

論文の内容の要旨

論文題目 CRP はヒト肺線維芽細胞の遊走を調節する

指導教官 長瀬 隆英教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 菊地 和彦

研究の背景と目的

特発性肺線維症は、炎症が主に肺胞隔壁にびまん性に起こり、結合組織成分の増加により肺胞壁及び肺胞腔が肥厚して肺全体の構造が硬化縮小する。発症のメカニズムは、肺線維芽細胞の遊走能の亢進の報告がある。線維芽細胞の chemoattractant となる物質は正常な組織にも存在するが、線維芽細胞は遊走しない。正常な修復の過程では修復終了時に線維芽細胞の遊走、集積は停止すると考えられ、chemoattractant による線維芽細胞の遊走を制御している物質の存在が示唆される。特発性肺線維症で CRP の血清濃度が臨床症状の出現前から増加している症例もあることが報告されており、肺間質の炎症が局所に滞っている時期から CRP が反応していることがわかる。CRP の mRNA のヒト気道上皮細胞、肺胞マクロファージでの発現報告もあり、CRP の肺線維芽細胞への効果を知ることは病態解明、治療法開発の糸口になる。線維化形成に関与する肺線維芽細胞の遊走に対する CRP の効果を検討した。

研究方法

材料

Recombinant CRP、SB202190、SB203580 は、CALBIOCHEM (La Jolla, CA) から購入した。HFn は、Sigma (St Louis, MO) から購入した。細胞培養液の supplement と media は、GIBCO から (Life Technologies; Grand Island, NY)、牛の胎児血清 (FCS) は、Biofluid (Rockville, MD) から購入した。

細胞培養

ヒト肺線維芽細胞 (Human fetal lung fibroblast, HFL-1) は、the American Type Culture Collection (Rockville, MD) から、ヒト肺線維芽細胞 (WI-38) は、Health

Science Research Resources Bank (Osaka, Japan) から購入した。細胞に10%牛胎児血清を添加し (FCS; Biofluid)、50U/ml ペニシリンと 50 μ g/ml ストレプトマイシンを加えたものを使用した。37° C、5%の CO₂ インキュベーター、100 mm の組織培養皿 (IWAKI; Japan) で培養した。培養液は F12 溶媒 (F12; Sigma)。細胞は培養皿で Sub-confluent となったところで trypsinize し (0.05%のトリプシン EDTA 溶液; GIBCO) 4、5 日ごとに継代した。実験は、第9継代から20継代の細胞で行った。

遊走実験

HFL-1、WI-38 の遊走能の評価は Boyden chamber (Nucleopore Cabin John, MD) を使った Blind well technique で評価した。無血清 F12 で HFL-1 を (1.0×10^6 /ml) 細胞濃度に調整し CRP または他の試薬と共に、上側の well に添加した。Chemoattractant (Human fibronectin HF_n 20 μ g/ml) は、下の well に入れた。上下2つの well は、0.1%ゼラチン (Bio Rad, Hercules, CA) でコートした、8 μ m 孔の migration assay 用 membrane (Nucleopore, Pleasanton, CA) で仕切った。Chamber は、37° C、5%の CO₂ 内で incubate した。Time course の実験を除いて、Chamber は6時間 incubate した。細胞は chemoattractant に誘導され、上の well から membrane の孔をくぐり下の well へと動き、membrane の裏面に接着する。その細胞を遊走した細胞とした。Membrane はメタノールで固定した後、Diff Quik 法 (International reagents CORP. Kobe, Japan) で染色した。裏面に遊走した細胞は、光学顕微鏡の HPF でランダムに5個視野選択し、その和を遊走細胞数とした。

ウエスタンブロット分析

sub-confluent に達した HFL-1 細胞を、PBS で2回洗浄した。Preliminary な実験で P38 MAPK は HF_n と10分間 incubate することで activate されたので、反応時間は10分間とした。細胞は、HF_n 20 μ g/ml に加え CRP 0~100 μ g/ml で incubate した。細胞は 2X SDS-PAGE サンプルバッファ (125mM Tris-HCl (pH 6.8)、4.6% SDS、20% Glycerol、10% 2ME (Mercaptoethanol)、BPB (Bromophenolblue)) 250 μ l で溶解した。サンプルはタンパク質の特性を失活のために5分間沸騰した。不純物除去のために、12000 \times g で10分間遠心し10%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動分離し、Transfer Membranes (Millipore Corp., Bedford, MA) に transfer した。抗体の非特異的な結合を排除するため Transfer Membranes は、3%のウシ血清アルブミン (Sigma St. Louis, MO) と 0.1% Tween20 (Sigma St. Louis, MO) を含むトリスバッファ食塩水で一時間ブロックした。Transfer Membranes は p38 MAPK、リン酸化 p38 MAPK に対して特異的なウサギ抗体 (Cell Signaling Technology, Inc 3Trask Lane Danvers, MA) で反応させた。2次抗体の抗ウサギ抗体 (Cell Signaling Technology) でインキュベーションし ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) で化学蛍光発色させた。

統計分析 個々の実験は少なくとも独立して3回以上行い、データは、平均値+標準誤差で示した。多群間比較はサンプルを、ANOVA で分析し、群間に差が確認されたグループ間において Fisher's 直接確率計算法を適用した。p < 0.05 を有意とした。Time course では、同じ Time point での2者の比較は t 検定によって検定し、p < 0.05 を有意とした。

結果 アジ化ナトリウムは、p38 MAPK 活性に影響を及ぼさなかった。(0.005%アジ化ナトリウム：25.7±16.1% 抑制 ($p > 0.05$))。HF α は、濃度依存的に HFL-1 の遊走を誘導した。

1. HFL-1 遊走に対する CRP の効果：濃度依存性効果

HF α による HFL-1 の遊走に対する CRP の効果を検討のために chemotaxis chamber の上部 well に細胞を同時に添加し、下部 well に chemoattractant として HF α 20 μ g/ml を添加した。CRP は 1-100 μ g/ml で濃度依存的に細胞の遊走を抑制した。CRP が 10 μ g/ml の時 66.7 \pm 14.5% の%抑制率を認めた(control=0%) ($p < 0.05$)

2. WI-38 遊走に対する CRP の効果：濃度依存性効果

HFL-1 と同様に行なった。CRP は 1-100 μ g/ml の濃度で濃度依存的に細胞の遊走を抑制した。CRP が 10 μ g/ml の時 72.1 \pm 5.3%の%抑制率を認めた(control=0%) ($p < 0.05$)

3. HFL-1 遊走に対する CRP の効果：Time courses

HF α に対する HFL-1 の遊走総数は時間とともに増加し 8 時間で最大の遊走が観察された。CRP は 1 μ g/ml で 6 時間で遊走を有意に抑制した。

4. HFL-1 遊走に対する MAPK 阻害剤(SB203580)、(SB202190)の効果

fMLP によって遊走される好中球の遊走が CRP によって p38 MAPK 経路で抑制されることから、HF α によって誘導される HFL-1 の遊走に p38 MAPK 経路が関与するか検討した。MAPK 阻害剤(25 μ M) で 30 分前処置した。細胞を回収して遊走能を検討した。SB203580、SB202190 は HFL-1 の遊走を阻害した。

5. リン酸化 p38 MAPK に対する CRP の効果：ウエスタンブロット法

CRP、MAPK 阻害剤 SB203580 は HF α の存在下で、p38 MAPK のリン酸化を抑制した。p38 MAPK のリン酸化抑制度を検定するため densitometry でその density を計測し検定した。CRP 10 μ g/ml、100 μ g/ml、SB203580 は有意に p38 MAPK を抑制した。

考察

p38 MAPK が不足しているマウス由来の線維芽細胞は chemoattractant への遊走が著しく減少している報告があり細胞移動に p38 MAPK が重要であることがわかる。我々は HF α によって誘導される遊走を CRP が p38 MAPK をおさえることで抑制する可能性を示した。MAPK 阻害剤 SB202190 と SB203580 による薬理的な p38 MAPK の抑制により細胞遊走を抑制したことで p38 MAPK 活性化が HF α による細胞遊走にも重要であることも示した。特発性肺線維症では肺線維芽細胞の遊走を誘発させる物質の存在や遊走を制御している物質の減少、欠如が考えられる。線維芽細胞の過剰な遊走を制御している物質の欠如を補う可能性のある内在性のメディエーターとして CRP に着目し、HF α によって誘導された線維芽細胞の遊走を CRP が制御することを証明した。HF α が誘導する肺線維芽細胞の遊走を p38 MAPK の活性化を妨げることにより CRP が抑制する可能性を示した。CRP の濃度 (1-100 μ g/ml) は生体の濃度の 0.1-10 mg/dl と一致し、ヒト肺

線維芽細胞の遊走抑制効果、p38 MAPK 活性化の抑制効果は、肺線維症の内在性モジュレーター、治療薬の可能性も期待できる。