

審査の結果の要旨

氏名 須江真由美

「炎症局所の好中球浸潤におけるヘパラーゼの関与」と題する本論文では、好中球が血管内から組織に浸潤し、局所において炎症を起こす過程において、細胞外マトリックス分解酵素の一つであるヘパラーゼが実際に浸潤に重要な役割を担っているか、また浸潤の過程でどのような制御を受けているか、を明らかにした結果が述べられている。ヘパラーゼは、細胞外マトリックスのうちで基底膜を形成する主要な成分であって基底膜が細胞や巨大分子を通過させないバリア機能を保つために必須なヘパラン硫酸を切断するエンド型の酵素である。1980年前後に発見され、メラノーマにおいてその活性レベルが肺への転移性に相関する分子として注目され、1999年前後に遺伝子が同定されるに至って類似の酵素が存在しないことが事実となり、浸潤性を持つ細胞に特徴的に発現する酵素なのではないかと考えられるようになった。高い浸潤性を持つ好中球において、遺伝子発現と酵素活性の発現は知られていたが、実際に浸潤に必須であるかどうか、また血管や組織を破壊せずに浸潤するための制御機構がいかなるものであるかは明らかにされていなかった。このような状況下で学位申請者は新たに開発されたヘパラーゼ阻害物質を用い、またマウスヘパラーゼに対するモノクローナル抗体を用いて長年未解決であった問題に挑戦した。

第一章は序論であり、好中球の生物学、ヘパラーゼに関するこれまでの知見などが、未解決の問題点の指摘とともに述べられている。

第二章では、最近、ウロン酸誘導体である (3*S*,4*R*,5*R*,6*R*)-4,5-dihydroxy-6-trifluoroacetamido-3-piperidine-carboxylic acid (SF-4) がヘパラーゼ阻害物質として開発されたので、その好中球浸潤過程への影響を検討した結果が述べられている。マウス骨髄由来好中球細胞可溶性物によるヘパラン硫酸の分解が 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、この物質は基底膜分解と細胞浸潤に重要と考えられている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。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、基底膜非存在下と基底膜存在下で測定した結果、SF-4 は細胞の運動能に影響しないにもかかわらず、基底膜を通過する浸潤細胞の数が有意に減少した。すなわち、ヘパラーゼが好中球の基底膜浸潤に重要な役割を持つことが示された。次に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炎症惹起物質を投与した。

SF-4 存在下または非存在下で 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、SF-4 投与時では非投与時と比べて浸潤した細胞数が有意に減少した。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 投与時には両者の細胞数ともに有意に減少した。以上より、SF-4 は好中球の浸潤を抑制すること、またヘパラーゼが *in vivo* においても好中球の浸潤に重要であることが示された。

第三章の第一節では、炎症時に発現するケモカインや接着分子からの影響によって、好中球のヘパラーゼがどのように分布を変えるかを明らかにした結果が述べられている。免疫細胞化学的な方法により、定常状態ではヘパラーゼは好中球細胞内で三次顆粒に他のマトリクス分解酵素と共に貯蔵されていると推定された。好中球は活性化された血管内皮細胞表面に発現する P-セレクチンとの相互作用に基づいてローリングを起こし、その後にインテグリンとそのレセプターである ICAM-1 を介して強固に接着することが知られていた。そこで固相化した P-セレクチンまたは ICAM-1 を固相化して、これらに結合した際の好中球におけるヘパラーゼの細胞内外における分布の変化を細胞化学的に調べた。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。固相化 P-セレクチンに接着した後はヘパラーゼの分布に変化は見られなかったが、固相化 ICAM-1 に接着した後は細胞表面にヘパラーゼが表出することがわかった。すなわち好中球の浸潤過程において、ヘパラーゼは基底膜を通過する直前に細胞表面に移動する可能性が高いことがわかった。同様なヘパラーゼの細胞表面への移動は、内在性走化性因子である MIP-2 または可溶性の ICAM-1 によっても引き起こされた。ヘパラーゼが浸潤先端の一方向に局在することが、以前マクロファージの浸潤において観察されていたが、上記した刺激後の好中球におけるヘパラーゼの分布を共焦点顕微鏡で詳細に検討したが、一方向への局在は見られなかった。

組織化学的な観察から、炎症組織内に移動した好中球ではヘパラーゼの発現レベルが低いと考えられた。そこで、ヘパラーゼが細胞表面の局在した後に放出される可能性を追究し、その結果が第三章の第二節に述べられている。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。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。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検証したところ、TNF- α 刺激は遊走能には影響しなかったが、基底膜成分の分解を伴う浸潤能を有意に低下させることが判明した。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され、好中球浸潤においてヘパラーゼが効率よく使われ、その後はこの細胞が組織に留まる結果となることが強く示唆された。

以上のように学位申請者は、好中球が血管から組織の局所に動員されそこに留まって感染原を除去するなどの重要な機能を担うためにヘパラーゼが深く関与することを示した。解明された内容から、炎症性病態形成のプロセスを明らかにし、その抑制法を開発できる。特に、ヘパラーゼの阻害を通して好中球の浸潤を抑制することは、抗炎症薬の開発における新しい標的を提示するものとして期待される。これらの結果は、糖鎖生物学、病理学及び免疫学に資するところが大きい。よって、これらの研究を行った須江真由美は博士(薬学)の学位を得るにふさわしいと判断した。