

氏 名（本籍）^{ハナン} ^{フアド} ^{ファリド}
Hanan Fouad Faried

学位の種類 博 士（医 学）

学位記番号 医 博 第 1 2 7 7 号

学位授与年月日 平 成 8 年 3 月 26 日

学位授与の条件 学位規則第4条第1項該当

研究科専攻 東北大学大学院医学系研究科
（博士課程）内科学系専攻

学位論文題目 Studies on Complement 3 secretion by human
Polymorphonuclear Leukocytes.
（ヒト顆粒球補体第3成分の研究）

（主 査）

論文審査委員 教授 今 野 多 助 教授 飯 沼 一 宇
教授 佐々木 毅

論文内容要旨

研究目的

補体第3成分(C3)は、ヒト血清中に最も多く存在する補体成分であり、単球、マクロファージ、活性化T細胞、肝細胞、線維芽細胞及び上皮系細胞で産生されることが知られていた。C3は古典的および第二補体活性化経路に重要な役割を担っており、殺細菌・ウイルスや食害に重要な役割を担っている。一方炎症の現場に常に遊走していく顆粒球が、C3を産生しつつ炎症反応に深い関与を有していることは想像に難くない。この事実はマウスおよびサイトカイン刺激顆粒球においては既に証明されていたが、未だ未刺激ヒト顆粒球にてC3が貯蔵・産生されているか否かは明らかではない。本研究はこの点を明らかにすることを目的として行った。

研究結果

材料と方法

同意を得た後、健康成人20名と全身性エリテマトーデス(SLE)23名の末梢血を採血した。リンフォプレップによる比重遠心を行い、遠心管最下層の赤血球層よりバッフィーコートを採取後、塩化アンモニウム法にて赤血球を溶血し顆粒球を得た。顆粒球は10%牛胎児血清加RPMI-1640培地にて培養し、非刺激下およびフォルボールエステル(TPA)、メゼレイン(MEZ)、ジオクタノイルグリセロール(DIOG)、カルシウムイオノフォア A23187、リポポリサッカライド(LPS)、腫瘍壊死因子(TNF)等によるC3産生能を検索した。培地中のC3定量には酵素結合免疫抗体法(ELISA)を用いた。顆粒球細胞質内C3の検出には、アルイカリフォスファターゼ法による免疫染色を用いた。一次抗体の抗C3抗体には、Lachmann教授(ケンブリッジ大学)より分与されたモノクローナル抗ヒトC3抗体、クローン3とクローン4を混合して用いた。HL-60および顆粒球分画(TPA刺激あるいは無刺激)より総RNAを抽出し、ノーザンブロット解析を行うことにより、C3mRNAの発現を解析した。C3プローブはPHLc3.11(ATCCより入手)を用いた。

結果

顆粒球を無刺激の条件下で培養すると、2日までの培養期間に応じC3産生は増加し、かつ顆粒球は単球に比較しより多量のC3産生能があることが示された。またTPA刺激(10ng/ml)により顆粒球C3の培地中への産生は、既に1時間のレベルで最大となり、以降2日目まで産生量の増減は認められなかった。また産生されるC3の量は無刺激2時間目の産生量と比較した場合、TPA刺激で決してその値以上には増加しなかった。このようなTPA刺激の有無に関する顆粒球C3産生の時間経過に、同一人あるいは個人差による測定結果の変動の有無が存在するか否かを検討した。同一人間の異なった時期、あるいは異なった3人に同時に行った実験によっても最初に得られた実験と同一傾向の結果が得られた。顆粒球によるC3産生を別な方法により確認する

ために、抗 C3 単クローン抗体をビオチン標識 2 次抗体とパーオキシダーゼ標識ストレプトアビジンにより検出する顆粒球免疫染色を行った。無刺激無培養顆粒球はこの方法により細胞質内に C3 が存在することを証明できた。この陽性反応は 10 倍に希釈した C3 標準溶液では抑制出来ないが、2 倍に希釈した C3 溶液では完全に抑制可能であった。また 1 時間培養による無刺激および TPA 刺激後の顆粒球 C3 免疫染色では、無刺激に比し TPA 刺激後の顆粒球細胞質内にはほとんど C3 が存在しないことが示された。

TPA 以外に顆粒球活性化に影響を与える種々の因子を顆粒球培養系に添加し、C3 産生に対する効果を観察した。TNF (10u/ml), LPS (10ng/ml), FMLP (10^{-6}) 刺激の場合は、培養 2 日目の C3 産生量で比較すると、無刺激あるいは TPA 刺激時に比し C3 産生量が増強される。一方 IL-1, インターフェロン, GM-CSF, G-CSF 刺激では、顆粒球の C3 産生能にほとんど影響を与えなかった。

MEZ や DIOG の様に TPA 以外のプロテインキナーゼ C 活性化試薬や、カルモジュリン系路を介して顆粒球を TPA と同様に刺激することがマウスで示されたカルシウムイオノフォアを用いて、顆粒球 C3 産生への刺激効果を調べた。予想通りこれらの試薬は TPA と同様に、添加後 1 時間目には C3 の培養上清中への産生量を増加させた。

SLE 患者では、顆粒球が活性化されている可能性がある。C3 産生分泌能を目安にしてこの点を検討したところ、23 例中 7 例の患者に高レベルの C3 産生が認められた。

結論

1. ヒト顆粒球が C3 を産生し、培養上清中に分泌していることを示した。
2. TPA が顆粒球 C3 産生に与える影響を検討したところ、C3 の合成系に作用し培地中に増加して来るのではなく、貯蔵された C3 の分泌を促進させる効果があると考えられた。
3. プロテインキナーゼ C 活性化試薬である、MEZ や DIOG、およびカルシウムイオノフォアは TPA パターンの顆粒球 C3 分泌促進作用を示す。
4. TNF, LPS, FMLP は TPA とは異なり、顆粒球 C3 合成能および分泌能の双方を促進するものと考えられた。
5. SLE 患者由来の顆粒球に、高レベルの C3 産生が認められた。

研究の意義・独創的な点

1. 無刺激ヒト顆粒球が C3 を合成・貯蔵・分泌していることを始めて見出した論文である。このことは感度の高い ELISA 法の開発と、特異性の高い抗体を利用したパーオキシダーゼ染色により可能となった。
2. TPA 型のように顆粒球 C3 の貯蔵・分泌に影響を与える試薬と、TNF 型のように顆粒球 C3 の合成・貯蔵・分泌に影響を与える試薬を見いだした。これらの知見は C3 を介した炎症反応の制御に手がかりを与えることが期待される。

審査結果の要旨

補体成分 C3 は補体系の主要成分であり、生体の炎症反応におけるエフェクターとして重要な役割を果たしている。C3 は単球、マクロファージ、肝細胞、線維芽細胞、内皮細胞、上皮細胞、活性化 T 細胞、肺細胞などの種々の細胞内で産生、分泌されることが判明しているが、多核白血球 (PMN) による C3 分泌は最近奥田らがマウスにおいて確認したのが最初である。その事実をもとに本研究ではヒト PMN の C3 分泌の実証とその動態を究明し、下記の様な成果をあげている。

1. 健常者の PMN を分離採取して、その培養上清中の C3 濃度を酵素抗体法を用いて測定し、その分泌動態を定量的に測定した。対照として同じ血液材料から分取した単球分画 (MAC) について同様に C3 を測定した。その結果、無刺激条件下の PMN では培養 1 時間後にすでに高い濃度の C3 値を呈し、その後比較的緩徐に 2 日間増加した。これに対して MAC では培養 1 時間後の C3 値は軽微で、その後 PMN と同様に緩徐に増加した。

2. TPA, TNF, LPS, FMLP, IL-1, IFN, GM-CSF, G-CSF などの存在下で培養してその刺激効果を調べた結果、TPA でもっとも特徴的結果が認められた。即ち、培養 1 時間後の PMN 上清中 C3 値は 2 日間の培養期間のほとんど最高値を呈し、その後の増加を認めない。即ち、TPA 刺激は PMN の貯蔵する C3 全てを 1 時間内に分泌して、その後新たに産生分泌しないことを示した。また、同様の反応は PKC 活性化剤である DIOG や MEZ で認められ、また Ca イオノフォア A23187 でも認められたことから、PMN における C3 分泌には PKC の関与が推測された。

3. Northern blot 法を用いて C3mRNA の検出を試みたが PMN では検出されなかった。PMN の分泌 C3 はすでに細胞内に貯蔵されたものであることを支持した。

4. 免疫染色法を用いて PMN 細胞質内の C3 の局在を確認した。

5. 全身性エリテマトーデス (SLE) 患者の PMN について C3 分泌動態を調べた結果、無治療活動性群では無刺激条件で 1 時間内にピークに達し、その値は対照に比して有意に高値を呈する特徴がみられた。これに対して、治療群では健常者と同様の傾向を呈することが認められた。SLE 病態と関連し興味ある結果である。

6. 顆粒球または単球系に分化する HL-60 細胞を用いて C3 分泌を調べた結果、TPA による単球系への分化では培養上清中の C3 と細胞 C3mRN が検出されたが、レチノイン酸による顆粒球へ分化では C3 の分泌や C3mRNA 発現は認めなかった。

以上の研究成果はヒト PMN における C3 分泌を実証し、その分泌動態を明らかにしたもので、学位論文に値するものと評価する。