

田中健之 論文内容の要旨

主 論 文

Monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 enhances apoptotic cell removal by macrophages through Rac1 activation

(単球走化性促進因子-1/CC ケモカインリガンド2はRac1の活性化を介してアポトーシス細胞除去を促進させる)

Takeshi Tanaka, Mayumi Terada, Koya Ariyoshi, Konosuke Morimoto

田中健之、寺田真由美、有吉紅也、森本浩之輔

Biochemical and Biophysical Research Communications

(399 巻 4 号 677—682 2010 年)

[ページ数 : 6 ページ]

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻

(主任指導教員 : 有吉紅也教授)

緒言

アポトーシス細胞の認識と貪食除去 (efferocytosis) は、抗炎症物質や各種増殖因子を放出し、炎症反応や組織修復を制御する重要な過程であり、この過程の障害は、肺における炎症の遷延化や組織障害に関連すると考えられている。しかし、炎症終息過程が始まる時に efferocytosis がどのように惹起されるか、分子レベルでの解明は十分でない。低分子量 G タンパク質の一種である Rac1 は、貪食細胞がアポトーシス細胞を認識する際に活性化され、細胞骨格の形態変化を促すことで細胞膜の “ruffling” を起こすことが知られているが、炎症終息期において、Rac1 活性を上げる因子に関しては不明な点が多い。マウスの細菌性肺炎モデルを用いた我々の先行研究により、炎症性サイトカインのひとつである単球走化性促進因子-1/CC ケモカインリガンド2(以下 MCP-1)が efferocytosis を促進し、炎症終息に重要な役割をはたしていることが判明したが、その分子機序については十分な検討はなかった。そこで、今回の研究は、MCP-1 が肺胞マクロファージにおける Rac1-PI3 キナーゼ経路を活性化させて、肺の急性炎症における efferocytosis を促進するという仮説を証明することが目的である。

方法

マウス肺炎モデルを用いた炎症終息の観察は、LPS を経気道的に投与後、肺洗浄を経時的に行い、洗浄液中の細胞数、細胞分画を検討し、MCP-1 および MIP-2、TNF α の測定を ELISA にて行った。In vitro でのアポトーシス細胞の貪食アッセイは、マクロファージ (J774, マウス腹腔マクロファージ、マウス肺胞マクロファージ) を 24 穴プレートに準備して、MCP-1、Rac1 阻害剤 (NSC23766)、PI3 キナーゼ阻害剤 (LY294002) を添加後に、UV 照射して誘導したアポトーシス細胞 (Jurkat T cells、マウス胸腺細

胞) を加えて培養し、Diff Quik 染色後に目視で貪食率を算出した。また、*in vivo* での評価は、経気管的にアポトーシス細胞(ヒト好中球)と MCP-1 をマウスに投与し、3 時間後の肺洗浄液を Diff Quik 染色と MPO 染色後に目視で貪食率を算出した。Rac 活性は、6 穴 プレートにマクロファージを培養し、MCP-1 で刺激した後、Pull down 法を用いたウエスタンブロット法もしくは、活性型 Rac 親和性プレートを用いて比色法で定量するキット (G-LISA®) にて活性型 Rac の定量化を行った。

[結果]

1) マウス肺炎症モデルにおいて、MIP-2 や TNF α は炎症急性期に動態がピークとなるのに対し、MCP-1 は炎症終息期にピークとなり、炎症終息への関与を示唆する先行研究結果が確認された。

2) *in vitro* での貪食アッセイにおいて、MCP-1 の刺激によって efferocytosis が促進されることが確認された。

3) さらに、MCP-1 刺激による efferocytosis の促進効果は、Rac1 阻害剤や PI3 キナーゼ阻害剤によってそれぞれ抑制されることが確認された。

4) *in vivo* での貪食アッセイにおいても、MCP-1 による efferocytosis の促進効果が確認された。

5) 実験に用いたすべてのマクロファージにおいて、MCP-1 刺激により細胞内の Rac1 が活性化されることが確認された。

[考察]

今回の研究で、MCP-1 が Rac1-PI3 キナーゼの活性化を介して efferocytosis を促進していることを証明した。これらの結果により、肺における急性炎症の終息において MCP-1 および Rac1-PI3 キナーゼ経路が重要な役割を果たしていることが示唆され、この経路の制御の破綻が肺における炎症の遷延化や組織障害を来す分子機序のひとつであることが考えられた。