

主論文

Chemokine expression in human erythroid leukemia cell line AS-E2: Macrophage

inflammatory protein-3 α /CCL20 is induced by inflammatory cytokines

赤芽球系細胞株 AS-E2 における炎症性サイトカインによるケモカイン (MIP-3 α /CCL20) 発現の誘導

井上順子、対馬秀樹、安東恒史、澤山靖、境麻里、山崎励至、松尾江美、堤千寿子、
今泉芳孝、岩永正子、今西大介、田口潤、宮崎泰司、朝長万左男

(Experimental Hematology, 2006 年 1 月号掲載予定)

長崎大学大学院医学研究科内科系専攻

(指導教授 朝長万左男 教授)

(緒言)

ケモカインは細胞生存、血管造生、形態形成、自己免疫、腫瘍増殖などに深く関与していると考えられている。その分泌は種々の細胞において TNF- α 、IFN- γ などの炎症性サイトカインによって誘導されることが知られていて、炎症の場においてはサイトカイン・ケモカインネットワークを形成していると考えられている。

一方 TNF- α 、IFN- γ などは、二次性貧血や再生不良性貧血、骨髄異形成症候群といった貧血を呈する骨髄造血不全症候群でも高値となることが報告されている。これらのサイトカインが造血細胞においてもケモカイン分泌を誘導し、病態を修飾している可能性が考えられるが、これまで造血細胞におけるケモカインの分泌については十分に検討されていない。

我々は急性骨髄性白血病由来赤芽球系細胞株 AS-E2 をモデルとして、赤芽球系前駆細胞における炎症性サイトカイン・ケモカインネットワークについて検討した。

(方法)

細胞培養 : AS-E2 を Epo 2U/ml 存在下に、TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β を添加し培養。

RT-PCR : AS-E2 でケモカイン (MIP-1 α 、MIP-3 α 、MCP-1、MCP-2、MCP-4、IP-10、PF-4、IL-8) 及び、ケモカインレセプターCCR6 の mRNA 発現を RT-PCR にて検討。また健常人骨髄より GPA 陽性細胞を磁気ビーズ法にて採取、MIP-3 α mRNA 発現を nested RT-PCR にて検討。

Luciferase assay : AS-E2 において MIP-3 α プロモーター活性を TNF- α 、IL-1 β 刺激下で検討。また I- κ B α suppressor である pcDNA3-I- κ B α SR プラスミドを co-transfection した際のプロモーター活性の変化を検討。

ELISA : TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β で 40 時間刺激した後の培養上清を用い MIP-3 α 蛋白定量を ELISA

にて施行。

Flow cytometry : AS-E2, HUT102, HL-60 の 3 種類の細胞株について、permeabilization 処理前・後の細胞で、FITC 標識抗 CCR6 抗体を用い FACS 解析を施行。

(結果)

1. 炎症性サイトカインによるケモカイン mRNA の誘導

AS-E2 で炎症性サイトカイン刺激時に MIP-3 α , MCP-4, IP-10, IL-8 mRNA 発現の増加を認めましたが、なかでも MIP-3 α 発現誘導が最も強く認められた。

2. MIP-3 α プロモーター活性の誘導

TNF- α 、IL-1 β 単独ではそれぞれルシフェラーゼ活性が 19 倍、7 倍と上昇、両者を組み合わせると 37 倍と相乗効果がみられた。pcDNA3-I- κ B α SR 存在下では TNF- α 、IL-1 β 誘導性の MIP-3 α プロモーター活性が部分的に抑制された。

3. AS-E2 での MIP-3 α 蛋白分泌 (ELISA)

MIP-3 α 蛋白量は ; サイトカイン非刺激下と IFN- γ のみでは検出限界以下、TNF- α 単独では 3.2 \pm 1.7pg/ml、IL-1 β 単独では 1.8 \pm 0.5pg/ml、TNF- α +IL-1 β では 9.9 \pm 3.1pg/ml、TNF- α +IL-1 β +IFN- γ では 15.1 \pm 2.6pg/ml であった。

4. AS-E2 での CCR6 発現

CCR6 mRNA は恒常的に発現していたが、CCR 蛋白は細胞表面には検出されなかった。ただし permeabilization 処理を行うと CCR6 蛋白が検出され、細胞内での発現が示唆された。

5. 健常人骨髄赤芽球での MIP-3 α mRNA の発現

3 人中 2 人は MIP-3 α mRNA を恒常的に発現していたが、1 人では炎症性サイトカインで刺激した際、MIP-3 α mRNA が誘導された。

(考察)

今回我々は、AS-E2 を赤芽球前駆細胞のモデルとして用い、炎症性サイトカイン刺激下に MIP-3 α mRNA と蛋白の発現が誘導されること、そしてその特異的レセプターである CCR6 が細胞内に恒常的に発現することを証明した。この結果はケモカインが骨髄造血不全症候群の病態形成に関与することを強く示唆するものである。また CCR6 の細胞内発現は MIP-3 α -CCR6 の”internal autocrine loop”の存在を示唆し、TNF- α や IL-1 β のシグナリングの一部にこの系が関与している可能性がある。