

## 論文の内容の要旨

論文題目 ヒト単球・マクロファージ様細胞株におけるヘパラーゼの局在性について  
氏名 佐々木 紀彦

### 【序論】

ヘパラーゼは、高転移性メラノーマ細胞に同定され、ヘパラン硫酸を比較的大きな断片に切断するエンドグルクロニダーゼである。ヘパラン硫酸は、これがコア蛋白質に結合したプロテオグリカンとして細胞膜表面や基底膜などの細胞外マトリックス (ECM) に存在し、これらの構造の維持に必須である。基底膜は、IV型コラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカンなどが主体となった網目構造から構築されており、ヘパラン硫酸プロテオグリカンは、基底膜のバリア機能の発揮に重要な構成成分である。さらに、増殖因子、サイトカイン、ECM 構成分子、酵素類などと相互作用し、増殖因子、サイトカイン、酵素などの活性を制御し、細胞の接着、認識、遊走を調節している。ヘパラン硫酸分解活性 (ヘパラーゼ活性) は、転移性悪性細胞や白血球の局所への浸潤時の基底膜の分解に重要であると考えられており、これまでに様々な悪性細胞の転移性との相関が報告されている。血中の単球や好中球などの免疫細胞は、分化や活性化に伴い、ローリング、接着、血管外遊走を経て、局所へと浸潤し、炎症や血管新生などの応答の引き金となる。また、この過程で、これらの細胞は、内皮細胞下の基底膜を通過しなければならない。従って、免疫細胞においてもヘパラーゼ活性と浸潤性との相関が考えられる。しかし、実際に免疫細胞において、そのヘパラーゼの浸潤への関与および制御機構については不明であり、制御機構を解明することは、将来的に慢性炎症などの過剰な免疫細胞の浸潤抑制を狙った抗炎症物質や免疫抑制物質の開発につながると思われる。

私は、修士課程において、単球・マクロファージのモデルとして白血病細胞株を用い、分化段階におけるヘパラーゼ活性の制御について検討した結果、転写およびプロセシ

グレベルでの変化は認められないが、分化誘導に伴い、ヘパラーゼ活性が細胞外で検出されることを発見した。これは、分化誘導に伴ったヘパラーゼの局在が変化したものと考えられ、細胞の浸潤に関係すると予想された。そこで私は、単球・マクロファージの局所への浸潤がヘパラーゼによって制御されうるかを解明することを目的に、マクロファージの分化に伴うヘパラーゼの局在性変化を決定している分子機構について検討した。

## 【第1章】

### ヘパラーゼの局在性および浸潤への関与について

修士課程において用いたヒト単球・マクロファージ様細胞株 U937 について、ヘパラーゼの局在性を検証するため、まず PMA 処理による分化誘導を行い、その前後において、抗ヒトヘパラーゼモノクローナル抗体を用い、細胞免疫染色を行った。細胞内では分化誘導前後いずれにおいてもヘパラーゼの局在が確認されたが、分化誘導後において細胞表面への局在が確認された (Fig. 1)。フローサイトメトリー解析においても同様に分化誘導後に細胞表面での局在が確認され (Fig. 1)、分化誘導に伴って、ヘパラーゼの一部が細胞表面に再分布することが示された。

次に、分化誘導に伴って細胞表面発現したヘパラーゼの浸潤への関与について検証するため、再構成基底膜 (マトリゲル) への浸潤アッセイによりヘパラーゼ活性阻害物質 (抗ヒトヘパラーゼモノクローナル抗体) の効果について検討した。分化誘導に伴って亢進した浸潤能が、抗体の添加により特異的に抑制され、すなわち、分化誘導に伴って発現したヘパラーゼが浸潤に関与することが示唆された。

ヘパラーゼの細胞表面への再分布のメカニズムについて検証するため、分化誘導に伴うヘパラーゼの細胞表面への trafficking について検討した。細胞内分子の細胞表面への輸送に関わる微小管をノコダゾール処理にて破壊した結果、分化誘導に伴うヘパラーゼの細胞表面への発現が阻害され、細胞外のヘパラーゼ活性も検出されなかった。すなわち、分化誘導に伴うヘパラーゼの細胞表面への輸送が微小管に担われ、活性を発揮するのに細胞表面への再分布が必要であることが示された。

U937 細胞は、PMA 処理によってマクロファージ様に分化すると接着性を持つようになる。上記のように分化誘導に伴ってヘパラーゼが細胞表面に再分布した後、接着に伴って経時的に表面の 1ヶ所に集積 (キャップ) することが細胞免疫染色にて観察された (Fig. 2)。接着に伴うヘパラーゼの集積が、遊走方向に関係するのかが検討するため、PMA 処理後の U937 細胞に遊走因子である *N*-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine (fMLP) の濃度勾配を持つ環境下に置いて、免疫染色を行った。その結果、接着に伴い集積したヘパラーゼは遊走方向に向くことが示された (Fig. 3)。細胞表面に発現したヘパラーゼが、浸潤および遊走先端にてマトリックス中のヘパラン硫酸の分解に関与することが示唆された。

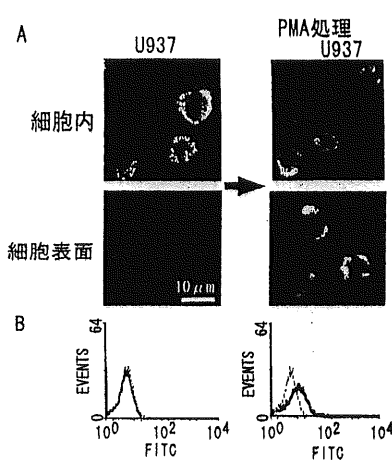


Fig. 1 分化誘導前後におけるヘパラーゼの局在性  
(A) 共焦点レーザー顕微鏡像  
(B) フローサイトメトリー解析

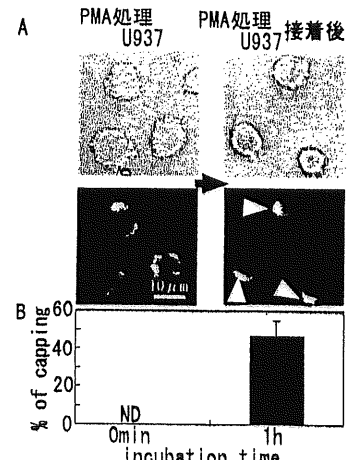


Fig. 2 接着に伴うヘパラーゼの局在性  
(A) 細胞表面の共焦点レーザー顕微鏡像  
(B) ヘパラーゼの集積率

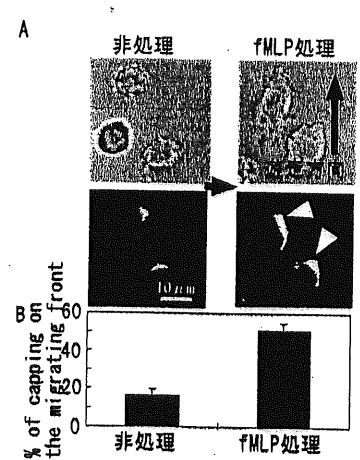


Fig. 3 遊走刺激に伴うヘパラーゼの局在性  
(A) 細胞表面の共焦点レーザー顕微鏡像  
(B) 遊走方向へのヘパラーゼの集積率

【第2章】

ヘパラーゼの集積部位について

第1章において、分化誘導によって細胞表面に発現したヘパラーゼが、接着に伴い集積し、遊走先端に局在化することがわかった。そこで、この集積を制御する機構について検討することにした。そこでまず、細胞表面分子の集積には、細胞内骨格系が関与していると考え、細胞内骨格系の関与について検証した。細胞内骨格系であるF-actinについてサイトカラシンD処理にて再構成を阻害した結果、接着に伴うヘパラーゼの集積が阻害された。すなわち、接着に伴うヘパラーゼの集積に細胞内骨格系が関与することが示された。

細胞膜の微小部位、すなわちマイクロドメイン(ラフト)は、細胞表面の部位特異的な分子の分布を制御しており、接着に伴うヘパラーゼの集積に関わっている可能性が考えられた。メチルβシクロデキストリン(MβCD)処理によりコレステロールを除去させることでマイクロドメインを破壊した結果、接着に伴うヘパラーゼの集積が抑制された(Fig. 4)。そこで、ヘパラーゼの集積にマイクロドメインが関与している可能性が高いと判断した。次に、ヘパラーゼのマイクロドメインへの局在について検証するため、マイクロドメインのマーカースとしてGM1ガングリオシドを指標に細胞免疫染色を行った結果、ヘパラーゼの集積部位とマイクロドメインの集積部位が一致することがわかった(Fig. 5)。さらに、1% Triton X-100処理した分化後のU937細胞のホモジェネートについてシヨ糖密度勾配遠心を行うと、シヨ糖濃度低密度画分にマイクロドメインが回収され、ウェスタンブロット解析を行った結果、活性型のヘパラーゼがこの画分に検出された。すなわち、細胞活性化後のヘパラーゼの集積部位がマイクロドメインであることが示された。

さらに、マイクロドメインの遊走における役割について検証するため、分化後のU937細胞のマイクロドメインをMβCDにて破壊すると、fMLPの濃度勾配に基づく遊走が阻害された。すなわち、浸潤および遊走時の先端へのヘパラーゼの局在化に対するマイクロドメインの関与が示唆された。また、β1、α5、α6インテグリン、MT1-MMP(膜型マトリックスメタロプロテアーゼ)についてもヘパラーゼと共に細胞表面の1ヶ所に集積し遊走方向に向くことがわかった。これらの分子は、ヘパラーゼと共に浸潤先端で協同的に機能する可能性が高く、共に集積するのは、脂質マイクロドメインに親和性を有するためか、あるいはこれらの膜蛋白質同士が会合しやすい性質を持つためと考えられる。

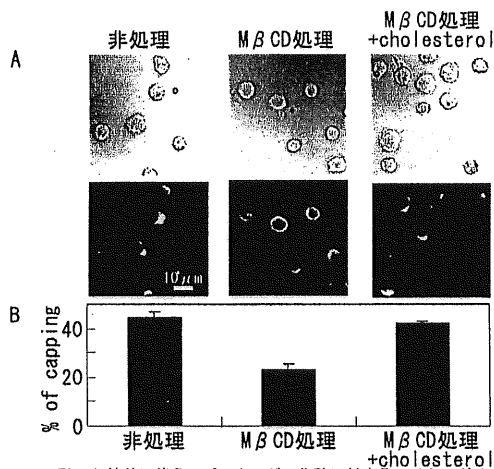


Fig. 4 接着に伴うヘパラーゼの集積に対するマイクロドメインの関与  
(A): 細胞表面の共焦点レーザー顕微鏡像  
(B): ヘパラーゼの集積率

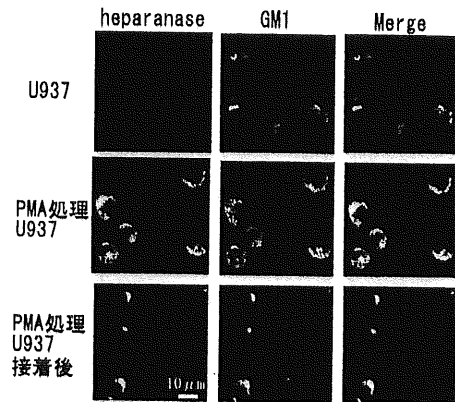


Fig. 5 ヘパラーゼとマイクロドメインの局在性  
細胞表面の共焦点レーザー顕微鏡像

### 【まとめ】

今回、単球・マクロファージ系の細胞において、分化誘導に伴ってヘパラーゼが細胞表面に再分布すること、およびマイクロドメインに局在することが初めて示された。この細胞の基底膜への浸潤がヘパラーゼを阻害することによって制御できる可能性が示唆された。今後は、実際に末梢血単球・マクロファージにおいてどのようにヘパラーゼの発現が制御されているのか検証する必要がある。ヘパラン硫酸を分解する酵素であるヘパラーゼは今のところ1種類しか発見されておらず、マクロファージおよびその類縁の細胞の局所への浸潤がヘパラーゼにより制御されうるとすれば、炎症阻害物質および免疫抑制物質開発の有用なターゲットとなりうるであろう。