態と PTX3 の発現の有無を観察した(表 3)。多形核の PTX3 陰性細胞は両群ともに同程度認められた。円形核の PTX3 陰性細胞については非炎症群でも 2.96%認められたが、炎症群においては 21.44%と増加していた。一方多形核 PTX3 陽性細胞は、非炎症群で 93.48%、炎症群で 74.27%であり、炎症群で増加していた円形核 PTX3 陰性細胞は PTX3 放出後の細胞であると考えられた。多形核 PTX3 陰性細胞は見られなかった。

炎症群では核 (DNA) を染める Hoechst 33342 に染まる小さな網状構造物が散在し、NETs (neutrophil extracellular traps) が形成されているものとみなされた(図 5B)。PTX3 の局在がそれと一致していることから、特殊顆粒の PTX3 が NETs に付着したものと考えられた。

### 3) 大腸組織

UC の大腸組織の蛍光染色では膿瘍内に集簇した好中球の周囲に、DAPI で染色される網状構造物が観察され、lactoferrin との共局在が確認されたことから NETs が UC 病変内に形成されたことが示唆された(図 4C)。

## 5. 走査型電子顕微鏡 (SEM)

非炎症群では、好中球は表面に多数の突起を有

する球体として観察された(図 5C)。炎症群では cover slip に付着している好中球は減少しており、分断されアポトーシスに陥った細胞や種々の変形細胞が観察され、更にその周囲に網状の構造物を伴って変形・破壊された好中球が散見され、NETs であると考えられる網状構造物が観察された(図 5D)。NETs 様構造は非炎症群でもごく少数見られたが、明らかに炎症群に多かった。NETs には混入した赤血球や血小板が捕捉されている像も観察された。

## 考 察

UC は再燃と寛解を繰り返しながら慢性に経過する炎症性腸疾患であり、免疫学的異常や遺伝的素因、環境因子などの関与が推定されているが、未だに原因は不明である<sup>13)14)</sup>。主として大腸粘膜が障害されるが、炎症が強い場合には固有筋層などより深部への炎症細胞浸潤や潰瘍形成も見られ、好中球が目立つことが特徴の一つである。本研究ではまず UC の大腸粘膜固有層において、炎症の強弱に応じてどのような種類の炎症細胞が浸潤してくるのかを免疫組織学的に検討した。その結果、CD15 陽性の好中球が炎症の程度に応じて有意に増加することが明らかとなった。マクロファージについては炎症が強まると増加する傾向はみられたものの、全 grade 間で有意差はなかった。T 細胞は grade 2 で最も数が多く、grade 1 と 2 の間では有意差を認めたが、grade 3 との間には有

意差を認めなかった。CD3陽性細胞数が grade 3 よりも grade 2 で多かったのは、炎症が強まると好中球の浸潤が強まり、相対的にリンパ球の浸潤が少なくなるためと推察された。

Kato らは UC の大腸炎症粘膜の免疫組織化学的検討において、血管内皮細胞や浸潤細胞に PTX3 の発現が強く、また膿瘍内の好中球にも PTX3 が発現すると報告した<sup>9)</sup>。PTX3 は好中球、マクロファージ、単球、樹状細胞、血管内皮細胞など種々の細胞から産生されることが知られているが、本研究において UC の大腸組織では主に好中球に発現し、マクロファージはその一部に発現を認めたのみで、血管内皮細胞には明らかな発現は認めなかった。また UC の大腸組織では、炎症の増強に応じて PTX3 陽性好中球が増加することが明らかとなった。

UC は好中球浸潤が組織学的特徴である。そのメカニズムとして好中球遊走性のケモカインが病巣で産生されることが示唆されている<sup>15)</sup>。ケモカインが好中球の形態や運命にどのような影響を及ぼすかを検討するために、本研究では IL-8 を用いて好中球及び PTX3 の観察を行った。

in vitro の実験では、好中球は IL-8 の存在下において円形核を呈し、PTX3 陰性の細胞が増加した。このことから好中球は炎症刺激を受けると、PTX3 を含む特殊顆粒などを放出し、この際に核の変形を伴うものと考えられる。NETs は、炎症刺激を受けた好中球が細胞死を伴いつつ細胞内容物によって形成される網状構造物であり、自らの DNA 鎖が網状の骨格となり、そこにヒストン蛋白の他、アズール顆粒や特殊顆粒、第三次顆粒が結合する<sup>16)17)</sup>。本研究においても炎症群では壊死や apoptosis を思わせる変形好中球に加えて NETs と考えられる構造物が認められ、PTX3 もその部に局在する像が確認された。好中球からの PTX3 の放出には、核の変形を伴った脱顆粒と、細胞死に伴った NETs の形成に伴う放出の 2 通りがあるものと考えられた。

更に UC の大腸生検組織においても、膿瘍内に集簇した好中球の核の円形化と NETs 様構造物が確認され、後者には特殊顆粒の構成成分である

lactoferrin が局在した。これらの結果から、好中球は in vitro の実験系のみならず、生体内においても炎症下では核の円形化と NETs 形成をきたすことが示唆された。UC の炎症粘膜では PTX3 は主に好中球に発現していることから、好中球から放出された PTX3 は NETs の構成成分となると考えられる。好中球から放出された PTX3 が UC においてどのような役割を果たしているかについては、今後の検討が必要である。

## 結 論

UC において、炎症の組織学的な重症度が高いほど好中球を主とする PTX3 陽性細胞が増加し、PTX3 の発現は炎症の程度を反映することが示された。また、in vitro の実験系で PTX3 が炎症刺激によって好中球から放出され、NETs に結合することが確認された。生検組織でも NETs が観察され、このようなメカニズムが生体内でも存在することが示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導を賜りました新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器・肝臓病学分野 青柳豊教授、同分子細胞病理学分野 内藤真教授に深謝致します。また、本研究に関して助言・協力頂きました Alexander S. Savchenko 先生、大橋瑠子先生、姜淑英先生、長谷川剛先生、技術指導頂きました青山崇技官をはじめ教室の皆様へ深謝致します。

## 文 献

- 1) Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A and Mantovani A: Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annu Rev Immunol* 23: 337 - 366, 2005.
- 2) Mantovani A, Garlanda C, Doni A and Bottazzi B: Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3. *J Clin Immunol* 28: 1 - 13, 2008.
- 3) Alles VV, Bottazzi B, Peri G, Golay J, Introna M and Mantovani A: Inducible expression of PTX3,

- a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes. *Blood* 84: 3483 - 3493, 1994.
- 4) Jaillon S, Peri G, Delneste Y, Fremaux I, Doni A, Moalli F, Garlanda C, Romani L, Gascan H, Bellocchio S, Bozza S, Cassatella MA, Jeannin P and Mantovani A: The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *J Exp Med* 204: 793 - 804, 2007.
  - 5) Latini R, Maggioni AP, Peri G, Gonzini L, Lucci D, Mocarelli P, Vago L, Pasqualini F, Signorini S, Soldateschi D, Tarli L, Schweiger C, Fresco C, Cecere R, Tognoni G and Mantovani A: Prognostic significance of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction. *Circulation* 110: 2349 - 2354, 2004.
  - 6) Muller B, Peri G, Doni A, Torri V, Landmann R, Bottazzi B and Mantovani A: Circulating levels of the long pentraxin PTX3 correlate with severity of infection in critically ill patients. *Crit Care Med* 29: 1404 - 1407, 2001.
  - 7) Azzurri A, Sow OY, Amedei A, Bah B, Diallo S, Peri G, Benagiano M, Elios MMD, Mantovani A and Prete GD: IFN- $\gamma$ -inducible protein 10 and pentraxin 3 plasma levels are tools for monitoring inflammation and disease activity Mycobacterium tuberculosis infection. *Microbes Infect* 7: 1 - 8, 2005.
  - 8) Savchenko AS, Imamura M, Ohashi R, Jiang S, Kawasaki T, Hasegawa G, Emura I, Iwanari H, Sagara M, Tanaka T, Hamakubo T, Kodama T and Naito M: Expression of pentraxin 3 PTX3 in human atherosclerotic lesions. *J Pathol* 215: 48 - 55, 2008.
  - 9) Kato S, Ochiai M, Sakurada T, Ohno S, Miyamoto K, Sagara M, Ito M, Takeuchi K, Imaki J, Itoh K and Yabuki K: Increased expression of long pentraxin PTX3 in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 53: 1910 - 1916, 2008.
  - 10) Sutherland LR, Martin F, Greer S, Robinson M, Greenberger N, Saibil F, Martin T, Sparr J, Prokipchuk ED and Borgen L: 5-Aminosalicylic acid enema in the treatment of distal ulcerative colitis, proctosigmoiditis, and proctitis. *Gastroenterology* 92: 1894 - 1898, 1987.
  - 11) Matts SGF: The value of rectal biopsy in the diagnosis of ulcerative colitis. *Q J Med* 30: 393 - 407, 1961.
  - 12) Sakamoto A, Kawasaki T, Kazawa T, Ohashi R, Jiang S, Maejima T, Tanaka T, Iwanari H, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T and Naito M: Expression of liver X receptor  $\alpha$  in rat fetal tissue at different development stages. *J Histochem Cytochem* 55: 641 - 649, 2007.
  - 13) Podolsky DK: Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 347: 417 - 429, 2002.
  - 14) Fiocchi C: Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 115: 182 - 205, 1998.
  - 15) Ishiguro Y: Mucosal proinflammatory cytokine production correlates with endoscopic activity of ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 34: 66 - 74, 1999.
  - 16) Wartha F, Beiter K, Normark S and Normark BH: Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 10: 52 - 56, 2007.
  - 17) Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V and Zychlinsky A: Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 176: 231 - 241, 2007.

(平成 21 年 12 月 1 日受付)