

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 Razvina Olga
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 571 号
学位授与の日付 平成 26 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 好中球顆粒における Pentraxin 3 の発現

論文審査委員 主査 教授 山本 格
副査 教授 河内 裕
副査 教授 味岡 洋一

博士論文の要旨

【背景と目的】好中球は最多の白血球であり、貪食細胞として自然免疫、獲得免疫機構において重要な役割を果たしている。運動能を有し、種々細胞の産生するサイトカインやケモカインによって炎症局所へ集積する。好中球は顆粒の中に抗菌性タンパクを有し、殺菌処理する。好中球の顆粒は 3 種類存在し、1 次顆粒 (アズール顆粒)、2 次顆粒 (特殊顆粒)、3 次顆粒 (ゲラチナーゼ顆粒) がある。1 次顆粒には myeloperoxidase (MPO)、neutrophil elastase、azurocidin などが含まれ、2 次顆粒には lactoferrin や cathelicidin が、3 次顆粒には gelatinase や cathepsin などが含まれる。これらの顆粒は好中球の分化に伴って順次出現する。Pentraxin 3 (PTX3) は炎症や免疫に重要な分子であり、PTX3 は long pentraxin に、CRP (C-reactive protein) は short pentraxin に属する。PTX3 は炎症性刺激の存在下でマクロファージ、好中球、平滑筋、内皮細胞など種々の細胞から産生される。

従来の研究では PTX3 は 2 次顆粒に存在するとされてきた。しかし、他の顆粒にも存在するかどうかは不明であった。それで、申請者は PTX3 の好中球内局在を詳細に検討した。

【材料と方法】ヒト好中球を健常人末梢血から遠心分離し、2% 牛胎児血清とペニシリン、ストレプトマイシンを含む RPMI 1640 に 1×10^6 cells/ml に調整し、ウエスタンブロットと免疫染色に供した。

好中球を 100ng/dl の IL-8 を含む培地と含まない培地で培養し、培養上清と細胞を得た。上清は ELISA 法で好中球から分泌された PTX3 の濃度を測定した。細胞は 1% Triton X-100 を含む液で融解し、4°C、15 分 15,000 rpm で遠心した。ウエスタンブロットには細胞融解物 25 μ g と上清を電気泳動し、PVDF 膜にタンパクを移動した。スキムミルク、抗 lactoferrin 抗体、抗 myeloperoxidase 抗体、抗 azurocidin 抗体、抗 lactoferrin 抗体、抗 gelatinase 抗体、および抗 PTX3 抗体で前処理し、抗マウス IgG horseradish peroxidase 抱合 2 次抗体を反応させ、ELC detection system で可視化した。

免疫染色には好中球、前骨髄球性細胞株 (HL-60) および抗中球に分化誘導した HL-60 をサイトスピンでスライドガラスに塗布し、10% 正常山羊血清で前処置してから、ウエスタンブロットに用いた抗体を 1 次抗体に用いた。2 次抗体には Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 488、Zenon Alexa Fluor 488 を用い、PTX3 を赤に、3 種の顆粒を緑色に発色させた。DNA 染色には Hoechst 33342 を用いた。観察には共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510, Carl Zeiss) を用いた。共焦点レーザー顕微鏡観察を行い、2000 倍で写真撮影し、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。

正常および IL-8 刺激好中球については走査電顕 (Hitachi H700) による観察も行った。

【結果】 ELISA 測定では好中球から分泌された PTX3 は 45kDa の単量体と 90kDa の 2 量体からなっていた。好中球内の PTX3 も同様に確認された。IL-8 刺激によって好中球内の PTX3 は減少し、上清中の PTX3 が増加したことから、PTX3 は炎症性刺激によって好中球から速やかに分泌されるタンパクと考えられた。同様に、lactoferrin も IL-8 刺激によって細胞外に放出された。

免疫蛍光染色による観察では、PTX3 は lactoferrin 顆粒の 71%、MPO 顆粒の 25%、azurocidin 顆粒の 31.5%、gelatinase 顆粒の 35% に陽性であった。IL-8 刺激好中球では 40 分後に細胞の変性と崩壊が見られ、走査電顕では不規則な網状構造、数珠状構造が認められた。この網状構造は Hoechst 33342 で陽性であることから、DNA であり、NETs と称される構造と判断された。網状構造には lactoferrin 顆粒、MPO 顆粒、azurocidin 顆粒、gelatinase 顆粒が付着し、それらの一部は PTX3 と共局在した。

前骨髄球性細胞株 (HL-60) はウエスタンブロットで、PTX3、MPO と azurocidin が陽性で、免疫染色でもそれぞれの陽性顆粒がみられたが、2 次顆粒と 3 次顆粒は検出できなかった。また、1 次顆粒の一部に免疫染色で PTX3 の共局在を認め、HL-60 でも PTX3 が 1 次顆粒に存在することが確認された。さらに、好中球へ分化誘導した HL-60 には 2 次顆粒と 3 次顆粒が出現し、それら顆粒の一部は PTX3 陽性を呈した。

【考察と結論】

本研究では成熟好中球の PTX3 の顆粒内存在が明らかにされた。PTX3 は主に 2 次顆粒に局在したが、2 次顆粒に比較すると低率であるものの 1 次顆粒および 3 次顆粒にも含まれていた。

好中球は微生物に対する防御の第一線で、貪食や顆粒に含まれる抗菌物質の放出など様々な方法で病原体を殺菌する細胞である。好中球の顆粒は 3 種類に分類され、骨髄での好中球の分化過程で順次産生されていくことが知られている。1 次顆粒は前骨髄球の段階で産生され、2 次顆粒、3 次顆粒は骨髄球、後骨髄球で産生される。PTX3 の mRNA は前骨髄球～後骨髄球で産生され、成熟好中球では陰性であることが報告されており、PTX3 は未熟な好中球で産生され、成熟好中球の中に貯蔵され、すぐに使用できる状態にあることが考慮される。申請者は前骨髄球性細胞株 (HL-60) が 1 次顆粒のみを有し、PTX3 は HL-60 細胞の 1 次顆粒に存在することを示した。さらに、好中球へ分化誘導した HL-60 には 2 次顆粒、3 次顆粒が出現し、それら顆粒の一部は PTX3 も発現することを確認した。以上の所見から、正常好中球、分化誘導した前骨髄球性細胞株はともに 3 種の顆粒を有し、それら顆粒の一部には PTX3 が共局在することが明らかにされた。

neutrophil extracellular traps (NETs) はクロマチンからなり、それに抗菌性分子が付着していることが 2004 年に報告された。これは核クロマチンの線維、ヒストン、そして好中球の顆粒から構成され、炎症反応に際して形成される。アポトーシスに陥らない好中球はこの構造を作り、顆粒内の抗菌性タンパクを活用し、特異な微少環境を作るものと考えられる。本研究でも好中球刺激後、NETs に 3 種の顆粒が捕捉されていること、および PTX3 も一部に共局在していることを観察した。NETs に付着した PTX3 も病原体の抑制に重要な役割を果たしているものと推測される。

PTX3 ノックアウトマウスを用いた実験で、PTX3 がアスペルギルスやプロソイドモナス菌などに直接結合することが報告され、PTX3 が病原体に対する自然免疫を増強することが示唆されている。PTX3 は NETs に付着し、炎症局所で作用するものと思われる。

最近、PTX3 が顆粒内タンパクで NETs に結合する MPO と azurocidin の抗菌作用を増強するという報告がある。また、生化学的に PTX3 が MPO と azurocidin に直接結合するという報告もある。PTX3-MPO や PTX3-azurocidin 複合体が顆粒放出後に形成されるか、すでに顆粒内でできているのかは不明である。今

後、より詳細なメカニズムの検討が必要である。

本研究によって Pentraxin 3 は 2 次顆粒だけでなく、1 次および 3 次顆粒とも共局在し、NETs に付着した顆粒の一部にも存在することが明かにされた。Pentraxin 3 は顆粒内タンパクとともに生体防御に重要な役割を果たすことが示唆される。

審査結果の要旨

Pentraxin 3 (PTX3) は CRP (C-reactive protein) と同様 pentraxin family に属し、種々の刺激によりマクロファージや好中球などから産生され、病原体に対する自然免疫を増強することが推定されている。好中球には 1 次、2 次 (特殊顆粒)、3 次の 3 種類の顆粒が存在し、従来 PTX3 は 2 次顆粒に存在するとされてきた。しかし、他の顆粒にも存在するかどうかは不明であったため、申請者は PTX3 の好中球内局在を詳細に検討した。

健康人末梢血から好中球を遠心分離し、ウエスタンブロットで PTX3 を検出し、また ELISA 法で培養上清の PTX3 濃度を測定した。好中球と前骨髄球性細胞株 (HL-60) および好中球様細胞に分化誘導した HL-60 細胞を免疫 2 重染色し、共焦点レーザー顕微鏡で PTX3 と 3 種の顆粒タンパク質の局在を観察した。

PTX3 は好中球内に存在し、IL-8 刺激によって PTX3 分泌が増加した。免疫 2 重染色では、PTX3 は好中球 1 次顆粒の 25-31.5%、2 次顆粒の 71%、3 次顆粒の 35% に含まれていた。PTX3 は前骨髄球性細胞株 (HL-60) の 1 次顆粒の一部に、好中球へ分化誘導した HL-60 細胞には 2 次顆粒と 3 次顆粒が出現し、それら顆粒の一部にも存在していた。

以上、本研究は好中球および HL-60 細胞内に PTX3 が存在し、PTX3 は 2 次顆粒だけでなく、1 次および 3 次顆粒に局在することを明らかにし、PTX3 が顆粒タンパク質として生体防御に重要な役割を果たすことを示唆した。

以上を明らかにした点に学位論文としての価値を認める。