

Study on the mechanism of phagocyte migration to apoptotic cells : Analysis of the induction of apoptosis and MCP-1 expression in regressive corpora lutea of the rat

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/16551

氏名	永長一茂
生年月日	
本籍	東京都
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第557号
学位授与の日付	2003年3月25日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	Study on the mechanism of phagocyte migration to apoptotic cells: analysis of the induction of apoptosis and MCP-1 expression in regressive corpora lutea of the rat (食細胞のアポトーシス細胞への遊走機構に関する研究: ラット退行黄体におけるアポトーシスと MCP-1 の誘導機構の解析)
論文審査委員(主査)	松永 司(薬学部・教授)
論文審査委員(副査)	中山 和久(薬学部・教授) 向田 直史(がん研究所・教授) 須田 貴司(がん研究所・教授) 中西 義信(医学系研究科・教授)

学位論文要旨

ABSTRACT

To find a clue to clarifying the molecular basis for the phagocyte migration to the place where apoptotic cells exist, I analyzed the occurrence of apoptosis, the expression of the gene coding for monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and the accumulation of monocytes/macrophages in regressive corpora lutea of the rat. A series of histochemical analyses with ovarian sections revealed that the extent of *Mcp-1* gene expression and apoptosis simultaneously increases in luteal cells during the estrus phase, but that cells containing MCP-1 mRNA and those undergoing apoptosis are distinct. Furthermore, examinations with cultures of dispersed luteal cells indicated that both apoptosis and MCP-1 mRNA expression are induced, at least in part, by the oxidative stress. Collectively, I propose the following pathway for apoptosis- and MCP-1-dependent regression of the corpus luteum: 1) the oxidative stress induces apoptosis and *Mcp-1* gene expression simultaneously but independently in distinct populations of luteal cells; 2) monocytes/macrophages are chemoattracted by MCP-1 toward regressive corpora lutea; and 3) monocytes/macrophages eliminate apoptotic luteal cells by phagocytosis.

序論

生体内で生じた不要細胞はアポトーシスを起こし、食細胞により選択的に貪食されて消失する。アポトーシス依存的貪食反応は、生体の恒常性を保つために必須である。この現象は、食細胞がアポトーシス細胞の存在する場所へ集まり、アポトーシス細胞を認識して取り込むことにより成立する。これらの素過程のうち、食細胞が集積する機構の解析が最も遅れている。マクロファージや好中球などの食細胞の炎症組織への移動やリンパ球のホ

ーミングは遊走因子の濃度勾配に依存する。よって、アポトーシスが起る部位では何らかの遊走因子が作られ、それが食細胞の標的細胞へ向けた遊走を規定すると予想される。この仮説を検証するために、私は黄体退行を実験系に選んだ。排卵後の卵胞が分化して作られる黄体は、妊娠の維持に必要なホルモンを産生する組織であり、妊娠の不成立に伴ってその機能と構造を失う。黄体退行はホルモン生産能を失う機能的退行および組織が消失する形態的退行の二段階からなり、後者は黄体細胞のアポトーシスを伴うと考えられている。さらに、退行黄体ではマクロファージやリンパ球の浸潤と単球遊走因子である monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の発現が観察される。これらの事実より、私は「黄体細胞のアポトーシスに伴って MCP-1 が合成され、これによりマクロファージがアポトーシス細胞の元へ遊走し、アポトーシス黄体細胞を貪食排除することで黄体退行は進行する」と仮説を立て、これを証明することを目標に実験を行った。

方 法

正常に性周期を繰り返すラットより摘出した卵巣および黄体を用いて以下の実験を行った。In vivo 解析では卵巣の凍結切片について組織化学的実験が、in vitro 解析ではばらばらにした黄体細胞を培養して組織化学的実験および RNA 解析が行われた。MCP-1 mRNA の検出は RNA プローブを用いた in situ ハイブリダイゼーションおよび逆転写反応 (RT) を介した PCR、アポトーシス細胞の検出は抗活性化カスパーゼ 3 抗体を用いた免疫組織化学あるいは TUNEL 法、そして単球/マクロファージと黄体実質細胞であるステロイド産生細胞の検出はそれぞれ抗 CD68 抗体および抗クラス B スカベンジャー受容体タイプ I (SR-BI) 抗体を用いた免疫組織化学により行った。

結 果

I. In vivo 解析

I-1. MCP-1 mRNA 発現細胞種の同定

In situ ハイブリダイゼーションと CD68 あるいは SR-BI に対する抗体を用いた免疫組織化学を同一卵巣切片上で行い、MCP-1 mRNA 発現細胞種を同定した。ほぼ全てのハイブリダイゼーションシグナル陽性細胞が抗 SR-BI 抗体で染色されたが、抗 CD68 抗体では陰性であった。よって、MCP-1 mRNA は黄体実質細胞であるステロイド産生細胞で発現することがわかった。

I-2. MCP-1 mRNA 発現細胞、アポトーシス細胞、および単球/マクロファージ数の性周期における変化

成熟ラットでは、発情前期、発情期、発情後期、および発情間期からなるほぼ四日間の性周期が繰り返される。性周期の各ステージにあるラットの黄体について、切片の一定面積あたりの MCP-1 遺伝子発現細胞、アポトーシス細胞、および単球/マクロファージ数を測定した。その結果、MCP-1 mRNA 発現およびアポトーシス細胞の程度は、共に発情期に鋭いピークを示して増加することがわかった。一方、単球/マクロファージを多く含む黄体の数は性周期を通してほぼ一定値を与えた。

I-3. MCP-1 mRNA 発現とアポトーシスおよびマクロファージ浸潤の相関

MCP-1 mRNA 発現細胞がアポトーシスを起こしているかどうかを調べた。ハイブリダイゼーションシグナル陽性細胞は抗活性化カスパーゼ 3 抗体を用いた免疫組織化学および TUNEL 染色とともに陰性であったことから、MCP-1 mRNA は非アポトーシス細胞で発現することがわかった。次に、個々の黄体について、切片の一定面積あたりの MCP-1 遺伝子発現細胞、アポトーシス細胞、および単球/マクロファージの数を調べた。その結果、MCP-1 mRNA 発現細胞の多い黄体はアポトーシス細胞をほとんど含まず、またこの逆の関係も認められたが、これらの細胞数と単球/マクロファージ数との関係には明確な相関は示されなかった。

II. In vitro 解析

II-1. 黄体細胞の培養

摘出した黄体をコラゲナーゼで処理して得られた細胞は、赤血球を含むさまざまな血球系の浮遊細胞とさまざまな接着細胞の混合物であった。CD68 および SR-BI に対する免疫組織化学を行ったところ、両者とも存在比率は 10% 以下であった。In vivo 解析では黄体細胞の大多数が SR-BI 陽性であったことから、何らかの理由で黄体実質細胞の SR-BI 産生能が失われていると考えた。

II-2. 培養による黄体細胞の自発的アポトーシス

培養した黄体細胞について活性化カスパーゼ 3 を検出することにより、培養 1 時間で自発的なアポトーシスが起ることがわかった。また、このアポトーシスはカスパーゼ阻害剤 z-VAD-fmk の添加で完全に阻害された。さらに、TUNEL 染色と SR-BI あるいは CD68 の免疫組織化学を同時に行うことにより、SR-BI 陽性細胞、単球/マクロファージ、およびそれら以外の細胞にアポトーシスが誘導されることがわかった。

II-3. 酸化ストレスに依存した培養黄体細胞のアポトーシス

黄体細胞のアポトーシス誘導因子のひとつとみられている酸化ストレスの影響を調べるため、抗酸化剤の N-アセチル-L-システインを添加して培養を行った。その結果、アポトーシスが顕著に抑制された。さらに、過酸化水素水と内因性抗酸化酵素阻害剤メルカプトサクシネートを同時に添加すると、黄体細胞のアポトーシスは有意に増加した。これらの結果より、培養黄体細胞のアポトーシスは酸化ストレスにより引き起こされることがわかった。

II-4. 培養黄体細胞における自発的な MCP-1 遺伝子の発現

培養した黄体細胞について RT-PCR で MCP-1 mRNA 発現量を調べた。コントロールの解糖系酵素 PGK-1 mRNA 発現量と比較すると、MCP-1 mRNA は培養後 30 分で増加し、3 時間で飽和に達することがわかった。培養した黄体細胞を容器への接着性の有無によりふたつの集団に分けて解析すると、接着細胞でのみ MCP-1 mRNA が発現していることがわかった。CD68、SR-BI あるいは活性化カスパーゼ 3 と MCP-1 mRNA を同時に検出すると、MCP-1 mRNA 発現細胞はどのシグナルとも重ならなかった。以上より、非ア

ポトーシス、非単球/マクロファージ、かつ SR-BI 陰性の接着細胞が 培養中に MCP-1 mRNA を発現することがわかった。

II-5. 酸化ストレスに依存した培養黄体細胞での MCP-1 遺伝子の発現

II-3 での実験と同様に、酸化防止剤の存在下に黄体細胞を培養し、MCP-1 mRNA 量の変化を調べた。すると、*N*-アセチル-L-システインあるいはジメチルスルホキシドの添加によって MCP-1 mRNA 発現は著しく抑えられた。よって、培養黄体細胞での MCP-1 遺伝子発現も酸化ストレスにより誘導されることがわかった。

II-6. アポトーシスと MCP-1 遺伝子発現の独立性

MCP-1 mRNA 発現のアポトーシス依存性を調べた。アポトーシスが完全に阻害される濃度の *z*-VAD-fmk を加えて黄体細胞を培養しても、MCP-1 mRNA 発現の誘導は影響を受けなかった。よって、培養過程での MCP-1 遺伝子発現の誘導はアポトーシスを必要としないことがわかった。

考 察

これまでに、さまざまな動物種で黄体の MCP-1 発現に関する報告があったが、どの細胞が MCP-1 を産生するかは明らかではなかった。本研究により、性周期ラット黄体における MCP-1 mRNA 発現細胞はステロイドを生産する黄体細胞であることが明らかとなった。培養した黄体細胞を大きさでふたつ分けると、小さい黄体細胞のステロイドホルモン産生能は大きなものよりも低いとの報告がある。培養した黄体細胞では SR-BI 陰性細胞が MCP-1 mRNA を発現するという本研究での結果は、性周期ラットでは小さな黄体細胞が MCP-1 を発現する可能性を示唆する。MCP-1 mRNA 発現とアポトーシス細胞の出現が同一の性周期ステージで起こることより、両者は同じ仕組みで誘導されている可能性が考えられる。そしてその観点から実験を行い、酸化ストレスが MCP-1 遺伝子の発現とアポトーシスを同時に誘導することが本研究で明らかとなった。しかし、予想に反して両者は異なる細胞で誘導され、培養過程での MCP-1 mRNA 発現の誘導はアポトーシスを必要としなかった。このなぞを解くことが今後の課題となるであろう。

退行黄体では活性酸素種が増大する。この機構としては、プロスタグランジン 2α およびプロテインキナーゼ C が関与する情報伝達が挙げられている。抗酸化酵素活性が退行過程で低下することも報告されている。また、培養による黄体細胞の自発的なアポトーシスおよび酸化ストレスの関与はウサギでも報告されており、本研究での結果と一致する。

酸化ストレスによって MCP-1 mRNA 発現とアポトーシスの両方が黄体細胞において同時に誘導されることが、本研究で始めて明らかとなった。これらの現象はそれぞれ別の細胞で見られることから、MCP-1 遺伝子の発現とアポトーシスは酸化ストレスで誘導される異なる経路を介すると予想される。MCP-1 遺伝子のプロモ

ターには NFκB 結合配列があり、これが転写制御に必要とするとの報告がある。また、酸化ストレスが NFκB の活性化を導くとの報告もあり、酸化ストレスによる MCP-1 遺伝子発現の活性化は NFκB を介しているのかもしれない。実際、培養黄体細胞における MCP-1 mRNA 発現は NFκB 活性の阻害剤の存在によって抑えられるという予備的知見が著者により得られている。

本研究で得られた結果を統合して、私は以下に述べる黄体退行機構を提唱したい。1) 発情期黄体では何らかの仕組みで抗酸化酵素による内因性酸化ストレスの除去が滞り、2) 増加した酸化ストレスが黄体細胞のアポトーシスおよび NFκB の活性化を独立に促し、3) 活性化した NFκB が黄体細胞の MCP-1 遺伝子発現を誘導し、4) 分泌された MCP-1 が単球/マクロファージの遊走を促し、5) アポトーシス細胞の存在する黄体へ単球/マクロファージが浸潤し、そして6)単球/マクロファージがアポトーシス黄体細胞を貪食除去する。

学位論文審査結果の要旨

永長一茂氏からの学位申請を受け、上記5名の審査委員により学位論文が査読され、平成15年2月6日に本人による口頭発表が公開で行われた。同日に最終の審査委員会が開かれ、審議の結果、以下の判定がくだされた。

本論文では、アポトーシス細胞への食細胞遊走の仕組みを明らかにすることを目的として、ラット黄体細胞におけるアポトーシス誘導とマクロファージ遊走因子 MCP-1 の発現誘導の機構が解析された。退行過程にある黄体においてアポトーシスと MCP-1 発現が起こることが他の研究者により報告されたことから、永長氏はこれらふたつの現象が互いに関連していると予想した。それを検証するために、ラット黄体の組織切片および培養した黄体細胞についてアポトーシスの程度と MCP-1 mRNA 量が調べられた。その結果、アポトーシスと MCP-1 発現は、発情期のラットで同時にしかし異なる細胞において、ともに酸化ストレスが原因となって誘導されることが明らかにされた。この結論は、アポトーシス細胞を含む黄体でのマクロファージ蓄積をよく説明し、妊娠不成立時の黄体の消失はアポトーシスを起こした黄体細胞がマクロファージに貪食除去されるために起こるという考えに根拠を与える。

本研究は、退行黄体におけるアポトーシス誘導とマクロファージ遊走因子発現が関連性をもって起こる現象であることを示し、またより一般的に、食細胞がアポトーシス細胞へ向けて移動する仕組みに初めて言及したものである。よって、博士(薬学)の学位に値すると判定された。