

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月10日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590397

研究課題名（和文）マクロファージと好中球における Pentraxin 3 の発現制御機構と病態解析
 研究課題名（英文）Expression mechanism and pathological significance of Pentraxin 3 in macrophages and neutrophils.

研究代表者

内藤 眞 (NAITO MAKOTO)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：30045786

研究成果の概要（和文）：Pentraxin 3 (PTX3)は潰瘍性大腸炎の腺窩膿瘍の好中球から放出され、病態の免疫機構に関与する。好中球の PTX3 陽性像が Lactoferrin の局在と合致したことより、PTX3 は特殊顆粒に存在することが示された。IL-8 の添加培養で好中球の PTX3 は放出され、Neutrophil Extracellular Traps (NETs)と呼ばれる好中球の不規則な網状構造に付着した。マクロファージでは細胞質に細顆粒状に PTX3 が観察された。好中球、マクロファージに刺激を加えて培養すると PTX3 の産生、分泌が亢進した。PTX3 が NETs に結合することは微生物を効率的に殺す新しい抗菌機構とも考えられた。

研究成果の概要（英文）：Neutrophils in colonic mucosal tissue of patients with ulcerative colitis were main cellular source of Pentraxin 3 (PTX3) protein, suggesting that PTX3 protein may contribute to cell-mediated immune defense in inflamed colon tissue of patients with ulcerative colitis. PTX3 protein was found to be present together with lactoferrin⁺-specific granules localized in neutrophils. Upon IL-8 stimulation, PTX3 is released from PMNs and localized in Neutrophil Extracellular Traps (NETs) formed by extruded DNA. Macrophages showed granular positivity of PTX3. Secretion of PTX3 from stimulated neutrophils and macrophages was confirmed in culture. Binding of PTX3 on NETs appeared to be a defense mechanism against pathogens.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：人体病理学

キーワード：マクロファージ、好中球、Pentraxin 3、潰瘍性大腸炎

1. 研究開始当初の背景

Pentraxin 3 (以下 PTX3)は共通する C 末端 domain (pentraxin domain)を有する superfamily の一員であり、C-reactive protein (CRP)は short PTX と称され、PTX3 は long PTX family に属する。両者は炎症や免疫において重要な役割を担うが、CRP が肝臓で産生されるのに対し、PTX3 は炎症局所においてマクロファージ、樹状細胞、好中球、血管内皮細胞など種々の細胞から産生されることが知られている。しかし、細胞内の局在や分泌機構については不明の点が多い。

2. 研究の目的

本研究においては、潰瘍性大腸炎における PTX3 の発現とその意義を検討した。また、PTX3 のマクロファージにおける局在と、好中球内特殊顆粒やアズール顆粒との関連を研究した。また、活性化好中球では不規則な網状形態構造が見られたが、この構造と PTX3 局在との関係についても検索した。

3. 研究の方法

病理学的観察：潰瘍性大腸炎の生検組織について、抗 PTX3 抗体、抗 CD15 抗体 (好中球)、抗 CD163 抗体 (マクロファージ)、抗 IL-8 receptor β 抗体 (好中球) を用いて免疫染色を行った。潰瘍性大腸炎の重症度判定には Matts の分類を用いた。

細胞学的観察：好中球と単球を分離し、chamber slide に細胞を播種し、4%パラホルムアルデヒド加 PBS で固定し、0.5% Triton X-100/PBS で室温、5 分間処理した。PBS で洗浄し、10%ヤギ血清を用いて室温で 30 分ブロッキングした。一次抗体をそれぞれ適切な濃度に 1% BSA/ 0.1% NaN₃/PBS を用いて希釈し、0.2% Triton X-100/PBS となるように調整して室温で 1 時間反応させた。二次抗体に Alexa Fluor 488 ヤギ抗マウス IgG 抗体、または Alexa Fluor 568 ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) を使用し、室温で 1 時間反応させた。一次抗体を標識して二重染色する場合は、Zenon Mouse IgG1 Labeling Kits (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) を使用した。PBS で洗浄後、Prolong Gold

Antifade Reagent with DAPI (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) で核染色後封入した。免疫蛍光染色の観察には共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510 META; Carl Zeiss, Jena, Germany) を使用した。

電顕観察には走査型電子顕微鏡 (S-2380N, or S-4300E/N, Hitachi, Tokyo) を使用した。

好中球とマクロファージの培養：健康人末梢血から分離して細胞数を調整した好中球またはマクロファージ浮遊液を 2 chamber slide (Lab-Tek., Nunc Inc, Naperville, IL, USA) に播種し、5% CO₂、37°C で 1 時間培養した。単球培養には GM-CSF (granulocyte/macrophage colony stimulating factor) を加えてマクロファージに分化させた。そこに IL-8 100ng/ml (CXCL8/IL-8, R&D, No. 208-IL) または LPS 100ng/ml (Lipopolysaccharides from E. coli O55:B5, Sigma No. L5418) を適当量加えて混合し、5% CO₂、37°C で 40 分間培養し、活性化好中球および活性化マクロファージとした。

4. 研究成果

(1) 潰瘍性大腸炎と PTX3

潰瘍性大腸炎は好中球の浸潤を特徴とする原因不明の炎症性腸疾患の一つであり、粘膜上皮の腺管内に好中球が集合する陰窩膿瘍は病理診断の鍵となる。

われわれは潰瘍性大腸炎の炎症の重症度を組織学的に 5 段階に分類し、抗 PTX3 抗体および好中球やマクロファージに対する抗体を用いて免疫組織学的に検討した結果、潰瘍性大腸炎においては炎症の組織学的な重症度が高いほど好中球を主とする PTX3 陽性細胞が増加し、PTX3 の発現は炎症の程度を反映することが示された。腺上皮細胞間に侵入している好中球や、腺窩膿瘍内に存在する好中球に PTX3 の発現が観察された。病変粘膜内にマクロファージも増加するが、二重染色では PTX3 陽性細胞のほとんどが好中球で、一部がマクロファージであった (図 1)。同時に DNA 染色で潰瘍性大腸炎病変の腺窩膿瘍内の不整形の塊と円形の核を有する好中球も染めだされ、腺窩膿瘍内で好中球から後述の NETs が形成されることが示唆された。

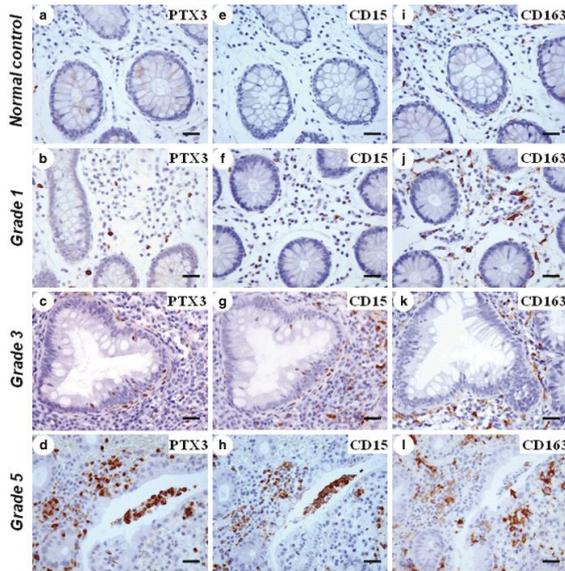


図 1. 潰瘍性大腸炎の免疫染色。

(a) 正常大腸粘膜 (b) Grade 1 (c) Grade 3 (d) Grade 5. 重症になると好中球が増加し、Grade 5 では腺窩膿瘍が見られる。

(2) 好中球における PTX3 の局在

共焦点レーザー顕微鏡の観察では、好中球細胞質内に PTX3 陽性像が顆粒状に見られ、蛍光免疫二重染色によって好中球内の特殊顆粒に存在する Lactoferrin と局在が合致したことより、PTX3 は特殊顆粒に存在することが示された(図 2)。走査電子顕微鏡では IL-8 で刺激した好中球の崩壊と、網状構造の形成が観察された(図 3)。IL-8 を添加して好中球を培養すると電子顕微鏡像と同様に好中球の変性と細胞死が認められ、不規則な網状形態構造を示すヘキスト陽性像がみられた(図 4)。また、この構造に付着して PTX3 陽性顆粒が観察され、Lactoferrin の局在ともほぼ一致した。また、アズール顆粒に存在する Azurocidin もこの構造に付着して観察された。この不規則な網状形態を示すヘキスト陽性像は Neutrophil Extracellular Traps (NETs)と呼ばれる構造に合致した。

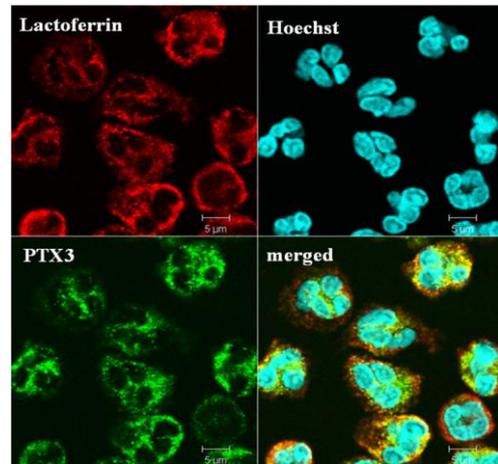


図 2 : 好中球における PTX3 の局在

PTX3 と Lactoferrin の局在が合致している。

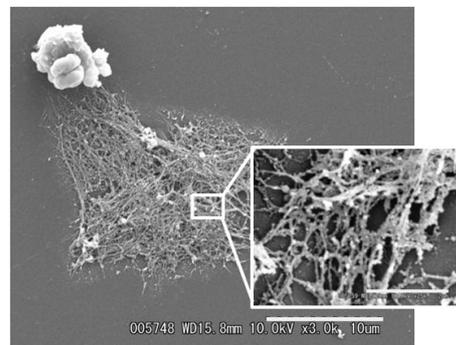


図 3 : IL-8 刺激好中球の走査電子顕微鏡像

細胞は崩壊し、網状の構造が形成され、これは NETs に合致した形態である。

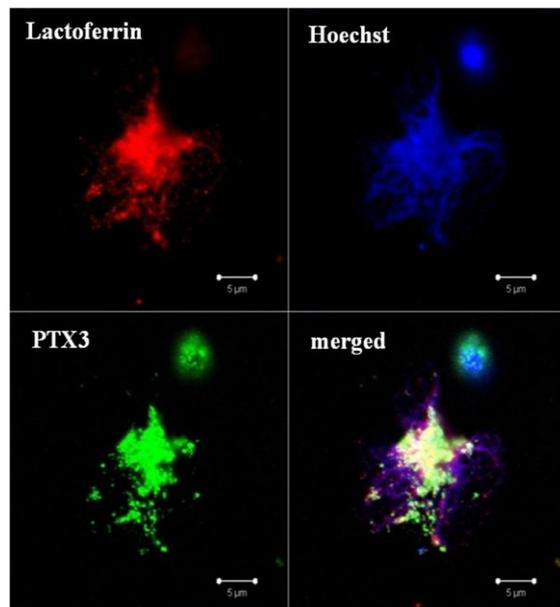


図 4 : IL-8 刺激好中球における PTX3 の局在

不規則な網状形態構造に付着して PTX3 陽性顆粒と lactoferrin の局在がほぼ一致。

(3) 単球と GM-macrophage における PTX3 の局在

共焦点レーザー顕微鏡の観察では、健康人末梢血より分離した単球に PTX3 の発現は観察されなかった。しかし、マクロファージに分化し、LPS 刺激を加えると蛍光免疫染色で細胞質にびまん性もしくは細顆粒状に PTX3 が観察された(図 5)。

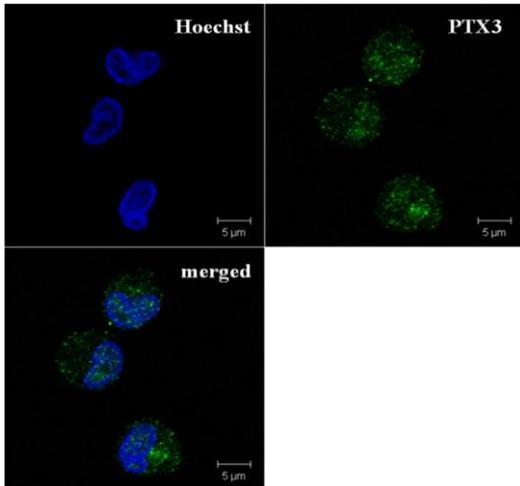


図 5: LPS 刺激マクロファージの PTX3 局在
PTX3 が細胞質にびまん性ないし細顆粒状に局在。

(4) 好中球、マクロファージの PTX3 蛋白発現と分泌

Western blot では、positive control の recombinant PTX3 で見られる 45kDa、90kDa のバンドは、好中球を培養した supernatant 及び cell lysate のどちらでも観察された。

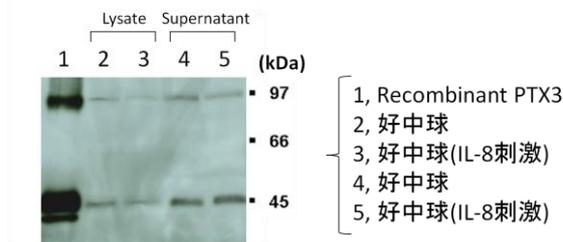


図 6: 好中球における PTX3 蛋白の発現 (Western blot)

PTX3 蛋白の 45kDa、90kDa のバンドが好中球培養 supernatant と cell lysate の双方に見られる。

cell lysate よりも supernatant の方が

PTX3 の発現が強く観察され、好中球は細胞質中の PTX3 を速やかに細胞外へ分泌していることが示唆された。しかし、IL-8 刺激による明らかな差は見られなかった(図 6)。一方、ELISA による測定では IL-8 で刺激した好中球の培養液中の PTX3 濃度は無刺激に比べ、約 4 倍の値を示した(図 7)。

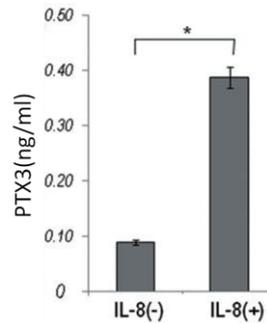


図 7: 好中球における PTX3 の分泌 (ELISA)
IL-8 刺激 40 分後の PTX3 濃度。IL-8 刺激好中球は無刺激に比べ約 4 倍の PTX3 濃度を示した。

マクロファージの Western blot の結果では、好中球と同様に、45kDa、90kDa のバンドが supernatant 及び cell lysate のどちらでも見られ、cell lysate よりも supernatant の方が PTX3 の発現が強く観察された。マクロファージにおいても PTX3 タンパクの多くが細胞外へ分泌されていることが示唆された。

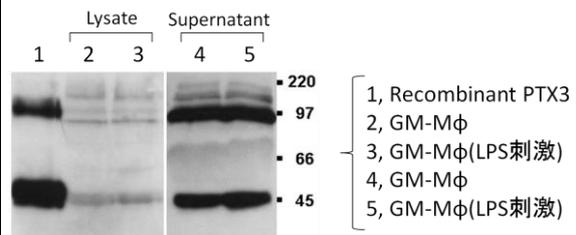


図 8: マクロファージにおける PTX3 蛋白の発現 (Western blot)

好中球と同様に 45kDa、90kDa のバンドが観察され、PTX3 タンパクの多くを細胞外へ分泌していることが示唆されたが、刺激による明らかな差は見られない。

しかし LPS 刺激の有無による明らかな差は見られなかった(図 8)。ELISA による検討では LPS で刺激したマクロファージの培養液中の PTX3 濃度は無刺激のマクロファージ

の培養液に比べ、約 5 倍の高値を示し、活性化によって分泌が亢進することが示唆された(図 9)。

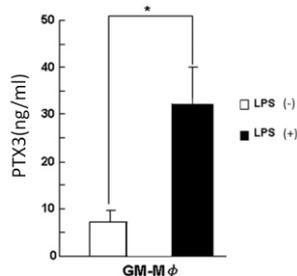


図 9: GM-macrophage における PTX3 の分泌 (ELISA)

LPS 刺激 24 時間後の PTX3 濃度。

以上、本研究によって、好中球とマクロファージにおける PTX3 の局在と産生・分泌機構の一部が明らかになった。好中球から放出された PTX3 が他の抗菌物質とともに NETs に結合することは、効率的殺菌機構とも考えられる。

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)

- 1 Savchenko AS, Inoue A, Ohashi R, Jiang S, Hasegawa G, Tanaka T, Hamakubo T, Kodama T, Aoyagi Y, Ushiki T, Naito M: Long pentraxin 3 (PTX3) expression and release by neutrophils *in vitro* and in ulcerative colitis. *Pathol Int* 61: 290-297, 2011 (査読有)
- 2 Daigo K, Yamaguchi N, Kawamura T, Matsubara K, Jiang S, Ohashi R, Sudou Y, Kodama T, Naito M, Inoue K, Hamakubo T: The proteomic profile of circulating pentraxin 3 (PTX3) complex in sepsis demonstrates the interaction with azurocidin 1 and other components of neutrophil extracellular traps. *Mol Cell Proteomics. J Biol Chem* 286(1): 674-86, 2011 (査読有)
- 3 内藤 眞, AS Savchenko, 井上聡: 好中球と PTX3. *生物資料分析* 33(4): 329-338, 2010 (査読無)

[学会発表] (計 7 件)

1. 松原浩一、大橋瑠子、S. Alexander 他 5 名: 好中球とマクロファージにおける PTX3 の局在と分泌。第 51 回日本リンパ網内系学会総会、2011/6/30~7/2、福岡市国際会議場
2. Alexander AS、井上 聡、大橋瑠子他 4 名: Different response of cells to hypoxia in expression of PTX3 in human atherosclerosis and in vitro. 第 100 回日本病理学会総会、2011/4/28~4/30、横浜市パシフィコ横浜
3. Alexander AS, Naito M et al.: Differences in response of macrophages and neutrophils to hypoxia in expression of pentraxin 3 (PTX3) in human atherosclerosis and in vitro. *Leukocyte in Cardiovascular Disease Conference*. 2011/1/27-28, Geneva, Switzerland
4. Alexander AS, Naito M et al.: Pentraxin 3 (PTX3) is a novel predictive marker for acute coronary events. *International Symposium "New methods of acute coronary syndrome diagnosis and treatment"*, 2010/9/15-18, St. Petersburg, Russia
5. Alexander AS, 大橋 瑠子, 井上 聡, 姜淑英, 長谷川剛, 内藤 眞: The phenomenon of hypoxia-induced expression of long pentraxin 3 (PTX3) in human atherosclerosis. 第 50 回日本リンパ網内系学会総会、2010/6/18~19、新潟市朱鷺メッセ
6. Alexander AS, Naito M et al.: Long pentraxin 3 (PTX3) is stored and potentially released from neutrophils *in vitro* and in human atherosclerosis lesions. 2010/4/8-10, San Francisco, USA
7. 井上 聡、姜 淑英、長谷川 剛、Alexander AS、内藤 眞: 潰瘍性大腸炎における Pentraxin 3 の発現。第 98 回日本病理学会総会、2009 年 5 月 1~3 日、京都市京都国際会議場

6. 研究組織

(1)研究代表者

内藤 眞 (NAITO MAKOTO)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号: 30045786

(2)研究分担者

大橋 瑠子 (OHASHI RIUKO)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号: 20447600

(3)連携研究者

なし