

氏名	いまむら まさる 今村 勝
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博(医)第220号
学位授与の日付	平成20年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Lipopolysaccharide induced expression of Pentraxin 3 in human neutrophils and monocyte-derived macrophages (リポ多糖添加によるヒト好中球と単球由来マクロファージの PTX3 発現誘導についての研究)
論文審査委員	主査 教授 安 保 徹 副査 教授 内 山 聖 副査 教授 内 藤 眞

博士論文の要旨

Pentraxin3 (PTX3)は long pentraxin に属し、5kDa の糖鎖を含む 45kDa の単量体が多量体を形成し分泌される蛋白である。リポ多糖や tumor necrosis factor α や interleukin 1 β といった炎症性サイトカインなどの刺激により単球/マクロファージ、血管内皮細胞などの様々な細胞に発現することが知られている。一般に知られている C-reactive protein などの short pentraxin が全身の炎症を反映するのに対し、PTX3 は局所の炎症を反映するとされる。最近、PTX3 は好中球の前駆細胞で産生され、貯蔵された PTX3 が成熟好中球から分泌されることが報告された。マクロファージの分化にはマクロファージコロニー刺激因子：macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)や顆粒球マクロファージコロニー刺激因子：granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)が必須であり、M-CSF 及び GM-CSF の存在下でヒト単球から分化誘導したマクロファージ (M-M ϕ 、GM-M ϕ)は形態、機能、細胞表面マーカーの発現などが異なることが知られている。しかし、これまで好中球や M-M ϕ 、GM-M ϕ における PTX3 の発現の詳細な検討はなされていない。本研究では新規に作成された抗ヒト PTX3 抗体(clone 1228)を用いてリポ多糖(LPS)添加によるヒト単球由来マクロファージ及び好中球の PTX3 の発現について検討した。

Immunoblottingでは、recombinant PTX3の蛋白で単量体及び2量体を示す45kDaと90kDaのバンドが証明された。更に脱グリコシル化酵素により分子量が変化し糖鎖の消化が確認された。6日間培養したGM-Mφの抽出蛋白及び上清中の蛋白においても recombinant PTX3と同じ45kDaと90kDaのバンドを認め、抗体(clone 1228)の特異性が証明された。しかし、LPS24時間刺激による蛋白発現の変化は明らかではなかった。免疫染色ではM-MφとGM-Mφとも細胞質にPTX3の発現を認め、24時間LPS刺激することによりPTX3発現が増強し、GM-Mφの方がM-Mφより強く染色された。ELISAではM-MφとGM-MφともLPS刺激24時間後にPTX3分泌が増量したが、分泌量はLPS濃度による違いはなく、両Mφ間に有意差は認めなかった。以上の結果からPTX3の産生能はGM-Mφの方がやや高いが、細胞外への分泌能にはM-MφとGM-Mφに明らかな違いはないと考えられた。

健常者末梢血から分離した直後の好中球を用いて免疫染色を行ったところその細胞質に弱いPTX3の発現を認めた。RT-PCRやquantitative real-time PCRにおいても分離直後の好中球から抽出したmRNAにPTX3の発現を認めた。LPS刺激を行うとPTX3 mRNAは6時間後に発現のピークを認め、24時間後には発現が低下した。ELISAによるPTX3分泌量は6時間後と比較して24時間後の方が多く認められた。また、immunoblottingにおいても24時間後に抽出蛋白及び上清中の蛋白のPTX3の増加が確認された。以上の結果はLPS刺激によりPTX3 mRNAが誘導され、その後、PTX3蛋白が産生分泌されたことを示すものである。

急性心筋梗塞症例の血管内膜切除術で得られた動脈硬化のプラーク標本を用いて免疫染色を行うと、PTX3の発現はプラーク中に存在する好中球とMφの細胞質に認め、好中球の方がMφより強く発現していた。血中のPTX3は急性心筋梗塞や不安定狭心症といった急性冠症候群の発症早期に上昇する事が知られている。本研究の結果より急性冠症候群におけるPTX3の由来は好中球が主体となっている可能性が示唆され、興味深い所見と考えられた。また、今回新規に作成された抗体は、局所の炎症におけるPTX3を評価する際に有用な手段となり得ることが示された。

(論文審査の要旨)

Pentraxin3 (PTX3)はリポ多糖や炎症性サイトカインなどの刺激により単球/マクロファージ (Mφ)、血管内皮細胞などの細胞に発現し、動脈硬化や急性冠症候群の新しいマーカーとして注目されている。Short PTXであるCRPが全身の炎症を反映するのに対し、long PTXのPTX3は局所の炎症を反映する。しかし、好中球のPTX3発現は明らかではない。本研究は新規に作成された抗ヒトPTX3抗体(clone 1228)を用い、ヒト単球から分化誘導したMφ及びヒト末梢血から分離した好中球におけるLPS添加によるPTX3の発現について検討した。Mφ、好中球ともに細胞質にPTX3の発現を認め、LPS刺激で発現が増強した。LPS刺激で好中球のPTX3蛋白はPTX3 mRNA誘導後に増加することから、好中球はPTX3の分泌に加え産生にも関与することが確認された。また、急性心筋梗塞症例の動脈硬化プラーク組織ではPTX3はMφに比し好中球に強く発現していた。以上、本研究は、好中球がPTX3の産生にも関与すること、急性心筋梗塞症例の動脈硬化プラーク組織ではPTX3はMφより好中球に強く発現すること、clone 1228抗体が局所の炎症におけるPTX3を評価する際に有用な手段となることなどを明らかにした点に学位論文としての価値を有する。