

## 好中球顆粒における Pentraxin 3 の発現

オリガ ラズビナ

新潟大学大学院医歯学総合研究科 細胞機能講座 分子細胞病理学分野

(主任：味岡 洋一教授)

Expression of Pentraxin 3 in neutrophilic granules

Olga Razvina

Department of Cellular Function, Division of Cellular and Molecular Pathology,  
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan

別刷請求先：〒951-8520 新潟市中央区旭町通 1-754

新潟大学大学院医歯学総合研究科 分子細胞病理学分野

オリガ ラズビナ

Reprint requests to: Olga Razvina

Department of Cellular Function, Division of Cellular and Molecular Pathology,  
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences,  
1-754 Asahimachi-dori Chuo-ku, Niigata 951-8520 Japan

## 要旨

Pentraxinは免疫反応に重要な役割を果たす5量体の蛋白で、pentraxin 3 (PTX3)やC-reactive protein (CRP)はpentraxin superfamily に属する。pentraxin 3 (PTX3) は炎症性刺激に曝されるとマクロファージ、好中球、血管内皮細胞など様々な細胞から産生され、好中球ではPTX3は細胞質内の顆粒に局在する。好中球の顆粒は1次顆粒、2次顆粒、3次顆粒の3種に分けられ、PTX3 は2次顆粒（特殊顆粒）に存在すると考えられてきた。しかし、他の顆粒における局在については不明であった。本研究では成熟好中球と好中球へ分化誘導した前骨髄球性細胞株HL-60細胞を検討し、すべての顆粒にPTX3が存在することを確認した。IL-8の刺激によって好中球はneutrophil extracellular traps (NETs) と呼ばれる不規則な網状形態を示したが、3種の顆粒はこのNETsの表面に接着し、PTX3はこれら顆粒と共局在した。以上の成績からPTX3は好中球の細胞質内および細胞外の顆粒構成抗菌性蛋白と共存し、生体防御上、重要な役割を果たしていることが推測された。

**Key words:** pentraxin 3、免疫組織化学、好中球、好中球顆粒、neutrophil extracellular traps (NETs)

## 緒言

Pentraxin は感染や炎症反応に重要な役割を果たす蛋白で pentraxin ドメインと呼ばれる特徴的 C 端領域を有する。<sup>1</sup> Pentraxin ファミリーには C-reactive protein (CRP) や pentraxin 3 (PTX3) などが含まれ、PTX3 は long pentraxin に、CRP は short pentraxin に属する。<sup>1,2</sup> CRP が種々の刺激によって肝細胞から産生されるのに対し、PTX3 は lipopolysaccharide, IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、酸化低密度リポ蛋白などの炎症性シグナルを受けてマクロファージ、好中球、血管内皮細胞など多種類の細胞から産生される。<sup>3</sup>

好中球は単球・マクロファージに比べて遙かに多く存在し、<sup>4</sup> 迅速に動員される食細胞として自然・獲得免疫において重要な役割を演じている。<sup>4,5,6</sup> 好中球は運動能が高く、感染によって活性化された内皮細胞、肥満細胞やマクロファージから産生されるサイトカインによって引き寄せられて急速に感染病巣に集積し、生体に侵入する病原体との戦いの最前線で防御に当たる。<sup>6</sup> 好中球は抗菌性の蛋白を豊富に含む顆粒を有している。<sup>4,5,6</sup> 好中球の顆粒はその蛋白組成によって 1 次顆粒（アズール顆粒：azurophilic granules）、2 次顆粒（特殊顆粒：specific granules）、3 次顆粒（ゲラチナーゼ顆粒：gelatinase granules）の 3 つのサブセットに分けられる。<sup>4,5,6</sup> 1 次顆粒は myeloperoxidase (MPO)、neutrophil elastase や azurocidin を、2 次顆粒は lactoferrin、cathelicidin を、3 次顆粒は gelatinase、cathepsin などを含み、これら蛋白は抗菌作用を発揮する。好中球の顆粒は骨髄において骨髄球から好中球への分化過程で段階的に出現する。<sup>7</sup> PTX3 も好中球の顆粒に存在する。従来の研究では好中球において PTX3 は 2 次顆粒にのみ存在するとされた。<sup>8</sup> しかし、その他の顆粒における PTX3 の存在については確認されていなかった。本研究では、3 種の顆粒の構成蛋白に対する抗体と PTX3 に対する新規抗体を用いて、好中球内顆粒および好中球の崩壊物である

neutrophil extracellular traps (NETs)<sup>9-12</sup>に付着した顆粒と PTX3 との共局在の有無について検討し、顆粒と PTX3 の機能についても考察を加える。

## 材料と方法

### 好中球の分離

ヒト好中球を mono-poly resolving medium (DS Pharma Biomedical Co., Ltd., Osaka, Japan)を用いて健常人末梢血から遠心分離した。遠心後、好中球分画における好中球の比率を Trypan Blue Solution (Gibco, Carlsbad, CA, USA)を用いた染色で観察、算定した。2% 牛胎児血清と Penicillin Streptomycin (Pen Strep) mixture (Gibco)を含む RPMI 1640 に  $1 \times 10^6$  cells/ml に調整し、ウエスタンブロットと免疫染色に供した。

ウエスタンブロットには細胞を 3cm のディッシュに播いて培養し、100ng/ml の IL-8 で刺激した。40 分後、上清と細胞融解物を採取した。上清は enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)に供し、活性化好中球からの in order to check the level of PTX3 放出レベルを検討した。免疫染色には非刺激好中球をサイトスピンで 1 分間 1000 rpm で貼り付け、染色した。刺激好中球については好中球を 0.001% polylysine 処理カバーグラスに播き、100 ng/mL の IL-8 (R&D Systems Inc., Minneapolis, MI, USA) で 40 分刺激して観察した。

### HL-60 細胞の培養

HL-60 細胞は 10% fetal bovine serum and Penicillin Streptomycin (Pen Strep) mixture (Gibco)を添加した RPMI 1640 medium を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub>/95% air の環境で培養した。細胞の生死は Trypan Blue Solution (Gibco) 染色で評価した。培養細胞は免疫染色とウエスタンブロットに供した。細胞を 1 分間 1000

rpm でサイトスピンにかけて免疫染色した。HL-60 細胞を好中球様細胞に分化させる方法として、培地に 1.25% dimethyl sulfoxide DMSO (Sigma) を添加し、7 日間培養した。形態はギムザ染色で確認し、さらに免疫染色を施行して観察した。

### 免疫蛍光染色

好中球と HL-60 細胞はサイトスピンでスライドグラスに貼り付け、14% paraformaldehyde で 5 分間固定し、0.5% TritonX-100/PBS で 5 分処理した。標本は 10% 正常ヤギ血清処理後、1 次抗体として 1:100 希釈抗 PTX3 モノクロナル抗体 PPZ-1228 (Perseus Proteomics Inc., Tokyo, Japan)、1:100 希釈抗 lactoferrin モノクロナル抗体 (EPR4338, GenTex Inc., Irvine, CA, USA)、1:1000 希釈抗 myeloperoxidase ポリクロナル抗体 (Abcam plc., Cambridge, UK)、1:10000 希釈抗 gelatinase ポリクロナル抗体 (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)、1:1000 希釈抗 azurocidin モノクロナル抗体 Z6718 を用いた。抗 PTX3 抗体には 2 次抗体として 1:250 希釈 Alexa Fluor 568 羊抗マウス IgG Fab' 分画 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用い、抗 lactoferrin, 抗 gelatinase および抗 MPO 抗体に対する 2 次抗体としては Zenon Alexa Fluor 488 標識羊抗ウサギ IgG Fab' 分画 (Invitrogen) を用いた。抗 azurocidin 抗体の 2 次抗体には Zenon Alexa Fluor 488 マウス IgG2a 標識キット (Invitrogen) で標識した。この組み合わせで PTX3 を赤に、3 種の顆粒を緑色に発色させた。

DNA 染色は Hoechst 33342 (Molecular Probes Inc. Carlsbad, CA, USA) を用いて青色に発色した。対照陰性コントロールとして、1 次抗体を用いない標本を使用した。観察には共焦点顕微鏡 LSM510 META (Carl Zeiss, Jena, Germany) を使用した。

## ウェスタンブロット

採取した好中球および PTX3 強制発現 HEK 細胞は 150mM NaCl, 50 nM Tris-HCl (pH 8.0)、5mM エチレンジアミン 5 酢酸、1% Triton X-100 と 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride、1 mM leupeptin、1 mM aprotinin を含む融解液で氷冷下 10 分間処理し、4°C で 15 分間 15,000 rpm で遠心した。上清と融解細胞は sodium-dodecyl-sulfate-polyacrilamide-gel を用いて電気泳動した。泳動後、蛋白を PVDF 膜(GE Healthcare, Amersham, UK)に移し、5% スキムミルクで前処理し、抗 lactoferrin 抗体 (1:500 希釈)、抗 gelatinase 抗体 (1:1,000 希釈)、抗 myeloperoxidase 抗体 (1:500 希釈)、抗 azurocidin 抗体 (1:1,000 希釈) で反応させ、2 次抗体として抗マウス IgG horseradish peroxidase 標識抗体 (GE Healthcare) を 1:2000 希釈して用いた。ECL detection system (GE Healthcare) によってマニュアルに従って計測した。<sup>12</sup>

## Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Pepsin 消化 PPMX0104 (5 µg/ml 溶液 100 µl) を microtiter プレート MaxiS-ope (Nalge Nunc, Penfield, New York, USA) にコートし、各 well は 1% casein (pH 7, 4) で 4°C 一晩処理した。well に上清を注入し、結合した PTX3 は horseradish peroxidase-conjugated PPMX0105 (Perseus Proteomics Inc., Tokyo, Japan) を用いて検出した。停止液を加え、microplate reader system (Towa Labo, Tokyo, Japan) を用いて吸光度 450 nm で測定した。標準検体として、リコンビナント PTX3 蛋白(Perseus Proteomics) を用いた。検体は 2 つに分けて測定した。

## 電顕的観察

非刺激および刺激好中球を 2% glutaraldehyde で固定し、走査電顕で観察した。細胞は tannin-osmium で後固定し、エタノールで脱水し、臨界点乾

燥を行い、ion-coater を用いて platinum-palladium でコートした。電子顕微鏡は H700 (Hitachi, Tokyo, Japan)を用いた。

### 細胞の算定法と局在解析

共焦点レーザー顕微鏡の写真は 2,000 倍で撮影し、10,000 倍の写真に拡大、印刷してから顆粒を赤 (PTX3 陽性顆粒)、緑 (それぞれの顆粒)、黄色 (PTX3 とそれぞれの顆粒タンパクの共局在顆粒) の 3 種に識別した。それぞれに 120 個の好中球を観察し、解析した。

## 結果

### 好中球における PTX3 の発現と刺激による変化

PTX3 の強制発現細胞から産生されるリコンビナント PTX3 蛋白は 45 kDa のモノマーと 90 kDa のダイマーであり、<sup>13</sup> 培養上清のウエスタンブロットでも両者が確認された (図 1a)。融解好中球では、PTX3 蛋白は同様に 90 および 45 kDa の分子量であった。上清の PTX3 蛋白のバンドは融解細胞から抽出した蛋白のバンドより明瞭で、PTX3 蛋白は好中球で産生され、速やかに細胞外に分泌されるものと考えられた。IL-8 刺激後に融解好中球の PTX3 蛋白が減少したが、培養上清では IL-8 刺激による PTX3 蛋白発現量の変化は明らかでなかった (図 1a)。しかし、上清の ELISA アッセイでは上清の PTX3 蛋白発現量は IL-8 刺激によって 4 倍に増加し、IL-8 刺激による好中球の PTX3 分泌亢進が示唆された(表 1)。

### 刺激好中球の Lactoferrin の発現

融解好中球と培養上清から得られた lactoferrin 蛋白はウエスタンブロットで分子量 85 kDa のバンドとして認められた。非刺激状態では上清に

lactoferrin は検出されなかったことから、lactoferrin は主に細胞内に蓄えられているものと考えられた。IL-8 刺激後は上清中に lactoferrin のバンドが明瞭に検出されたことから、lactoferrin 顆粒は刺激によって細胞外に放出されるものと考えられた (図 1b)。

## 正常好中球の免疫 2 重染色

非刺激好中球の免疫 2 重染色では、lactoferrin 陽性顆粒と PTX3 陽性顆粒の多くは一致した (図 2c)。好中球 1 個当たりの PTX 3 と lactoferrin の共局在顆粒数は  $72.3 \pm 8.2$  個であった (表 2)。

好中球 1 個当たりの azurocidin および myeloperoxidase 2 重陽性 1 次顆粒数は  $26.2 \pm 5.5$  個で、myeloperoxidase と PTX3 の 2 重陽性顆粒数は  $30.0 \pm 4.9$  個であった (図 2a, b)。gelatinase と PTX3 の 2 重陽性顆粒の数は  $34.0 \pm 4.7$  (図 2d) であった。

2 重染色における好中球 1 個当たりの陽性顆粒の中の 2 重陽性顆粒の比率は PTX3 と lactoferrin が 71% で、MPO と PTX3 では 25%、azurocidin と PTX3 では 31.5%、gelatinase と PTX3 では 35% であり、1-3 次顆粒の一部には PTX3 が局在した。

## NETs に結合する顆粒の蛋白発現

走査電顕では IL-8 刺激後好中球の脱顆粒と細胞死が観察された (図 3a,b)。好中球は不規則な網状構造を呈し、こぶ状の糸がからまったような構造が認められ、免疫染色ではこれら構造が Hoechst 陽性であることから、核クロマチン成分であることが示され、neutrophil extracellular traps (NETs) と称される形態に合致した。免疫染色では NETs の上に MPO、azurocidin、lactoferrin (図 4) ないし gelatinase 陽性顆粒が付着しており、さらにこれら顆粒の一部に PTX3 蛋白が共局在した。



## 前骨髄球細胞株における顆粒構成蛋白と PTX3 の発現

ヒト前骨髄性白血病細胞株 HL-60 は 1 次顆粒のみを有する。免疫染色では HL-60 は MPO と azurocidin 陽性顆粒を有しており、これら 1 次顆粒の一部は PTX3 を発現した (図 5a)。ウエスタンブロットでも 1 次顆粒蛋白の MPO と azurocidin 蛋白はそれぞれ 84kDa および 37 kDa の蛋白として確認された。一方、2 次顆粒と 3 次顆粒は免疫染色で観察されず(図 5 b, c)、ウエスタンブロットでも 2 次顆粒構成蛋白の lactoferrin や 3 次顆粒蛋白の gelatinase の発現は検出できなかつた(図 5d)。PTX3 蛋白は分子量 45 kDa と 90 kDa のバンドとして観察された (図 5d)。

## 好中球様細胞へ分化した HL-60 細胞における顆粒構成蛋白と PTX3 の発現

円形で大きな核を有し、格胞体比が大きい HL-60 細胞は DMSO 添加培地で 7 日間培養すると、核がくびれ、分葉した好中球様細胞へ分化した (図 6a, b)。この細胞を免疫 2 重染色して観察すると、1 次顆粒 (MPO)のみならず、2 次顆粒 (Lactoferrin)と 3 次顆粒 (Gelatinase) も認められ、これら顆粒の一部には PTX3 が共局在した (図 6c, d, e)。

## 考 察

好中球は生体防御の第一線において貪食作用や顆粒構成蛋白を含む抗菌性物質を分泌するなど種々の方法で病原体を直接殺菌する。好中球の顆粒はazurocidin やmyeloperoxidase (MPO)を含む1次 (アズール) 顆粒、lactoferrin を含む2次 (特殊) 顆粒、そしてgelatinaseを含む 3次 (ゲラチナーゼ) 顆粒の3種に分類される。これら顆粒は骨髄における顆粒球の分化段階で順次産生され、1次顆粒は前骨髄球で、2次顆粒は骨髄球で、3次顆粒は後骨髄球の段階で産生される<sup>6,7</sup>。

PTX3 も顆粒構成蛋白の一つであり、従来の免疫染色や蛋白解析研究では特殊顆粒に存在すると報告された。<sup>8,14</sup> 今回のウエスタンブロットでもPTX3とlactoferrin蛋白は好中球内に存在し、細胞外に分泌されることが確認され、両蛋白は同一顆粒に存在することが示唆された。Jaillon らはPTX3のmRNA は好中球の前駆細胞 (前骨髄球、骨髄球、後骨髄球) に発現するが、成熟好中球には発現しないことから、PTX3は好中球の分化過程で産生され、成熟好中球ではすぐ使える状態の特殊顆粒内に貯蔵されていると考えた。<sup>8</sup>

本研究ではPTX3は成熟好中球の2次顆粒に発現していることを確認したが、同時に1次顆粒と3次顆粒にも一定程度発現していることを観察した。それを確認するために、1次顆粒のみを有し、2次顆粒と3次顆粒を欠損するヒト前骨髄球白血病細胞株HL - 60 細胞を検討したところ、1次顆粒にPTX3 蛋白が発現していることを免疫染色とウエスタンブロットで確認した。さらに、HL - 60 細胞を好中球へ分化させると、分葉した核を持つ好中球様の細胞に変態し、1次顆粒のみでなく、2次および3次顆粒も出現した。しかも、これら顆粒の一部はPTX3と共局在し、正常成熟好中球と同様の所見であった。これらの結果から、PTX3 は2次顆粒のみでなく、1次および3次顆粒にも含まれるものと考えられた。

種々の炎症性刺激によって好中球が Neutrophil extracellular traps (NETs) と称される抗菌性分子を付着した網状のクロマチン構造が形成されることが 2004 年に初めて報告された。<sup>9</sup> この網状構造は核内のクロマチン線維とヒストンおよび炎症刺激を受けて好中球から放出される顆粒から構成される。<sup>9,11,12</sup> 本研究でも好中球刺激後 NETs が形成され、3 種の顆粒が細胞外で NETs 表面に捕捉されている像が観察された。NETs に変化した好中球はアポトーシスと異なり、マクロファージによる貪食を回避して病巣内に残存する。<sup>10,12</sup> そのため好中球顆粒に蓄えられていた抗菌性蛋白を DNA 線維に結合した NETs は病原体を捕捉し、殺菌するという特殊な環境を形成する。<sup>9-12</sup>

本研究では NETs に付着した顆粒蛋白と PTX3 が一部共局在していることが確認された。NETs に結合した PTX3 は病原体に抑制的に作用することが示唆されている。<sup>2,20,21</sup> PTX3 ノックアウトマウスを用いた研究では PTX3 はアスペルギルス、緑膿菌、チフス菌などの病原体に直接結合し、病原体に対する自然免疫を強化していることが報告されている。<sup>15</sup> 以上の成績から NETs に結合した PTX3 と顆粒蛋白は感染および炎症局所で殺菌作用を発揮するものと考えられる。

最近、PTX3 が顆粒構成蛋白である azurocidin や MPO の殺菌効率を高めることが報告され、生化学的に azurocidin と MPO は PTX3 に直接結合することも証明された。<sup>16</sup> 本研究で PTX3 が 3 種の顆粒内に確認されたことから、PTX3 がそれぞれの顆粒構成蛋白と結合し、NETs 表面で抗菌性複合体を形成することが示唆された。

PTX3 はそれ自体でも潰瘍性大腸炎、動脈硬化、敗血症などの疾患で病学的に作用することが知られている<sup>17-21</sup>。好中球からの PTX3 産生が豊富で顆粒蛋白との相互作用が注目されていることから、PTX3 と顆粒構成蛋白の機能についてはさらなる検討が必要である。

## 謝 辞

本研究のご指導を賜りました新潟大学大学院医歯学総合研究科分子細胞病理学分野名誉教授 内藤 眞先生、同准教授 長谷川 剛先生、同 分子・診断病理学分野教授 味岡 洋一先生、新潟医療技術専門学校教授 八神 淑英先生、東京大学先端科学技術研究センター計量生物医学分野教授 浜窪 隆雄先生、同助教 太期 健二先生、東京大学先端科学技術研究センターシステム生物医学ラボラトリー教授 児玉 龍彦先生、ならびに細胞培養および標本作製の援助をいただいた新潟大学大学院医歯学総合研究科分子細胞病理学分野青山 崇技官、大谷内 健二技官、圓山 理子技官、高橋 美恵子技官に深謝いたします。

## 文 献

1. Botazzi B, Garlanda C, Mantovani A, et al. Pentraxins as a key component of innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 18(1):10-5, 2006
2. Daigo K, Hamakubo T. Host-protective effect of circulating pentraxin 3 (PTX3) and complex formation with neutrophil extracellular traps. *Front Immunol.* 3:378, 2012
3. Mantovani A, Garlanda C, Doni A et al. Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3. *J Clin Immunol.* 28(1):1-13, 2008
4. Witko-Sarsat V, Rieu P, Halbwachs-Mecarelli L, et al. Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects. *Lab Invest.* 80(5):617-53, 2000
5. Jena P, Mohanty S, Mohanty T, et al. Azurophil Granule Proteins Constitute the Major Mycobactericidal Proteins in Human Neutrophils and Enhance the Killing of Mycobacteria in Macrophages. *PLoS One.* 7(12):e50345, 2012
6. Borregaard N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity.* 33(5):657-70, 2010
7. Häger M, Cowland JB, Borregaard N. Neutrophil granules in health and disease. *Intern Med.* 268(1): 25-34, 2010
8. Jaillon S, Peri G, Mantovani A, et al. The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *J Exp Med.* 204(4): 793-804, 2007

9. Brinkmann V, Reichard U, Zychlinsky A., et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 303(5663): 1532-5, 2004
10. Papayannopoulos V, Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol*. 30(11):513-21, 2009
11. Remijsen Q, Kuijpers TW, Vanden Berghe T, et al. Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ*. 18(4):581-8, 2011
12. Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil Extracellular Traps: Double-Edged Swords of Innate Immunity. *J Immunol*. 189(6):2689-95, 2012
13. Savchenko A, Imamura M, Ohashi R et al. Expression of PTX3 in human atherosclerotic lesions. *J Pathol*. 215(1): 48-55, 2008
14. Lominadze G, Powell DW, Luerman GC et al. Proteomic analysis of human neutrophil granules. *Mol Cell Proteomics*. 4(10): 1503-21, 2005
15. Garlanda C, Hirsch E, Bozza S et al. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature*. 420(6912): 182-6, 2002
16. Daigo K, Yamaguchi N, Kawamura T et al. The proteomic profile of circulating pentraxin 3 (PTX3) complex in sepsis demonstrates the interaction with azurocidin 1 and other components of neutrophil extracellular traps. *Mol Cell Proteomics*. 11(6): M111.015073, 2012
17. Deban L, Jaillon S, Garlanda C et al. Pentraxins in innate immunity: lessons from PTX3. *Cell Tissue Res*. 343(1): 237-49, 2011
18. Bottazzi B, Garlanda C, Salvatori G et al. Pentraxins as a key component of innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 18(1): 10-5, 2006
19. Moalli F, Jaillon S, Inforzato A et al. Pathogen recognition by the long pentraxin PTX3. *J Biomed Biotechnol*. 2011: 830421, 2011

20. Savchenko A, Imamura M, Ohashi R, Jiang S, Kawasaki T, Hasegawa G, Emura I, Iwanari H, Sagara M, Tanaka T, Hamakubo T, Kodama T, Naito M: Expression of PTX3 in human atherosclerotic lesions. *J Pathol* 215(1):48-55, 2008

21. Savchenko AS, Inoue A, Ohashi R, Jiang S, Hasegawa G, Tanaka T, Hamakubo T, Kodama T, Aoyagi Y, Ushiki T, Naito M: Long pentraxin 3 (PTX3) expression and release by neutrophils *in vitro* and in ulcerative colitis. *Pathol Int* 61: 290-297, 2011

## 図説明

**図 1 (a)** ウェスタンブロットによる好中球の PTX3 蛋白の検出。融解好中球と培養上清は明瞭に PTX3 蛋白の存在を示し、単量体と 2 量体（分子量 40 kDa と 90 kDa）のバンドが見られる。融解好中球より培養上清中の PTX3 バンドがより明瞭である。IL-8 刺激 40 分後に融解好中球の PTX3 は非刺激時より減少した。上清中の PTX3 蛋白に刺激による変化はウェスタンブロットでは明瞭ではなかった。リコンビナント PTX3 は陽性対照として用いた。

**(b)** ウェスタンブロットによる好中球の Lactoferrin 蛋白の検出。非刺激時は Lactoferrin 蛋白は好中球内に検出され、IL-8 刺激後は好中球と培養上清にも検出された。刺激によって好中球の Lactoferrin 発現はやや減少した。HEK 細胞 (Human Embryonic Kidney 293 cells) は陰性対象として用いた。

**図 2** 非刺激好中球の免疫染色。(a) pentraxin 3 (PTX3) (赤) と myeloperoxidase (MPO) (緑) の 2 重染色。(b) PTX3 (赤) と azurocidin (緑) の 2 重染色。(c) PTX3 (赤) と lactoferrin (緑) の 2 重染色。(d) PTX3 (赤) と gelatinase (緑) の 2 重染色。いずれも 2 重陽性細胞の存在が認められる。Bar は 5  $\mu\text{m}$  を示す。

**図 3** (a) IL-8 刺激好中球の走査電顕像 (SEM)。(b) IL-8 刺激好中球の高倍率像。NETs と称される不規則な網目状構造が見られ、顆粒状物質も付着している。Bar は 10  $\mu\text{m}$  (a, b) および 2  $\mu\text{m}$  (c) を示す。

**図 4** IL-8 刺激好中球の免疫染色。pentraxin 3 (PTX3) (赤) と lactoferrin (緑) の 2 重染色。顆粒が NETs に付着し、その一部は PTX3 と共局在する。Bar は 5  $\mu\text{m}$  を示す。

**図 5** ヒト前骨髄性白血病細胞株 HL-60 の免疫染色。(a) pentraxin 3 (PTX3) (赤) と myeloperoxidase (MPO) (緑) の 2 重染色。(b) PTX3 (赤) と lactoferrin (緑) の 2 重染色。(c) PTX3 (赤) と gelatinase (緑) の 2 重染色。HL-60 細胞に PTX3 と MPO 陽性顆粒が見られるが、lactoferrin と gelatinase 陽性顆粒は見られない。Bar は 5  $\mu\text{m}$  を示す。(d) ウエスタンブロットによる HL-60 細胞の PTX3、MPO、lactoferrin と gelatinase の発現。PTX3 (分子量 90 kDa と 40 kDa) と

MPO (分子量 84kD) のバンドが見られるが、lactoferrin と gelatinase は検出されない。

図 6 (a) ヒト前骨髄性白血病細胞株 HL-60 細胞の May-Giemsa 染色。(b) DMSO 添加培養によって好中球様細胞に分化した HL-60 細胞の May-Giemsa 染色。(c) pentraxin 3 (PTX3) (赤) と myeloperoxidase (MPO) (緑) の 2 重染色。(d) PTX3 (赤) と lactoferrin (緑) の 2 重染色。(e) PTX3 (赤) と gelatinase (緑) の 2 重染色。HL-60 細胞は分化すると 1 次顆粒に加えて 2 次顆粒と 3 次顆粒が出現し、いずれも PTX3 と共局在する顆粒が見られる。Bar は 5  $\mu$ m を示す。

表 1 ELISA によって測定した非刺激および IL-8 刺激好中球の培養上清における PTX3 蛋白濃度。IL-8 刺激好中球の培養上清は非刺激好中球培養上清の 4 倍の PTX3 蛋白を含有した。

表 2 PTX3 と共局在する各種顆粒の平均。赤: PTX3; 黄色: PTX3 と共局在する顆粒; 緑: (a) MPO, (b) azurocidin, (c) lactoferrin, (d) gelatinase。 (e) PTX3 が共局在する各種顆粒の百分率 :  $2 \text{重陽性細胞} / \text{PTX3 陽性顆粒} \times 100 = \%$



表 1 正常および IL-8 刺激好中球の PTX3 分泌

刺激	PTX3 濃度 (ng/ml)
IL-8 (-)	0.09
IL-8 (+)	0.38

有意差 :  $p < 0.05$

表 2 好中球の各種顆粒数、PTX3 陽性顆粒数および PTX3 と共局在する顆粒数

	1 次顆粒		2 次顆粒	3 次顆粒
	MPO	Azurocidin	Lactoferrin	Gelatinase
	128	115	112.6	133.9
PTX3 陽性顆粒	104.3	94.9	101.8	97.8
共局在顆粒	26.2	30.0	72.3	34.0











