

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591473

研究課題名(和文) 走化性を示す細胞が走る向きを決める仕組みを解き明かす。

研究課題名(英文) Elucidating how cells migrating to chemoattractants determine the direction.

研究代表者

山内 明 (YAMAUCHI, Akira)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80372431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性疾患の発症機構を解明するために、炎症反応で重要な好中球の走化性惹起因子に対する遊走パターンを解析した。好中球のfMLPおよびIL-8への遊走の軌跡は直線状であること、LTB4およびPAFへの遊走の軌跡は蛇行することを確認した。fMLPおよびIL-8への直線状の遊走では単極性で安定的な形態が、LTB4、およびPAFへの蛇行する遊走では多極性で不安定な形態が関連していた。また、これら4種のリガンドの強さはfMLP > IL-8 >> LTB4 = PAFであることが明らかとなった。これらの知見は今後の炎症コントロールおよび抗炎症剤の開発などに役に立つものと思われる。

研究成果の概要(英文)：To clarify the mechanism of pathogenesis in inflammatory diseases, we analyzed chemotaxis pattern of neutrophils to chemoattractants. The migration pattern to fMLP or IL-8 was linear, but the pattern to LTB4 or PAF was winding and twisting. The linear pattern of migration to fMLP or IL-8 was related to the unipolar and stable morphology of the cells. By contrast, the winding and twisting pattern of migration to LTB4 or PAF was related to the multipolar and unstable morphology. Also, we found that the priority order among these 4 ligands in neutrophil chemotaxis was as follows: fMLP > IL-8 >> LTB4 = PAF. These findings contribute to controlling inflammation and the development of new anti-inflammatory agents.

研究分野：生化学

キーワード：走化性 好中球 ケモカイン 脂質メディエータ 炎症 fMLP IL-8 PAF

1. 研究開始当初の背景

炎症性疾患では好中球や好酸球、マクロファージなどの免疫担当細胞が過剰に反応することで発症することが知られており、そのメカニズムとしてサイトカインへの過剰反応や病原体のパターン認識受容体による反応が指摘されている。これらの炎症の初期に観られる細胞走化性の解析では、従来の方法(ボイデンチェンバー法)では細胞数のみの定量にとどまり、詳しい評価には限界があった。研究代表者は、様々な細胞が多様な走化性因子に反応する場合、その遊走過程、即ち遊走の方向性や速さには、細胞や走化性因子に特異的な反応様式があるという仮説を立て、解析を進めてきた。その中で、細胞動態をリアルタイムで撮影・解析する細胞動態解析装置 TAXIScan(J Immunol Methods, 282, 1-11, 2003)の開発に携わり、この装置を用いて多くの細胞の走化性を解析してきた。その結果、ヒト好中球の走化性反応では細菌壁由来走化性因子 N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP)やマクロファージ等が分泌するケモカイン interleukin-8 (IL-8)に対しては濃度が高い方へ直線的に遊走し、生体内の細胞膜由来の leukotriene B4 (LTB₄) または platelet activating factor(PAF)に対しては蛇行しながら遊走することを見出した。また、研究代表者らはこの方法で炎症性疾患患者の血球を解析することにより気管支喘息患者・アレルギー患者・健常者ではこの順番に好酸球の走化性が亢進していることを見出した(J Immunol Methods, 320, 155-163, 2007)。これらの知見より生体内では異なる炎症細胞や走化性因子に対して特異的な炎症反応が起こることが示唆されると共に、細胞動態解析が診断に適用可能なことが示され、この細胞動態解析方法が、診断、病態の把握、細胞反応の制御のためのツールとして役に立つ可能性が広がった。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は炎症性疾患の発症機構の解明を診断・治療へ役立てるために、細胞走化性に関わる多様な受容体の活性化機構の相違を解明することである。本課題では fMLP, IL-8, LTB₄, PAF の各因子の走化性惹起機構および受容体活性化機構の解析により、炎症惹起に重要な細胞走化性機構の解明を目指す。

具体的には

- (1) ヒト末梢血好中球の各種走化性惹起因子への遊走パターンを確認する。
- (2) 各種走化性惹起因子への遊走時の好中球の形態を詳しく解析し、上記遊

走パターンとの関連性を見出す。

- (3) 各種走化性惹起因子のうち、どの走化性因子が最も強く、他の因子よりも優先して働くのかを明らかにする。

3. 研究の方法

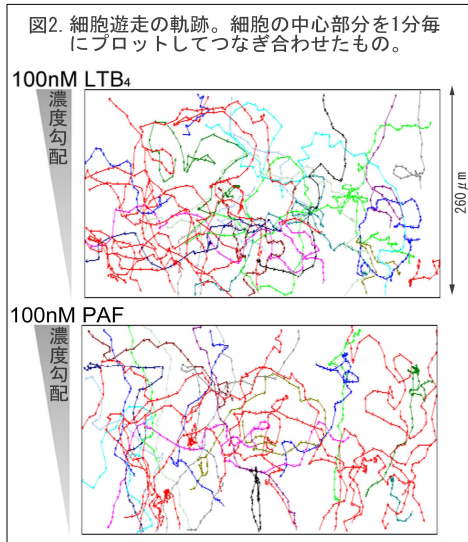
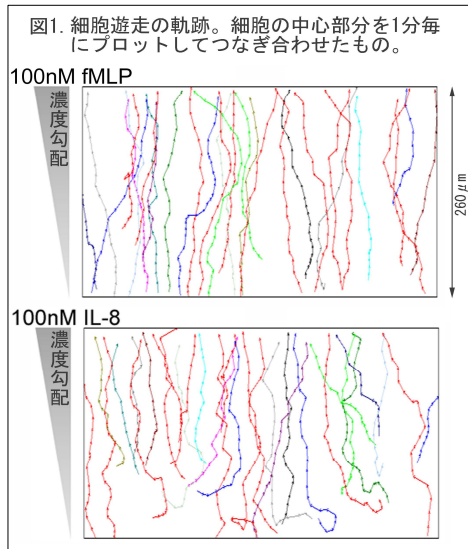
(1) ヒト末梢血好中球の遊走パターンの確認: ヒト末梢血好中球は健常人ボランティアから採取し、密度勾配遠心とデキストランで分離した。走化性は、リアルタイム細胞動態解析装置 TAXIScan で記録・解析した。

(2) 遊走中の好中球の形態の詳しい解析: TAXIScan を用いて高倍率の対物レンズ(100x)にて遊走中の好中球を解析し、細胞の形態、特に仮足を形成することでできる極性に注目して遊走パターンとの関連性を比較した。

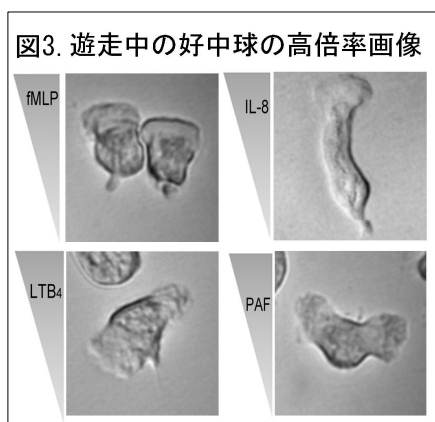
(3) 走化性因子の優先性の検討: 走化性因子(fMLP, IL-8, LTB₄, PAF)を種々の濃度で混合して遊走パターンを検証することで、どの走化性因子が最も強力で、好中球の形態を変えうる能力があるかを検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト末梢血好中球の遊走パターンの確認: 4種の走化性刺激因子(リガンド)を濃度を段階的に変えて走化性を観察し、100nM 付近で最も効果的に走化性を惹起することが分かり、以後、100nM を投入濃度として実験を行った。安定的な濃度勾配のある微細流路では、ヒト好中球は、ペプチドである fMLP またはタンパク質 IL-8 に対しては直線的に遊走することを確認した(図1)。一方、脂質メディエータの LTB₄ あるいは PAF に対しては蛇行する遊走パターンが確認された(図2)。つまりリガンドによって遊走パターンが異なることが示された。これは、リガンドの物性の違い、リガンド-受容体の結合様式、受容体以下のシグナル伝達のが異なるためだと考えられた。



(2) 遊走中の好中球の形態の詳しい解析：遊走中の好中球を高倍率のレンズで観察したところ、fMLP に対する遊走像では、単一の葉状仮足が形成され、安定した形態を保っていた。また、IL-8 に対する遊走像では、単一の葉状仮足と前後に細長い形態をとり比較的安定した形態であった。これらに対して、LTB₄あるいはPAFへの遊走像では、葉状仮足が複数形成され、不安定な形態を示した(図3)。このような極性の数(単極性が多極性か)および形態の安定性が、遊走パターンを違いに反映されているものと考えられた。



(3) 走化性因子の優先性の検討：好中球の直線的な走化性を惹起する fMLP あるいは IL-8 と、蛇行する遊走パターンを惹起する LTB₄あるいは PAF の 4 者のうち、2 者を混合して走化性を観察したところ、濃度によって異なる反応を示した。100nM の fMLP あるいは IL-8 に対して 1~100nM の LTB₄あるいは PAF を混合しても強い直線状の方向性は不変であった(図4)。一方、100nM の LTB₄あるいは PAF に対して 1~100nM の fMLP あるいは IL-8 を混合したところ、混合なしでは蛇行していた遊走が、1nM の fMLP あるいは IL-8 を混合しただけで強い直線性の遊走パターンを示した(図5)。細胞の形態観察に於いても、1nM の fMLP あるいは IL-8 を混合しただけで多極性から単極性へ、不安定な形態から安定的な形態へと異なる形態を示した。fMLP と IL-8 を混合した場合は若干ながら fMLP の作用が強く、IL-8 の細長い形態が、短い fMLP 単独の遊走形態となった。

図4. 100nMのfMLPに種々の濃度のリガンドを混合した時の好中球遊走の方向性。一分毎の角度の平均値を箱ひげ図でプロットした。

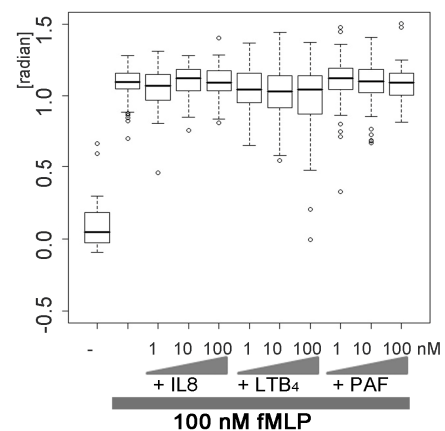
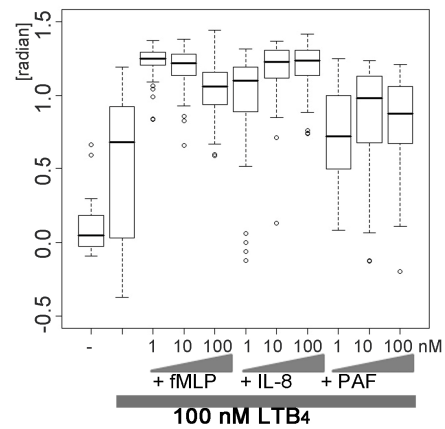


図5. 100nMのLTB₄に種々の濃度のリガンドを混合した時の好中球遊走の方向性。一分毎の角度の平均値を箱ひげ図でプロットした。



これらの知見より、ヒト好中球に及ぼす 4 種の走化性惹起因子の影響力の強さは、方

向性を指標とすると、

fMLP > IL-8 >> LTB₄ = PAF

の順番となることが分かった。これは、内因性のリガンドよりも、細菌由来のリガンド fMLP が最も強い集積能力があり、炎症においては好中球の局所への浸潤を惹起しているものと考えられた。これに次いでケモカイン IL-8 も直接的な炎症細胞の終結に関与していることが考えられた。また、脂質メディエータ LTB₄ あるいは PAF は、炎症惹起には関わるものの、局所への最終的な細胞集積には働いていないことが考えられた。これらの受容体の活性化機構の違いの検討は今後の課題である。本成果は今後の炎症コントロールおよび抗炎症剤の開発などに役に立つものと思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Akira Yamauchi, Mikako Degawa-Yamauchi, Futoshi Kuribayashi, Shiro Kanegasaki, and Tomoko Tsuchiya. Systematic single cell analysis of migration and morphological changes of human neutrophils over stimulus concentration gradients. *Journal of Immunological Methods*. 査読有り. 2014 Feb;404:59-70.

doi: 10.1016/j.jim.2013.12.005.

Masataka Uchida, Eri Oyanagi, Motohiko Miyachi, Akira Yamauchi, and Hiromi Yano. Relationship between macrophage differentiation and the chemotactic activity toward damaged myoblast cells. *J Immunol Methods*. 査読有り. 2013 Jul 31;393(1-2):61-9.

doi: 10.1016/j.jim.2013.04.007.

Akira Yamauchi, Christophe Hadjur, Tadahito Takahashi, Itaru Suzuki, Kunitaka Hirose, and Yann F. Mahe. Human skin melanocyte migration towards stromal cell-derived factor-1 demonstrated by optical real-time cell mobility assay: modulation of their chemotactic ability by α -melanocyte-stimulating hormone. *Exp Dermatol*. 査読有り. 2013 Oct;22(10):664-7. doi: 10.1111/exd.12232.

[学会発表](計4件)

Akira Yamauchi. Formyl peptides and chemokines augment neutrophil accumulation at the inflammation sites whereas lipid mediators support the recruitment. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013. 2013/12/11-13. Makuhari Messe (Chiba).

Takeaki OKAMOTO, Ayuka TAGASHIRA, Akira YAMAUCHI, Takuya SUGAHARA. Effects of PAA and 4-AP on chemotaxis of eosinophil derived from human peripheral blood. The 86th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society. 2013/09/11-13. PACIFICO Yokohama (Yokohama).

Hiromi Yano, Masataka Uchida, Eri Oyanagi, Akira Yamauchi, Michael J. Kremenik. Relationship between macrophage differentiation and the chemotactic activity toward damaged muscle cells. The 11th International Society of Exercise and Immunology (ISEI) Symposium. 2013/09/09-12. Newcastle, Australia.

Akira Yamauchi, Shiro Kanegasaki, and Futoshi Kuribayashi. Robust directionality in neutrophil chemotaxis toward the end-target chemoattractant fMLP: an optical approach to the mechanism. International Endotoxin and Innate Immunity Society Meeting 2012 (IEIIS2012) and the 2nd Homeostatic Inflammation Symposium (HIS2012). 2012/10/23-26. National Center of Sciences Hitotsubashi Memorial Hall (Tokyo).

[図書](計1件)

岡本 威明、山内 明. 一般社団法人生物機能研究所. 「生物機能実験法(山田耕路 編著)」 2013. 14 ページ (p.53-66).

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://kwweb-res.kawasaki-m.ac.jp/kwmp/KgApp?section=13&kyoinId=Kgyygygy>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山内 明 (YAMAUCHI, Akira)
川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 80372431

(2)研究分担者

栗林 太 (KURIBAYASHI, Futoshi)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号: 60251443

(3)研究協力者

山内 三爵子 (DEGAWA-YAMAUCHI, Mikako)
フェニックスメディカルクリニック・内科・部長

金ヶ寄 史朗 (KANEGASAKI, Shiro)
Yeungnam University

土屋 朋子 (TSUCHIYA, Tomoko)
Yeungnam University

小日置 佳代子 (KOBIKI, Kayoko)
川崎医科大学・医学部・実験補助員

板谷 益美 (ITADANI, Masumi)
川崎医科大学・医学部・実験補助員