

論文の内容の要旨

論文題目 炎症局所の好中球浸潤におけるヘパラーゼの関与

氏名 須江 真由美

【序論】

好中球は病原体の貪食、殺滅をもって感染防御に中心的な役割を果たす。この際、好中球は末梢血中から末梢組織へと浸潤して炎症を惹起することから、好中球の浸潤は炎症の「実体」と考えられる。炎症時、好中球は炎症局所へ血管外浸潤する。この過程にはセレクトリンやインテグリン等を介した細胞間相互作用が関与するが、その後の基底膜通過過程において基底膜の主要構成成分であるヘパラン硫酸鎖の分解が必須であるかどうかは不明であった[図 1]。

ヒト末梢血好中球は細胞内顆粒にヘパラン硫酸プロテオグリカンのヘパラン硫酸鎖を分解するエンド型 β -グルクロニダーゼであるヘパラーゼを持つとの報告がある。マウスメラノーマでは、ヘパラーゼの発現量と転移性及び悪性度が相関し、ヘパラーゼ遺伝子の発現抑制により転移能が低下した。このため、好中球が血管外浸潤する際にも、ヘパラン硫酸鎖の分解が重要な過程であると予想された。好中球はその血管外浸潤過程でケモカインや接着分子による刺激を受けると考えられているが、ヘパラーゼが血管外浸潤に必須であるのか、その過程の各段階で活性発現がどのように制御されているのかは不明であった。これまでに、マウス好中球は分化の後期段階でヘパラーゼを細胞内に発現することを確認している。本研究では、さらに好中球の血管外浸潤にヘパラーゼが関与することを示し、好中球の移動に伴いヘパラーゼの細胞内外における局在が変化することを明らかにした。

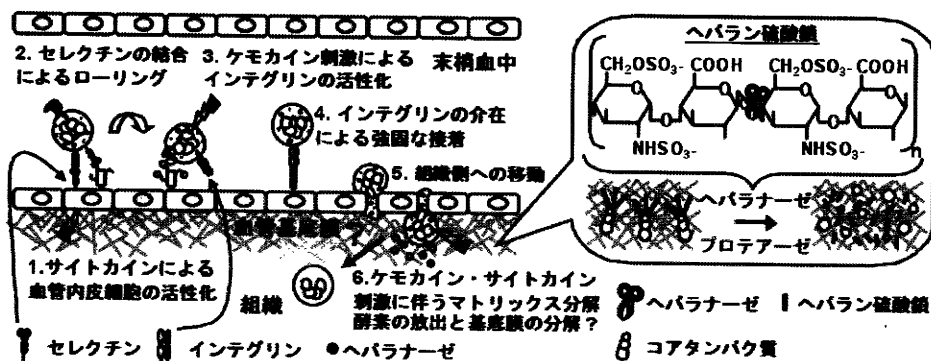


図 1 末梢血から組織への血管外浸潤過程において、ヘパラーゼが関与する可能性を示す模式図

【本論】

第 1 章：ヘパラーゼ阻害物質による好中球浸潤の抑制

1-1. ヘパラーゼの活性阻害により好中球の浸潤が抑制された

細胞浸潤過程におけるヘパラーゼの関与を間接的に証明出来る、特異性の高い阻害物質は従来知られていなかったが、最近ウロン酸誘導体である (3S,4R,5R,6R)-4,5-dihydroxy-6-trifluoroacetamido-3-piperidine-carboxylic acid (SF-4) が開発された。マウス骨髄由来好中球細胞可溶化物によるヘパラン硫酸の分解がヘパラーゼの阻害物質である SF-4 によって阻害されるかを蛍光標識ヘパラン硫酸の断片化を指標に調べたところ、SF-4 の濃度依存的に断片化が阻害されることを確認した。また、この物質はマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)-9 の活性を阻害しなかった。

このヘパラーゼ阻害物質が好中球の *in vitro* での遊走能及び浸潤能を抑制するか否かを検証するために、SF-4 存在下及び非存在下で細菌由来の好中球走化性因子 formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) に対する遊走細胞数を、基底膜非存在下(細胞の運動能を評価)及び基底膜存在下(細胞の浸潤能を評価)で測定した。遊走細胞数で示される細胞の運動能は SF-4 の影響を受けなかったが[図 2A]、浸潤細胞数は SF-4 の濃度依存的に有意に減少し、SF-4 及び MMP 阻害物質である MMI-270 の共存下では更に浸潤細胞数が減少した[図 2B]。従って、ヘパラーゼが *in vitro* で測定した好中球の基底膜浸潤に関与することが示された。

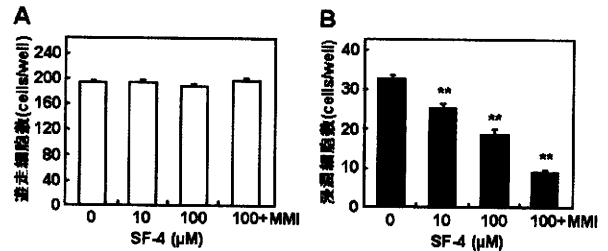


図 2 ヘパラーゼ阻害物質 (SF-4) 存在下における好中球の遊走能及び浸潤能の比較

A SF-4 及び MMI-270 存在下における好中球の遊走能 (基底膜なし) B SF-4 及び MMI-270 存在下における好中球の浸潤能 (基底膜あり) **: $p < 0.01$

1-2. ヘパラーゼの阻害により炎症組織への好中球の浸潤が抑制された

炎症組織への浸潤におけるヘパラーゼの関与を *in vivo* で検証するために、マウス背部皮下に作製した空気嚢内へ 100 μM の SF-4 を含む、又は含まない 1 μM fMLP または 1%カラゲナン溶液を投与した。投与 4 時間後に空気嚢内へ浸潤した細胞を回収して、細胞数を計測した。その結果、何れの炎症惹起刺激においても SF-4 投与時では非投与時と比べて浸潤細胞数が有意に減少し、その割合は fMLP 投与群では約 37%、カラゲナン投与群では約 49%であった[図 3A]。また、ギムザ染色によりこれらの浸潤細胞の種類は好中球と単球であることが示され、SF-4 投与時には何れの場合でも両者の細胞数は有意に減少していた[図 3B]。以上より、SF-4 は好中球の浸潤を抑制することが示された。

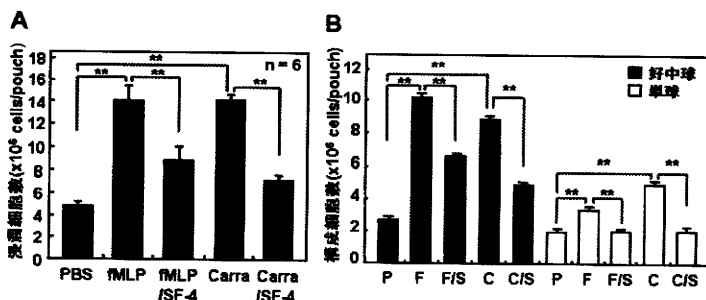


図 3 ヘパラーゼ阻害物質 (SF-4) 投与による空気嚢内への炎症細胞の浸潤抑制

A fMLP およびカラゲナン(Carra)投与 4 時間後の浸潤細胞数
B 浸潤細胞の種類と細胞数、P: PBS、F: fMLP、C: カラゲナン、S: SF-4 **: $p < 0.01$

第2章：好中球におけるヘパラーゼの細胞内分布と炎症性刺激に伴う局在変化

2-1. 好中球のヘパラーゼはケモカイン及び接着分子の刺激により細胞表面に移動した

ヘパラーゼは血管壁基底膜を分解して組織を破壊する潜在的な可能性を持つので、血管外浸潤過程においてその発現は厳密に制御されていると考えた。細胞内外の局在変化によって活性発現が制御される可能性を検討した。まず、細胞内でのヘパラーゼの分布を調べるために、好中球を0.1% Triton X-100にて膜透過処理後、抗ヘパラーゼ抗体による蛍光染色を行った。ヘパラーゼは細胞内で三次顆粒のマーカ分子である MMP-9 と共局在しており、基底膜分解過程への関与が予想される三次顆粒中に他のマトリックス分解酵素と共に貯蔵されていると推定された。

次に、図1に示した好中球血管外浸潤の各過程におけるケモカイン等の刺激、インテグリンのリガンドとの相互作用によってヘパラーゼの細胞内外での局在に変化が見られるかを調べた。好中球の遊走を誘導するケモカインである MIP-2、好中球のインテグリン (CD11b) のリガンドである ICAM-1 を好中球培養上清に加えて、細胞をパラホルムアルデヒド固定し、抗ヘパラーゼ抗体による染色を行った。未処理細胞では細胞表面にヘパラーゼの発現が検出されなかったが、MIP-2 及び ICAM-1 処理後の細胞では細胞表面にヘパラーゼの発現が検出された[図4A、B]。細胞内ではヘパラーゼは顆粒状に局在したが、その分布に極性は認められなかった[図4B]。更に、P-セレクチンまたは ICAM-1 を固相化したスライドグラス上に好中球を接着させ、細胞表面の抗ヘパラーゼ抗体による染色を行った。固相化した P-セレクチン上では細胞表面にヘパラーゼが検出されなかったが、固相化した ICAM-1 上では結合後5分で細胞表面にヘパラーゼが検出された[図4C]。接着面に対するヘパラーゼの細胞表面分布を0.5 μm毎にz軸スキャンして調べたところ、特に局在は認められなかった。以上より、好中球がローリングする際にはヘパラーゼは顆粒内に保持されているが、インテグリンを介する血管壁への強固な接着に伴って細胞表面に移動すると考えられた。好中球はヘパラーゼを細胞表面に発現する際、接着面や特定の部位に局在させるのではなく、細胞表面全体から発現することが示唆された。

2-2. ヘパラーゼを放出した好中球ではヘパラン硫酸の分解能と浸潤能が低下した

2-1で述べた過程を経た好中球は、図1に示すように血管内皮細胞層を通過し、基底膜中に保持されているケモカインやサイトカインからの刺激を受けて三次顆粒の内容物を放出することが予想され、組織側へと到達した好中球は、ヘパラーゼを始めとする基底膜分解に必要なマトリックス分解酵素を既に放出

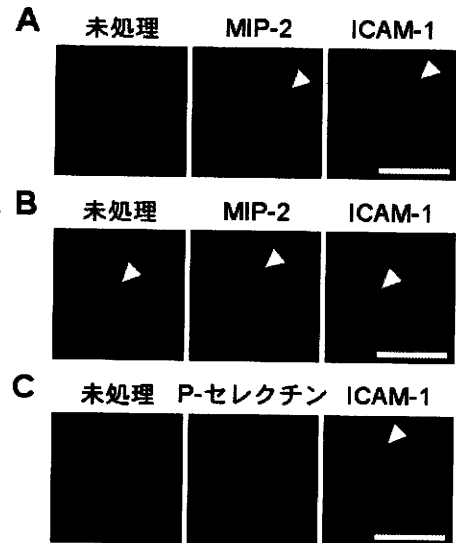


図4 好中球の細胞内と細胞表面におけるヘパラーゼの分布

A、B 可溶性の MIP-2 又は ICAM-1 により刺激した後の細胞表面(A)及び細胞内(B)でのヘパラーゼの発現(矢頭) C P-セレクチン又は ICAM-1 を固相化した好中球を刺激した後の細胞表面でのヘパラーゼの発現 核は灰色で示す スケールバー：10 μm

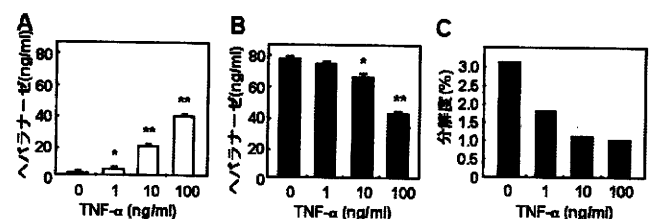


図5 好中球上清及び細胞可溶化物中のヘパラーゼの定量と細胞可溶化物のヘパラン硫酸分解活性

A 上清中のヘパラーゼ濃度 B 細胞可溶化物中のヘパラーゼ濃度 C 細胞可溶化物のヘパラン硫酸分解度 ** : p < 0.01, * : p < 0.05

したために、浸潤能が低下していると考えられた。そこで、サイトカイン刺激により三次顆粒の放出が起こるのか、そしてこれが好中球の浸潤に影響するかどうかを検討した。炎症性サイトカインである TNF- α を用いて好中球を刺激し、刺激後に上清と細胞可溶化物を調製し、各々に含まれるヘパラーゼ量を、サンドイッチ ELISA 法により定量した。その結果、TNF- α の濃度依存的に最大で約 50%のヘパラーゼが上清中で検出され、一方で細胞可溶化物中に含まれるヘパラーゼは最大で約 50%まで減少したことから、ヘパラーゼが TNF- α 刺激により放出されることが確認された[図 5A、B]。またこれらの細胞可溶化物を用いて、ヘパラン硫酸分解活性を比較したところ、細胞可溶化物中に含まれるヘパラーゼの減少に相関してヘパラン硫酸分解の低下が認められた[図 5C]。

脱顆粒が好中球の遊走能及び浸潤能に影響するかどうかを *in vitro* で検証したところ、脱顆粒は遊走能に影響しなかったが[図 6A]、基底膜成分の分解を伴う浸潤能を有意に低下させた[図 6B]。これはマウスで炎症組織に浸潤した好中球がヘパラーゼの発現を欠くという知見(Komatsu, Sue et al. J. Immunol. Methods 331:82-93, 2008)に符合する結果である。以上より、末梢で炎症性サイトカイン刺激を受けた好中球はヘパラーゼを含む顆粒を放出し、それ以降の基底膜分解能を失うことが示唆された。

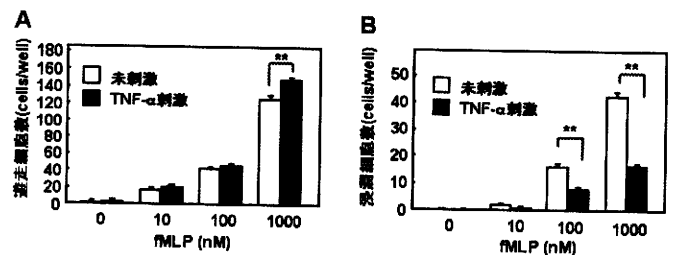


図 6 好中球のfMLPに対する遊走能及び浸潤能の比較

A 好中球の fMLP に対する遊走能 B 好中球の fMLP に対する浸潤能 白：未刺激の好中球 黒：10 ng/ml TNF- α で前処理刺激済みの好中球 **: p < 0.01

【結論】

本研究の結果、ヘパラーゼ阻害物質 SF-4 により、*in vivo* および *in vitro* の両方で好中球の浸潤が部分的に抑制されたことから、ヘパラーゼが MMP と協奏的に血管外浸潤の一翼を担う可能性が示された。また、ヘパラーゼは固相化 P-セレクチン刺激ではその細胞内分布に変化を生じないが、ケモカイン刺激・固相化 ICAM-1 刺激により細胞表面に移動した。また TNF- α 刺激により細胞外に放出された。好中球は血管内皮細胞との相互作用時に、ケモカイン受容体やインテグリンを介する刺激によってヘパラーゼを細胞表面に発現し、また炎症性サイトカインの刺激でこれを放出することにより、図 1 に示す好中球と基底膜が相互作用する時点にあわせてタイミングよくこの酵素を利用するものと考えられる。今回得られた結果はこれを支持するものである。炎症の「実体」である好中球の局所動員機構の解明は炎症性病態形成の抑制探索と治療薬開発における中心課題である。ヘパラーゼの機能阻害による好中球の浸潤抑制は、抗炎症薬における新しい標的を提示するものとして期待される。