

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

ヒト血漿 HRG の好中球に対する作用の研究

研究分担者 和 氣 秀 徳 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・助教
森 秀 治 就実大学薬学部・教授
高 橋 英 夫 近畿大学医学部・教授

研究要旨

ヒト血漿から精製した Histidine-rich glycoprotein (HRG) を用いて、単離したヒト好中球に対する生物活性を以下のように明らかにした。1)好中球径を短縮し、正球化する、2)細胞表面の微小絨毛を消失させる、3)活性酸素分子種の産生を低下させる、4)血管内皮細胞への接着性を低下させる、5)微小流路の通過性を維持する。これらの効果は、HRG が循環血中に存在する好中球の活性化レベルを基底状態に維持するのに極めて重要であることを示した。

A. 研究目的

Histidine-rich glycoprotein (HRG) は、分子量約 75KD の血漿タンパクであり、血液凝固系の制御、免疫・炎症応答の制御、血管新生の抑制など種々の生体反応に関与することが示されている。これらの多機能的な働きは、HRG が種々の生体内分子、例えば C1q、Heme、トロンボスポンジン、フィブリノーゲン、プラスミノーゲンアクチベータ、HMGB1、Zn²⁺ などとの結合を介して発現すると考えられている。

本研究では、HRG の新規の機能として見出された好中球に対する作用の全貌を明らかにする。特に、単離したヒト好中球に対する作用を 1)好中球形態に対する作用、2)血管内皮細胞と人工基質に対する好中球の接着性に対する作用、3)好中球の微小流路通過性に対する作用、4)好中球の活性酸素分子種産生に対する作用、に注目し解析する。

B. 研究方法

1. HRG のヒト好中球形態に対する作用

ヒト好中球を健常人末梢血から単離した。HBSS に懸濁した好中球をマイクロプレートに分注し、一定時間 HRG とインキュベーションした後、その形態を蛍光ラベル後の蛍光顕微鏡観察あるいは走査電顕で観察した。

2. HRG のヒト好中球接着に対する作用

単離したヒト好中球をマイクロプレートに分注し、各種条件化に一定時間インキュベートした後、ポリスチレン基材への接着を測定した。血管内皮細胞への接着能は、EA. hy926 細胞単層培養上での接着で評価した。

3. ヒト好中球の微小流路通過性に対する HRG の効果

単離したヒト好中球を一定時間精製ヒト HRG あるいはヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミンとエップンドルフチューブ内でインキュベートした後、Microchannel Flow Analyser (MC-FAN) で 100 μ l の好中球懸濁液の微小流路通過時間を測定し、同時に流路スリットへの細胞接着を観察した。

4. ヒト好中球の活性酸素分子種産生に対する HRG の効果

単離したヒト好中球を一定時間精製ヒト HRG あるいはヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミンとマイクロプレート内でインキュベートし、経時的に活性酸素分子種産生を測定した。細胞内での産生と細胞外への放出を弁別的に測定するため、細胞透過性と非透過性基質をそれぞれ用いた。

C. 研究結果

NiNTA-アガロースアフィニティークロマトグラフィーと MonoQ 陰イオンクロマトグラフィーを用いて、ヒト血漿(凍結新鮮血漿、日本赤十字社製)から HRG を精製した。精製タンパクは SDS-PAGE クマシーブルー染色で分子量の異なる 2 バンドとして検出され、これまで報告されている遺伝子多型の存在と合致した。HBSS を溶媒コントロールとし、精製 HRG、ヒト血清アルブミン(HSA)、ウシ血清アルブミン(BSA)、陽性対照として fMLP の各刺激条件を用いて一定時間インキュベート後、細胞形態を観察した。細胞にはあらかじめ Calcein-AM を取り込ませ、細胞質コンパートメントを、Hoechst33342 で細胞核を蛍光標識し形態を観察した。走査電子顕微鏡で観察する場合には、一定時間後常法により細胞を固定した。その結果、HRG

でインキュベートされたヒト好中球はインキュベート開始後約 15 分で正球化 (In Cell Analyser Workstation software で解析定量化) し、そのままの形態がインキュベーター中保たれた。HRG の効果は可逆的であり、10 nM~1000 nM の広範囲にわたって濃度依存的であった。一方、HBSS、HSA、BSA、fMLP 処理の各好中球は、多様な形態でマイクロプレートに接着し、殆ど正球化の形態は示さなかった。HRG 処理好中球では、Hoechst33342 陽性の分葉核が細胞中心部に折りたたまれている様子が観察され、細胞質の蛍光強度は他の処置群と比べて高かった。

走査電子顕微鏡での観察では、HRG 処理好中球には細胞表面の微絨毛構造が殆どないことがわかった。それに対し、HBSS、HSA、BSA 処置群では、1 ミクロン弱の微絨毛が多数存在していることが確認された。fMLP 処置群では、細胞全体の変形と細胞表面のおうとつが著明であった。

上記のような特徴的な形態変化を示したヒト単離好中球のポリスチレン人工基質と EA. hy926 血管内皮細胞に対する接着性を定量した。接着性は緩く 3 回洗浄操作を行った後の残存細胞数で評価した。その結果、HBSS、HSA、BSA、fMLP 各処置群はいずれの条件下でも高い接着性を示したが、HRG 処置群のみ他のグループと比較し有意に低い接着性であった。

平均 4.5 μ m (高さ) x 7 μ m (幅) の擬似毛細血管流路での好中球通過性が MC-FAN を用いて検討された。その結果、HBSS、HSA、BSA、fMLP 各処置群では隔壁スリット上やスリット内に停滞する好中球が一定頻度で観察された。特に fMLP 群ではスリット構造への強い細胞接着が観察された。一方、HRG 処置群では、そのような細胞は殆どなかった。100 μ l の好中球懸濁液の通過時間について

も、HRG 処置群のみ低い値を示した。

Isoluminol を基質とする化学発光法で測定した細胞外活性酸素分子種の産生実験では、HRG 処置好中球が極めて低いレベルの活性酸素産生状態に誘導されることがわかった。細胞内での活性酸素分子種産生でも同様の結果が得られたが、抑制の程度は幾分低かった。

D. 考察

HRG 処理によってヒト単離好中球にもたらされた形態変化は、世界的に報告のない全く新しい調節系の発見である。形態上の変化は、1) 形態の正球化、2) 細胞径の短縮、3) 細胞表面微絨毛の消失、とまとめることができる。走査電子顕微鏡による細胞表面の観察から推測されるように、表面円滑で微絨毛のない細胞は、人工基質ならびに EA.hy926 血管内皮細胞に対する接着性が低く抑えられていた。ヒト血漿中には約 $1 \mu\text{M}$ 濃度の HRG が存在するので、循環血中における好中球の形態は本研究で明らかにされた3つの特徴を有するものであると推測される。一般的な教科書の記載では、好中球の径は $10 \sim 14 \mu\text{m}$ と表現されているものが多い。この径は、末梢血スミア染色標本における観察に基づき述べたものが多いと考えられる。HRG 存在下における正球形の好中球径は、赤血球のそれに極めて近いことが走査電子顕微鏡による観察と、蛍光染色された顕微鏡像から明らかとなった。

正球化し、微絨毛構造のない円滑な細胞表面の好中球は、擬似毛細血管の通過性においても、極めて優れていることが実験的に証明された。HRG を欠く溶液中でのインキュベートでは、細胞形態の変化とともに微小流路への接着性が高まっていくことがわかった。したがって、生体内における微小循環系にお

ける好中球の通過性維持において HRG は極めて重要な役割を果たすと推測される。このことは、特異的抗 HRG 抗体を用いた実験で、HRG の作用が拮抗されたことから支持されると考えられる。

炎症局所に遊走・浸潤した好中球は、生体内への侵入者である病原性微生物を不活化し、殺傷するのに放出するプロテアーゼ群と活性酸素分子を用いている。貪食後の殺菌過程でも活性酸素は用いられている。一方、循環血中に存在する好中球については、細胞内顆粒の分泌放出や活性酸素の産生活性をできる限り低く押さえ込んでおくことが血管内で不必要な炎症反応を生じさせないために重要である。HRG 処理した好中球で示されたのは、まさに HRG の働きで (HRG のみでも) 好中球活性酸素産生が低く抑えられているという事実である。このことから、HRG は好中球の形態のみでなく、細胞接着、微小流路通過性、活性酸素産性能という機能面までを制御する重要な血漿因子であるといえることができる。したがって、そのような重要な活性を有する因子が、種々の炎症性疾患においてどのように生体内動態が変化するかを明らかにすることは、極めて重要な課題である。

E. 結論

ヒト血漿から精製した HRG が、ヒト単離好中球の形態を特徴的な微絨毛のない正球形に保つ働きを持つことを明らかにした。この好中球の形態は細胞接着を抑え、微小流路通過性に優れたものであることを証明した。さらに HRG は、好中球の活性酸素分子種の産生を極めて低いレベルに維持することを明らかにした。以上の知見から、血漿タンパク HRG が循環好中球の鎮静的維持に極めて重要な役割を果たしていると推測した。

F . 研究発表

1 . 論文発表

Wake H, Mori S, Liu K, Teshigawara K,
Sakaguchi M, Takahashi H, Ohtsuka A,
Yoshino T, Nishibori M.

Histidine-rich glycoprotein prevents septic
lethality through neutrophil regulation.

(submitted)

2 . 学会発表

1) 国際学会

該当なし

2) 国内学会

西堀正洋、和氣秀徳、森秀治.

血漿蛋白 HRG による好中球制御と敗血
症治療薬開発.

第 87 回日本薬理学会年会, 仙台, 2014.

G . 知的財産権の出願・登録状況

1 . 特許取得

好中球活性化に起因する疾患の治療薬、
治療方法及び検査方法

特願 2012-129232 (2012.6.6 出願)

PCT/JP2013/64779 (2013.5.28 出願)

2 . 実用新案登録

該当なし

3 . その他

該当なし