

分担課題：1) ヘモグロビン小胞体(HbV)が**サイトカイン・ケモカインの産生動態に与える影響について****2) ヘモグロビン小胞体(HbV)投与後の****脾マクロファージの遺伝子発現プロファイルの変化について**

分担研究者	東 寛	旭川医科大学小児科 教授
研究協力者	藤原 満博	北海道赤十字血液センター 製剤開発課長
	酒井 宏水	奈良県立医科大学化学教室 教授

研究要旨

循環血液量の20% v/vに相当するポリエチレングリコール修飾ヘモグロビン小胞体(HbV)あるいはHb分子を内包しない空リポソーム(DPPC-liposome)をラットに投与後、摘出した脾細胞では、一過性のT細胞増殖抑制効果が観察され、この抑制効果発現にはNOの産生が関与していることを見いだしている。しかし、T細胞の増殖抑制に伴って、サイトカイン・ケモカインの産生動態がどのように変化しているかは、不明のままであった。本研究では、そのことを明らかにするため、反応系におけるサイトカイン・ケモカインを網羅的に測定した。その結果、リポソームを投与すると産生が増加するものとして、主としてマクロファージが産生する、CC-chemokine, IL-10, TNF- α およびTh1サイトカインであるIFN- γ , IL-2が明らかになった。一方、リポソームの投与の有無に関わらず産生誘導が認められないものとしてIL-1 β , IL-18, Th2 cytokineであるIL-4, 5, 13が明らかになった。また、空リポソームを貪食したマクロファージの遺伝子発現プロファイルをコントロールマクロファージと比較し、貪食後に発現の増強を認める遺伝子群を同定した。

A. 研究目的

我々はこれまでラットの免疫系へのHbVの影響を検討するため、HbV投与後に脾臓を摘出し、脾細胞の*ex vivo*での培養系において非特異的マイトジェンConAや特異抗原Keyhole limpet hemocyaninに対する反応性の変化を検討してきた。その結果、HbVおよびHbVを内包しない空リポソームの投与で、一過性にこれらの増殖刺激に対するT細胞の反応性が低下すること、そしてこの低下にNOの産生が関与することを見出している。しかし、反応系における諸々のサイトカインやケモカインの産生

動態がどのような影響をうけるかについては、詳細な検討がなされてこなかった。本研究は、この点を明らかにすることを目的としている。さらに、リポソームを貪食した脾マクロファージの遺伝子発現プロファイルの変化について解析することにより、マクロファージの機能変化を分子生物学的側面から解析することを目的とした。

B. 研究方法**B1. 空リポソーム投与ラットからの脾細胞の調製**

実験にはWKAHラット、♂、8-11週齢、体重約

200-300 gを用いた。ラットに循環血液量の20%(v/v)に相当するHb分子を内包していない空リポソーム(DPPC-liposome) (脂質含量として約6g/dl)をエーテル麻酔下、尾静脈より輸注した。コントロール群には同量のsalineを輸注した。

Hb分子を内包しない空のリポソームをラットに輸注後およそ16時間後にエーテル麻酔にて犠牲死し、無菌的に脾臓を摘出した。培養液(RPMI-1640/10%FCS/50 μ l 2-mercaptoethanol (2-ME)) 5 mLに浸した脾臓をディッシュ中ですりつぶし、その懸濁液を遠心チューブに移して静置することにより、大きな組織塊を沈降させた。上清を2,000 rpm $\times$ 5 min遠心し、沈殿した細胞をRPMI1640で洗浄した後、塩化アンモニウム-トリス緩衝液 (IBL 免疫生物研究所) 5 mLにて5-7分間溶血処理をした。溶血処理細胞液に培養液を加え、遠心・洗浄後、培養液に再懸濁して脾細胞とした。

B2. 培養上清中にサイトカイン・ケモカインの測定

培養開始後、1日目、2日目、3日目に上清の一部を回収し、アッセイまで-20 $^{\circ}$ Cに凍結保存した。測定は、Bioplex pro rat cytokine assay panelを用いて、網羅的に測定した。即ち、IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IFN- γ , IL-10, IL-13, IL-17, IL-18, MCP-1 (CCL2), MIP-1 α (XXA3), MIP-3 α (CCL19), RANTES (CCL5), TNF- α , の16種類である。実験は異なる日に3回行った。1回目の実験で、培養72時間まで経時的に測定を試みた。2回目、3回目の実験では、その結果を踏まえて培養開始72時間後の培養上清中のサイトカイン・ケモカインを測定した。測定はすべてtriplicateで行なった。

B3. 脾細胞からのCD11b/c陽性、HLA-class II陰性細胞の分離とRNAの抽出

磁気ビーズを用いた純化操作によりCD11b/c 陽性細胞rich 分画を採取した。得られた分画のCD11b/c陽性細胞の割合は、純化前の数%から純化

後は50%前後に高めることができた。この細胞からRNAを抽出し、DNAマイクロアレイ解析に用いた。コントロールは生理食塩水を注射したラットから採取し、磁気ビーズを用いて純化したCD11b/c陽性細胞を使用した。

B4. DNA マイクロアレイによる遺伝子プロファイルの解析

上記のように抽出したRNAをから Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies)を用い cDNAの合成とcRNAのラベルと増幅をおこなった。ラベルしたcRNAをマイクロアレイ (whole rat, 44,000 gene, Agilent Technologies) にアプライし、ハイブリダイゼーションをおこなった。マイクロアレイの洗浄と乾燥後、Agilent Technologies Microarray Scannerを用いてスキャンした。得られた数値化データはグローバルノーマライゼーションによってアレイ間の補正をおこなった。生理食塩水 i.v.後とリポソーム i.v.後の結果を比較し、前者と比較して2倍以上発現量の差がみとめられた場合を有意と判定した。

B5. CFSE法によるCon A刺激に対するラット脾T細胞の増殖反応抑制の確認

B1で得られた脾細胞をPBS/1%FCSにて2回洗浄後、 1×10^7 /mLに調整し、5 μ M Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE: Molecular Probes)を加え、37 $^{\circ}$ Cにて5分間細胞を染色した。培養液で洗浄後、24穴平底プレートにduplicateで分注 (8×10^5 個/1mL/ウェル) し、Concanavalin A (ConA; Sigma-Aldrich)を加え37 $^{\circ}$ C、5% CO₂にて培養した。培養72時間後に細胞を回収しフローサイトメトリーにて、CFSEで染色された細胞のパターンを比較し、コントロールと比較してあきらかに分裂回数の抑制がみられるのを確認した。また、一部の実験は、CFSEを使用する変わりに、増殖の状態を位相差顕微鏡による目視でも確認した。

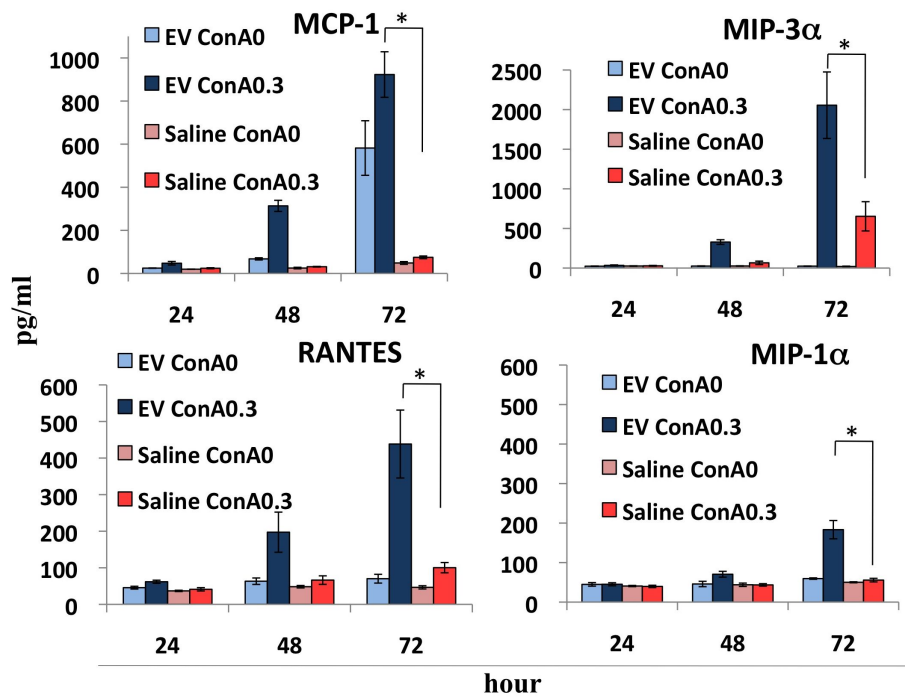


Fig 1. Production of Chemokines

Splenocytes were cultured in the presence of Con A (0.3μg/ml). The chemokine shown here increased in concentration in the culture supernatant of empty vesicle-loaded splenocytes (EV). (* : P<0.05)

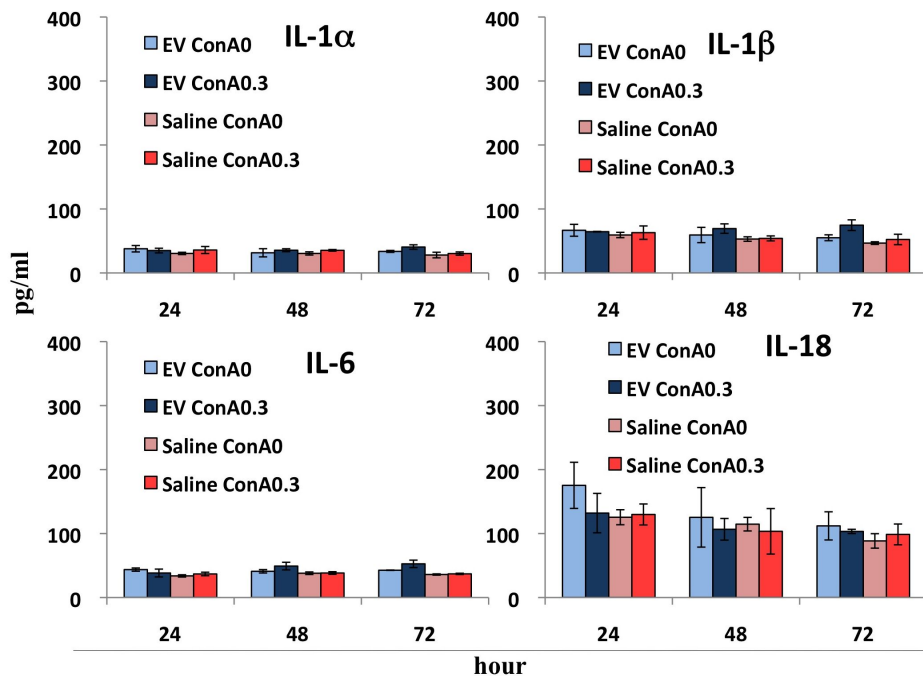


Fig 2. Production of cytokine

All the chemokine shown here did not change or increase in concentration in the culture supernatant.

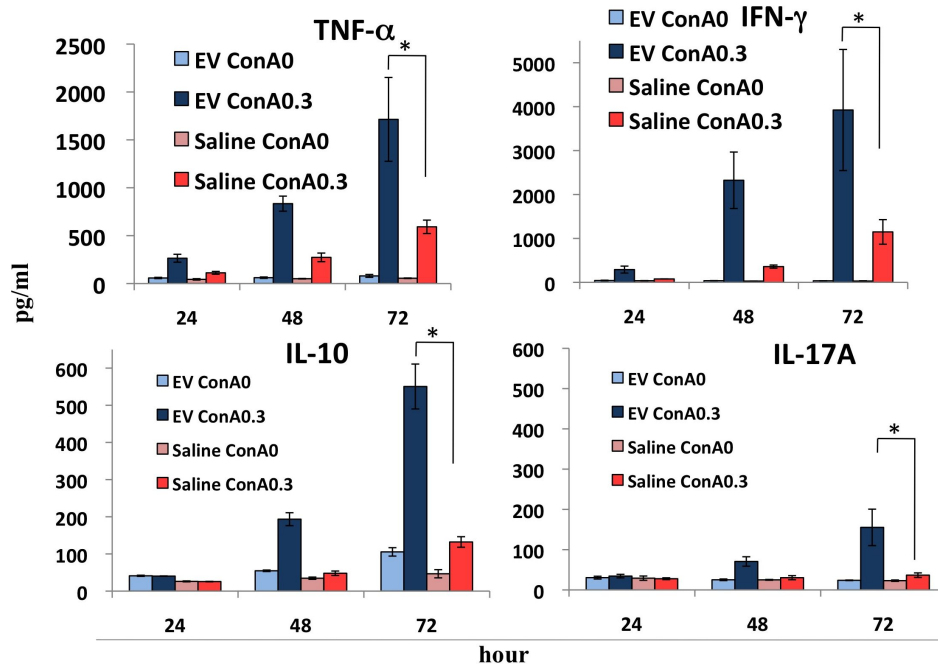


Fig 3. Production of cytokine

The cytokine shown here increased in concentration in the culture supernatant of empty vesicle-loaded splenocytes. (* : $P < 0.05$)

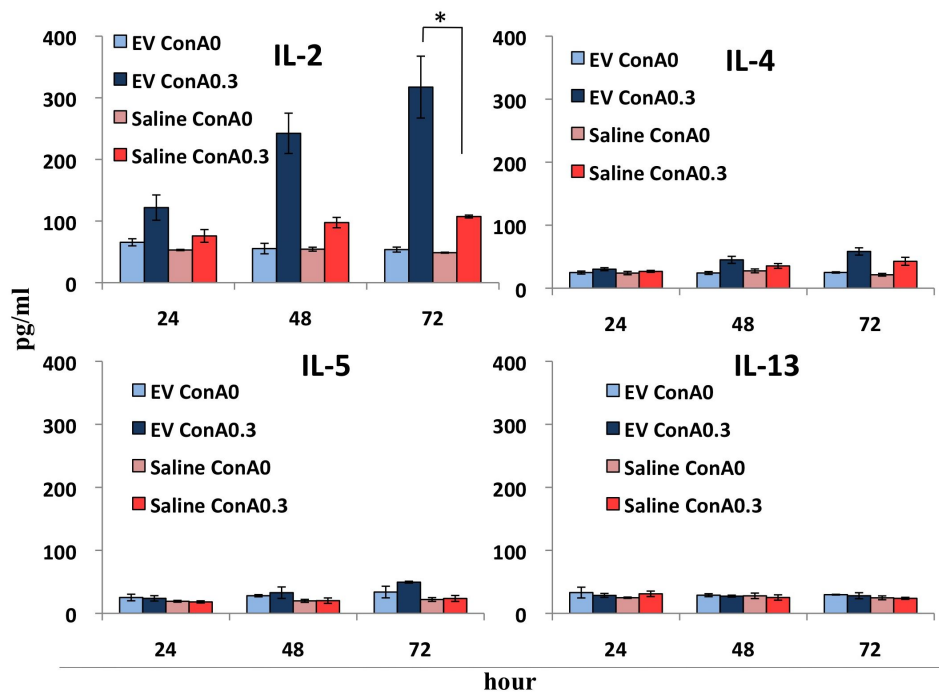


Fig 4. Production of Cytokine

Among these four chemokines, only IL2 increased in concentration in the culture supernatant of empty vesicle-loaded splenocytes than in saline-loaded splenocytes. IL4, 5 and 13 were shown not to increased at all. (* : $P < 0.05$)

C . 研究結果

C. 1 培養上清中に分泌されるケモカイン・サイトカインの動態

サイトカイン・ケモカインの濃度を経時的に測定した1回目の実験から、あらかじめリボソームを投与した脾細胞からの分泌が、生理食塩水のみを投与した脾細胞からの分泌を上回るものと、経時的变化を認めないものに分かれた。主としてマクロファージから産生されるケモカインである、MCP-1, MIP-1 α , RANTESそしてMIP-3 α は、コントロール(生理食塩水投与脾細胞)と比較して、リボソームを投与した脾細胞ではConA刺激後72時間まで経時的に産生されていることがわかった(72時間の時点で $P<0.05$)(Fig. 1)。同じく、主としてマクロファージから産生されると考えられるIL-1 α , IL- β , IL-6, IL-18も、経時的变化を認めなかった(Fig. 2)。同様の傾向は、TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-17A, IL-2においても認められた(Fig. 3, 4)。一方、IL-2, IL-17Aと同じく、T細胞由来のIL-4, IL-5, IL-13は、経時的な変化を認めなかった(Fig. 4)。一回目の実験の経時変化を踏まえ、実験2、3では、培養開始後72時間の培養上清中のサイトカイン・ケモカイン濃度のみを測定した。その結果、実験1の培養72時間と同様の結果を得た。

C. 2 遺伝子プロファイルの解析結果

リボソーム貪食後の遺伝子発現量をコントロールと比較した結果、2回の実験で2回ともFold increaseが2.6以上であったものが168遺伝子あった。その中から、特にFold increaseが高く、かつ免疫応答に関係すると推定される数個の遺伝子についての結果を表にした(表1)。

D . 考察

D. 1 リボソーム投与のサイトカイン・ケモカイン産生動態への影響

リボソーム投与後の脾細胞をCon A で刺激すると、T細胞の増殖が抑制されるが、T細胞の活性化

表 1. 遺伝子プロファイルの解析結果

	Exp. 1	Exp. 2
Mmp14	57.2	51.3
Ccl9	37.4	46.43
ApoE	16.8	9.8
IL18bp	11.39	13.1
IL1a	5.6	9.9
CD276	5.27	7.21

は認められることを報告している。今回は、その時のケモカイン・サイトカインの産生動態を明らかにした。リボソーム投与によりCCケモカインの産生は一樣に亢進していると思われる(Fig.1)。これらのケモカインが主としてマクロファージから産生される。従って、リボソームを貪食したことによるマクロファージの機能変化を反映していると考えられる。この事は、同じく主としてマクロファージから産生されるとされるTNF- α やIL-10の産生も経時的に増加していることと矛盾しないと思われる。IFN- γ は、T細胞からの分泌が主と考えられているが、一部の樹状細胞はIFN- γ を産生するpotentialを持つことが知られており、観察されたIFN- γ の産生増強もリボソームを貪食したマクロファージからのものである可能性がある。この事は今後の検討が必要である。

一方、IL-1 α , IL-1- β , IL6, IL-18はいずれも主としてマクロファージから産生される。特にIL-1 α , IL-1 β は、同じくマクロファージから産生されるCC chemokineと異なり、分泌の亢進は観察されなかった。これは、産生経路が異なることが原因であると思われる。また、IL- β は自然免疫系の活性化の指標とされているが、少なくともこの実験系では、自然免疫系の活性化は、リボソームの投与の有無に関わらず、起こっていないと判断される。今後は、自然免疫系を直接刺激する事により、リボソームの自然免疫系の反応に与える影響を検討する必要がある。

T細胞由来のサイトカインIL-2, IL-17Aはリボソ

ーム投与で産生が増強されるように見える。しかしながら、IL2はT細胞の増殖に必須であることから、リボソーム投与により、T細胞の増殖に抑制のかかった状態では、その消費が抑制されており、その結果コントロールと大きな差となって観察されている可能性がある。その一方でIL-4,-5,-13などのTH2サイトカインの分泌亢進は観察されなかった (Fig 2, 3)。これらの結果は、リボソーム投与により、少なくともIL2産生の抑制はなく、かつTh2サイトカインの産生増強もないと想定される。

D. 2 リボソーム貪食後の遺伝子発現プロファイルについて

ApoEメッセージの増加は、貪食したリボソームの構成成分である脂質を代謝する為には、必須の反応であると考えられる。ApoEメッセージの増強が観察されたことから、回収した細胞群が、目的の細胞を十分に含んでいたことを示しているものと考えられる。Mmp14とCcl9はいずれの実験でも非常に強い発現の増強を認めたが、その意義については不明である。CCL9は主にマクロファージから産生され、その受容体がCCR1である。実験結果から、リボソーム貪食細胞が、CCR9を産生し、CCR1を発現している細胞を集積する作用を発揮する事が推測できる。

IL-1 α は主としてマクロファージから産生されるものであり、リボソーム投与後のDR-, CD11b/c+細胞群で遺伝子発現の増強を認めていることが示されたが、IL-1 β のメッセージの増強は認めなかった。IL-18bpもマクロファージから産生され、IL18と結合することにより、IL18のIFN- γ の産生増強効果を減弱する作用を有する。この事が、T細胞増殖抑制にどのように関与しているのかは、不明である。いずれにしても、CCL9, IL-1 α , IL-18bpはマクロファージの産生する物質であり、我々の実験系におけるimmuno suppressive macrophageを特徴的づける遺伝子発現パターンを示しているものと思われる。

CD276は、B7-H3分子と同じものであり、免疫応答の制御に関わる分子である。その機能に関しては、T細胞機能を促進するという報告と抑制するという報告の相反する2つの報告がある。我々の系においては、B7-H3がT細胞の増殖を抑制する事に関与している可能性があるので、今後B7-H3の役割について、検討を進めて行きたいと考えている。

E. 結論

ラットに空リボソーム溶液を循環血液量の20% (v/v)相当の量を投与した後に、脾臓を取り出し、Con A刺激を加えて培養し、サイトカイン・ケモカインの産生動態の変化を網羅的に観察した。ケモカイン・一部のT細胞由来サイトカイン、IL10, TNF- α , IFN- γ の産生亢進が観察された。特に、主としてマクロファージ由来と考えられるケモカインの産生増強は、リボソームのマクロファージへの一過性の影響の一端を反映しているものと思われる。得られた結果は、リボソーム貪食マクロファージが、貪食後もその機能を保持していることも示している。また、リボソーム貪食マクロファージに特有な遺伝子プロファイルが示され、その中から、T細胞増殖抑制作用に関与する候補遺伝子と考えられるものが同定された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究業績

(原著論文)

1. M. Fujihara, D. Takahashi, H. Abe, H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, H. Ikeda, H. Azuma. Primary and secondary immune responses to keyhole limpet hemocyanin in rats after the infusion of hemoglobin vesicle, an artificial oxygen carrier. *Artif. Organs* 38, 234-238 (March, 2014)

(総説)

1. 酒井宏水, 堀之内宏久, 東 寛, 小田切優樹, 小林紘一. 輸血代替としての人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)製剤の安全性試験. *人工血液* 21, 36-48 (2013)

(著書)

1. H. Azuma, M. Fujihara, H. Sakai. Biocompatibility of hemoglobin vesicles, a cellular-type artificial oxygen carrier, on blood cells and plasma proteins in vitro and in vivo. In: Hemoglobin-based oxygen carriers –principles, approaches and current status (H.W. Kim & A.G. Greenburg eds.) Springer-Verlag (Berlin/Heidelberg, Germany). Chapter 22, pp.385-397, 2013.

(学会発表)

1. H. Sakai, H. Horinouchi, H. Azuma, M. Otagiri, K. Kobayashi / Artificial red cells (Hb-vesicles) for blood substitutes and oxygen therapeutics /14th International Symposium on Blood Substitutes and

Oxygen Therapeutics / Chengdu, China / Oct. 18-21, 2013

2. 東 寛 / 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)を構成する脂質2重膜のもつ免疫調節効果について / 第20回日本血液代替物学会年次大会 / 奈良県新公会堂 / 2013年12月6-7日
3. 東 寛, 高橋弘典, 永井 一樹, 長森恒久, 高橋大輔, 藤原満博, 酒井宏水 / リポソームの投与後の脾細胞からCon A 刺激により産生されるサイトカイン・ケモカイン動態の網羅的解析 / 第20回日本血液代替物学会年次大会 / 奈良県新公会堂 / 2013年12月6-7日

H . 知的財産権の出願。登録状況（予定を含む）

該当なし。

