

氏名	藤井千文
生年月日	
本籍	長野県
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博甲第430号
学位授与の日付	平成13年3月31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 macrophage recognition of apoptotic cells : Analysis with a monoclonal antibody that inhibits the phagocytosis reaction (マクロファージによるアポトーシス細胞認識様式の研究 : 貪食阻害活性をもつモノクローナル抗体を用いた解析)
論文審査委員(主査)	中西 義信(薬学部・教授)
論文審査委員(副査)	平山 明子(薬学部・講師) 松永 司(薬学部・助教授) 向田 直史(がん研・教授) 須田 貴司(がん研・教授)

学位論文要旨

<Abstract>

Monoclonal antibodies raised against HeLa cells at late apoptosis stages were screened for the activity of inhibiting phagocytosis of those cells by macrophages, and a monoclonal IgM clone, which I named PH2, was obtained. PH2 severely inhibited phagocytosis of late apoptotic cells while inhibitors for known phagocytosis ligands, except for phosphatidylserine, did not influence the reaction. PH2 gave little effect on phagocytosis of cells at early apoptosis stages, whereas liposomes containing phosphatidylserine inhibited phagocytosis of cells at any apoptosis stages examined. Moreover, the inhibitory effects of PH2 and phosphatidylserine-containing liposomes on phagocytosis of late apoptotic cells appeared to be additive. The inhibition of phagocytosis was still observed when apoptotic cells were preincubated with PH2 and unbound antibodies were washed out. Furthermore, PH2 bound to apoptotic cells at later stages more efficiently than to those at early stages, and it did not bind to normal cells. These results suggested that a presumed antigen for PH2 exists on the surface of late apoptotic cells and helps macrophages recognize those cells independent of phosphatidylserine. All the results collectively indicated that a novel mode of phagocytosis and the phosphatidylserine-mediated reaction simultaneously occur to maximally eliminate cells at late apoptosis stages.

<はじめに>

生体内で不要になった細胞の多くは、アポトーシスと呼ばれる細胞死を起こすことが知られている。アポトーシス細胞は、周辺の食細胞によって選択的にかつ速やかに取り除かれる。この反応は貪食と呼ばれ、死細胞の内容物による生体の汚染を防ぐ重要な反応である。アポトーシス細胞表面には貪食反応の「目印分子」が存在し、食細胞によるこの分子の認識がその選択性を決定すると考えられている。これまでに多数の目印分子候補が提案されているが、それらがどのように使い分けられるかについての解析は行われていない。貪食目印分子の候補には、タンパク質、リン脂質、糖などが挙げられている。これらのうち最も解析の進んでいる分子は、細胞膜リン脂質のホスファチジルセリン (PS) である。正常細胞の PS は二重膜の内側層に局在しているが、アポトーシスの誘導により外側層に移行して細胞表面に露出する。このように露出した PS が食細胞に認識されて貪食反応が起こると考えられている。

Fas 依存のアポトーシスを起こした細胞も PS 依存的にマクロファージに貪食されることがわかっている。筆者の所属する研究室では、抗 Fas 抗体処理でアポトーシスを誘導した HeLa 細胞がマウス腹腔マクロファージに貪食される反応の分子機構が研究されている。これまで、アポトーシスを起こした HeLa 細胞の表面には PS が露出し、食細胞はそれを認識して貪食すること、および PS 露出が飽和になった後も貪食効率が増大し続けることが示された。このことから、アポトーシス後期の細胞の貪食における PS 以外の認識様式の存在が予想された。筆者は、アポトーシス後期の細胞に対するモノクローナル抗体を利用して、この可能性を検証した。

<実験材料と方法>

アポトーシス細胞として、抗 Fas 抗体を用いてアポトーシスを誘導した HF1 細胞 (HeLa 細胞に Fas を過剰発現させた培養細胞株) を用いた。HF1 細胞は通常、培養シャーレに接着した状態で増殖するが、アポトーシスの進行に伴ってその接着性を失い、培地中に浮かんでくる。そこで、培養シャーレへの接着性を基準にアポトーシス細胞を分画し、前者を 'attaching' 細胞、後者を 'floating' 細胞と名付け、実験に使用した。食細胞には、チオグリコレート誘導マウス腹腔マクロファージを用いた。

貪食反応は、ビオチン標識したアポトーシス細胞をマクロファージに加えて行った。反応後、細胞を固定し、蛍光標識したアビジンをビオチンに結合させることにより、貪食されたアポトーシス細胞を蛍光顕微鏡下で検出、算定した。全マクロファージ数に対するアポトーシス細胞含有マクロファージの百分率を算出し、これを貪食反応の程度 (貪食インデックス) として評価した。貪食反応に対する阻害剤の影響を調べた際には、貪食反応系に阻害剤を直接添加して同様に反応を行った。このときの貪食インデックスの阻害剤未添加の場合に対する百分率を残存活性として、阻害剤の影響を評価した。

<結果と考察>

1) 'floating' 細胞の食食反応

アポトーシスを起こした HF1 細胞は、その時間経過に伴って、被食食能が増加することがわかっている。はじめに、'floating' 細胞の食食反応の経時変化を解析したところ、アポトーシス誘導時間の経過に伴って食食インデックスの増加が見られた。よって、アポトーシス後期になると、'floating' 細胞に効率の良い食食を導く様な変化が起こっていることが示唆された。'floating' 細胞では、膜の透過性が保たれていないため、細胞表層の PS 量を測定することができない。そこで、反応系に PS を含むリポソームを直接加えてその影響を調べることで、この食食反応における PS の関与の程度を検討した。その結果、全ての時間で PS を介した食食反応が同程度で起こっていた。このため、被食食能の変化には、PS 以外の認識が関与していることが考えられた。さらに、PS 以外の既知の目印分子の関与を調べたところ、いずれの分子もこの反応には関与していないことがわかった。以上の結果より、'floating' 細胞には、効率の良い食食反応を導く未知の認識様式が存在していることが予想された。そこで、アポトーシス後期の細胞の食食反応を阻害するモノクローナル抗体を作成し、この認識様式を解析することにした。

2) 'floating' 細胞の食食反応を阻害するモノクローナル抗体の作成

'floating' 細胞をフロイント完全アジュバントとともにマウス腹腔に投与し、さらにアジュバントを含まないもので2回の追加免疫を行った。このマウスより脾臓細胞を調製し、マウスミエローマ細胞 SP2 と融合させた。HAT 培地で生存し得るハイブリドーマ群を選択し、それらの培養上清について'floating' 細胞の食食反応への影響を調べた。このうち食食反応を阻害した細胞群について限界希釈法によるクローニングを行った。各段階で食食阻害活性を指標に選択を行い、最終的にひとつのハイブリドーマが得られた。このハイブリドーマが産生する抗体のサブクラスは IgM であり、これを PH2 (phagocytosis-inhibiting antibody from the group numbered 2) と名付けた。

はじめに、PH2 による食食反応阻害の特徴を調べた。PH2 は用量依存的に 'floating' 細胞の食食反応を阻害し、このとき同量のコントロール IgM は影響を与えなかった。また、PH2 はマクロファージによるビーズやザイモサンの取り込みには影響せず、マクロファージの基本的な飲食作用を阻害しないことがわかった。さらに、PH2 による食食阻害は 'floating' 細胞に特異的であり、'attaching' 細胞の食食は影響を受けなかった。つぎに PH2 が食食反応を阻害する仕組みを調べた。アポトーシス細胞とマクロファージをそれぞれ PH2 と反応させ、未反応の PH2 を除いた後に食食反応を行った。その結果、アポトーシス細胞と PH2 とをあらかじめ反応させたもののみ食食反応の低下が見られ、PH2 がアポトーシス細胞に結合することが示唆された。

3) PH2 により阻害される食食反応のキャラクタリゼーション

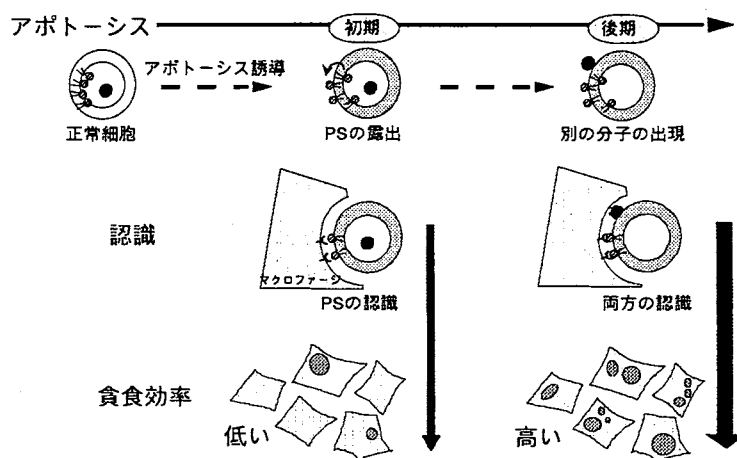
はじめに、PH2 により阻害される食食反応のアポトーシス進行に伴う経時変化について検討した。すると、培養シャーレへの接着性を失った細胞のなかでもアポトーシス誘導時間が長いものほど、その食食反応が強く阻害された。また、本研究室におけるフローサイトメトリーによる解析により、PH2 の細胞への結合

がアポトーシス進行と共に増加することが示された。蛍光抗体法による解析でも、PH2 の 'floating' 細胞への結合が見られたが、正常細胞および 'attaching' 細胞では結合が検出されなかった。よって、PH2 がアポトーシス後期の細胞に結合することにより貪食反応が阻害されると考えられた。PH2 が結合する相手は対応する抗原であり、それが目印分子として働いている可能性が高い。効率よくマクロファージに貪食される細胞ほど PH2 により強い阻害を受けるため、PH2 の抗原が効率の良い貪食を導いている可能性がある。また、この貪食反応は全ての時間で PS の関与が同程度であり、PS 以外の既知の目印分子の阻害剤では影響されないという 1) の結果と考えあわせると、PH2 抗原は新規貪食目印分子であることが予想される。さらに、PH2 は、エタノール処理した正常細胞にも結合することがフローサイトメトリーによる解析からわかっており、PH2 抗原はもともと細胞内に存在するものであることが予想された。このような物質が細胞表層に移動することによって効率の良い貪食反応が導かれている可能性が高い。

次に、PS 依存の貪食反応と PH2 で阻害される反応との関係を調べた。PS 依存の反応は PS を含むリポソームの添加により阻害される。そこで、リポソームと PH2 の二つの阻害剤の相加効果を検討した。PH2 による阻害が飽和に達した状態の貪食反応にさらにリポソームを加えると、貪食反応がより低下した。このことは、PS 依存の貪食反応と PH2 が阻害する反応が互いに独立していることを示唆する。また、アポトーシスとは無関係に PS を露出させた細胞の貪食反応はリポソームでは阻害されたが、PH2 の添加では影響を受けなかった。このため、PS の露出と PH2 抗原の露出もそれぞれ独立していることが予想された。さらに、別の食細胞であるマクロファージ様細胞株 J774 細胞によるアポトーシス後期の細胞の貪食反応でも、PH2 の影響はみられず、リポソームでのみ阻害がみられた。以上の結果より、PS 依存の貪食と PH2 で阻害を受ける反応とは互いに独立していると考えられる。また、アポトーシスを起こしたヒト白血病 T 細胞株 Jurkat 細胞の貪食反応も PH2 により阻害されることから、この認識様式が、HF1 細胞に限定されたものでなく、他のアポトーシス細胞でも働いていることが示された。

<まとめ>

以上の研究により、アポトーシス進行度の違いによってマクロファージによるアポトーシス細胞の認識様式が変化することが分かった。すなわち、アポトーシス初期の細胞はおもに PS を目印とする細胞間認識を経て貪食されるのに対して、アポトーシスの後期になると新たな認識様式が関わり、少なくとも二つの貪食反応によってアポトーシス細胞がさらに効率よく除去されることが示された (図参照)。効率の良い貪食反応は、モノクローナル抗体 PH2 で阻害され、PH2 抗原は新規目印分子である可能性が示唆された。今後は、PH2 抗原の実体と機能を明らかにして、二つの異なる様式の貪食反応の関係と意味を理解することが必要である。アポトーシス細胞の貪食は、様々な生命現象に必要とされることがわかりつつあり、その分子機構の解析が望まれる。本成果は、まだ完全には明らかになっていない「アポトーシス細胞の貪食反応」の認識メカニズムを解明するうえで、今後の研究に新たな展開を与えるものである。



図：予想されるアポトーシス細胞貪食反応のモデル

学位論文審査結果の要旨

藤井千文氏から提出された学位論文について、上記5名の審査委員による査読の後に平成13年1月29日に口頭発表会が行われた。同日に最終の審査委員会が開かれ、以下の理由により当該論文は博士（理学）の学位に値すると判定された。

本論文は、マクロファージによるアポトーシス細胞貪食反応の様式に関する研究結果を記述したものである。食細胞による標的細胞の認識は、標的細胞表層に存在する目印分子に食細胞上の受容体が結合することによって規定されると考えられている。これまでアポトーシス細胞の目印分子候補が数多く提案されているが、それらが本当に食細胞による認識に関与するが、関与するとしても複数の分子がどのように使い分けられているか、は不明である。藤井氏は、アポトーシス過程で複数の目印分子が使い分けられている可能性をモノクローナル抗体を利用して追究した。

藤井氏は、アポトーシス後期過程の細胞を抗原としてマウスを免疫することにより、マクロファージによる細胞貪食反応を阻害するモノクローナル抗体 PH2 を得た。PH2 の貪食反応阻害様式およびアポトーシス細胞への結合様式がさまざまな実験により調べられた。その結果、アポトーシス初期段階細胞の貪食ではこれまで最もよく解析された目印分子であるホスファチジルセリン依存的な反応が主であるが、後期段階になるとその反応に加えて新たに PH2 で阻害される貪食反応が起こり、アポトーシス細胞が効率的に処理されることが示された。PH2 に対する抗原アポトーシス後期過程にある細胞の表層に出現し、貪食目印分子としてマクロファージに認識されると推測された。

抗原が同定されていないため推論に頼る考察が多い感は否めない。しかし、本研究はアポトーシス進行程度の違いで細胞貪食反応の様式が変化することを初めて示したものであり学位に値する。