

学位論文題名

Autocrine production of epithelial cell-derived
neutrophil attractant-78 induced
by granulocyte colony-stimulating factor in neutrophils

(顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) による好中球の
epithelial cell-derived neutrophil attractant-78 (ENA-78) の自己分泌)

学位論文内容の要旨

顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) は、骨髄前駆細胞から好中球への分化、成熟を促進し、さらに成熟細胞の機能を亢進させる (好中球の寿命を延長させ、活性酸素の産生と貪食能を高める) サイトカインとして知られており、これらの効果に基づき現在好中球減少時の重症感染症において広く用いられている。一方、好中球の重要な機能の一つとして、生体の炎症部位への動員が挙げられるが、G-CSF が好中球の炎症部位への動員を刺激するかどうかについてはまだ解明されていない。今回我々は、好中球動員に対する G-CSF の効果並びにその機序について、好中球に発現している遺伝子に対する G-CSF の効果を検討することにより解明しようと試みた。まず好中球に発現している 9000 以上の遺伝子について DNA マイクロアレイ法により G-CSF 刺激下および非刺激下での発現を比較検討し、さらに好中球の走化性を *in vitro* で検討することにより、特定の遺伝子に対する G-CSF の効果および好中球の走化性亢進との関連を確認した。

この実験において、好中球の走化因子として報告されている epithelial cell-derived neutrophil attractant-78 (ENA-78) の messenger RNA (mRNA) 発現が、G-CSF 刺激下において非刺激下と比較し 1.7 倍高く誘導されることが確認された。また G-CSF 刺激下での好中球は走化性が亢進するが、抗 ENA-78 抗体および抗 CXCR-2 抗体により走化性が抑制されることが示された。これらの所見より、G-CSF により好中球における ENA-78 の自己分泌が誘導され、好中球の炎症部位への動員を高めることが示唆された。

実験方法

1. 試薬 G-CSF は協和発酵より提供を受けた。2 μ g/kg の G-CSF を点滴静注した場合の血漿中 G-CSF 濃度は 20ng/ml である。抗 ENA-78 抗体および抗 CXCR-2 抗体は R&D Systems (Minneapolis, MN) より購入した。
2. 細胞 好中球は健常人より採取した末梢血より以下の方法で分離した。末梢血単核球を Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) により遠心分離除去し、沈殿物を 2% メチ

ルセルロースとともに混和し赤血球分画と好中球分画に分け、更に好中球分画に混入している赤血球を低張性ショックにより除去した。得られた好中球はリン酸緩衝液で2度洗浄した。この方法で得られた好中球の純度は99%であった。

3. DNA マイクロアレイ法 G-CSF10ng/ml 処理または未処理の好中球を Trizol Reagent (Life Technologies, Tokyo, Japan)とともに24時間培養し total RNA を抽出した。更に mRNA を total RNA より Quickprep mRNA purification kit (Amersham Pharmacia Biotech)を用いて抽出した。遺伝子の発現量の違いを DNA マイクロアレイ (UniGEM human(Kurabo industries, Osaka Japan)で振り分けた。
4. ノーザンプロット解析 total RNA 20 μ g を 1.2%ホルムアルデヒドアガロースゲル上で電気泳動しナイロン膜 (Hybond N, Amersham) に移した。その後、膜を random primer DNA labeling kit (Takara biomedical, Tokyo, Japan)を用いて 32 P で標識した ENA-78 に対する相補的 DNA(cDNA) プローブでハイブリッド形成を行い、膜を洗浄後 X 線フィルムに写した。ENA-78 に対する cDNA 断片は reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)法で増幅しクローニングを行い、ノーザンプロット解析のためのプローブとして用いた。ENA-78 の PCR プライマーの塩基配列を示す。Forward; GGTTGGATGCTCTTGTCCTCAA , reverse; CCTTCCAGAAAGTCTTCTAT
5. Fluorescence activated cell sorter (FACS) 解析 抗 CXCR-2 抗体および二次抗体で染色した後、細胞を FACS caliber (Becton Dickinson, Mountain View, CA)を用いて解析した。
6. Transwell chamber 解析 好中球の走化性を評価するため、下記の方法で Transwell chamber (Coster, Cambridge, MA)解析を行った。G-CSF で処理し 24 時間培養した後 RPMI-1640 培養液で 2 度洗浄した好中球をさらに 24 時間培養した。その上清 (600 μ l) を 20%に希釈し、100 μ l 中に好中球を浮遊させた。RPMI-1640 培地をそれぞれ上下の chamber に置き、4~8 時間培養したのち下段の chamber に移動した細胞数を倒立顕微鏡下で少なくとも 20 箇所において測定した。陽性コントロールとして組み換え型 ENA-7810ng/ml を chamber 下段に加えた系を作成した。また、chamber 下段に抗 ENA-78 抗体または抗 CXCR-2 抗体を 2 μ g/ml まで加えた系も作成した。

結果： G-CSF 未処理の好中球と比較し処理後の好中球において2倍あるいは3倍の mRNA 発現を認めた遺伝子はそれぞれ 122 個および 50 個であった。この中で特に好中球の走化因子として知られる ENA-78 および granulocyte chemotactic protein-2(GCP-2)はそれぞれ 17 倍、4 倍と高い増強が認められた。ENA-78 は G-CSF で処理していない好中球では発現が認められないが、G-CSF の量に依存して発現の増強が認められた。また ENA-78 の受容体である CXCR2 も ENA-78 と同様の発現を示した。また G-CSF で処理された好中球培養上清によっても好中球の走化性は増強した。一方、組み換え型 ENA-78 によって高められた好中球の走化性は抗 ENA-78 抗体および抗 CXCR-2 抗体により抑制された。これらの結果より、G-CSF で刺激された好中球は ENA-78 を自己分泌し、その結果好中球の走化性が亢進し、炎症部位への好中球の動員を高めていることが示唆された。

これらの実験結果は、好中球減少時の感染症に対する G-CSF 投与に際しての G-CSF の役割を解明する一端となることが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 武 藏 学

副 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 小 林 邦 彦

学 位 論 文 題 名

Autocrine production of epithelial cell-derived neutrophil attractant-78 induced by granulocyte colony-stimulating factor in neutrophils

(顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) による好中球の
epithelial cell-derived neutrophil attractant-78 (ENA-78) の自己分泌)

顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) は、骨髄前駆細胞から好中球への分化、成熟を促進し、さらに成熟細胞の機能を亢進させる (好中球の寿命延長、活性酸素の産生と食食能の増強など) サイトカインとして知られており、現在好中球減少時の重症感染症に広く用いられている。一方、好中球が機能を発揮するためには、炎症部位に動員されることが必須であるが、G-CSF が好中球の炎症部位への動員を刺激するかどうかについてはまだ解明されていない。本研究では、好中球遊走能に対する G-CSF の効果とその機序を明らかにするため、DNA microarray にて G-CSF 処理後に好中球において発現が増強する遺伝子を探査し、遊走刺激因子の同定を試みた。

健康人より採取した末梢血より好中球を分離し実験に用いた。分離した好中球の純度は99%以上であり、得られた好中球について、G-CSF(10ng/ml)を加えて24時間培養し、洗浄後さらに24時間培養したもの(G-CSF 処理好中球)と、G-CSF 未処理好中球との間でそれぞれm-RNAを抽出しDNA microarrayを行った。DNA microarrayにより9000個以上の遺伝子の発現の違いをG-CSF 処理好中球と未処理好中球との間で比較したところ、G-CSF 処理後に3倍以上発現が亢進した遺伝子は50個同定されたが、この中で最も発現が亢進したENA-78についてノーザンプロット解析でmRNA発現亢進を確認した後、ENA-78の好中球遊走刺激能を以下の方法で検討した。transwell chamber assay法を用いて、G-CSF 処理好中球培養上清と未処理好中球培養上清をそれぞれchamberの下段に入れ、4~8時間培養した後上段から下段へ遊走した好中球数を測定することによりchemotaxisを検討した。更に、G-CSF 処理培養上清に抗ENA-78抗体並びにENA-

78 のレセプターである CXCR2 に対する抗 CXCR2 抗体を入れた系も作成し、遊走能が抑制されるか否かを検討した。なお、G-CSF 処理前後の好中球における CXCR2 の発現の変化については FACS 解析で検討した。

これらの実験の結果、G-CSF 処理好中球培養上清を用いると、未処理好中球培養上清を用いた場合と比較して好中球の遊走能が約 3 倍増強し、その遊走能は抗 ENA-78 抗体および抗 CXCR2 抗体によりほぼ完全に抑制された。本研究にて、G-CSF 処理によって好中球から遊走刺激因子である ENA-78 が産生され、その結果好中球の遊走が増強されることが明らかとなった。したがって、G-CSF が好中球の増加に加えて好中球の炎症局所への動員を加速する可能性が示唆され、感染症に対する G-CSF の新しい効能が提示されたと考えられる。

公開発表にあたって、副査の小林教授より、DNA microarray で G-CSF 処理後発現が減弱する遺伝子についての検討の有無、G-CSF 処理後の好中球遊走刺激に対する他の遺伝子の関与の可能性、ENA-78 以外の DNA microarray で発現が増強している遺伝子について必ずしもノーザンブロット解析で発現増強が見られない理由について質問があった。これに対して申請者は、G-CSF 処理後に発現の減弱する遺伝子も認められたが本研究においては未検討であること、G-CSF 処理後の遊走能刺激は抗 ENA78 抗体および抗 CXCR2 抗体により完全には抑制されないことから ENA-78 以外の因子が遊走刺激に関与している可能性があること、DNA microarray とノーザンブロット解析の結果の相違については前者での偽陽性はその理由として考えられると回答した。次いで、副査の浅香教授より、transwell chamber 法の説明が求められ、また好中球における G-CSF 処理後の ENA-78 発現の蛋白レベルでの検討の有無について質問があった。これに対し申請者は、細胞の大きさより小さい chamber 間の孔を通り抜けるためには好中球が正常に遊走する必要があり、遊走能を客観的に検討しうる方法であることを説明し、G-CSF 処理後の好中球における ENA-78 の発現をウエスタンブロット法並びに免疫染色法にて検討したが発現が弱く検出されなかったと回答した。最後に主査の武蔵教授からは、G-CSF 処理後の ENA-78 の発現増強に対する negative feedback の機構についての知見、stem cell の遊走に対する ENA-78 の臨床応用の可能性についての考察が求められた。これに対し申請者は、他の因子との相互作用によって negative feedback の機構が働く可能性があるが本研究においては未検討であること、stem cell に対する ENA-78 の効果を検討することは現時点で困難と考えられるため、in vivo における好中球減少時の G-CSF 投与に際し、ENA-78 が実際にどのように関与しているのかを検討していきたいと回答した。

本研究は、G-CSF 処理により好中球から遊走刺激因子である ENA-78 が産生され、その結果好中球の遊走が増強することを明らかにし、また ENA-78 が好中球からも産生されることを初めて報告した点で高く評価される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと判定した。