

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	張成宰
学位論文題目			
SCAVENGER RECEPTOR, CL-P1 IS MAINLY INVOLVED IN FUNGAL PHAGOCYTOSIS IN HUMAN VASCULAR ENDOTHELIAL CELLS (ヒト血管内皮ではコレクチン CL-P1 がファゴサイトーシスに重要な役割を担う。)			
共著者名			
大谷克城、福田光子、吉崎隆之、野村直樹、本村亘、福澤純、吉田逸朗、若宮伸隆			
未公表			
研究目的			
<p>コレクチンは、内部にコラーゲン様領域、糖認識領域(CRD)を持つC型レクチンファミリーであり、糖鎖を有する病原体に結合する事により生体防御に関与している。近年、大谷らはスカベンジャー機能を有する膜型コレクチン CL-P1 を見出し、細菌や酵母などと結合し、ファゴサイトーシスする事を明らかにした。さらに、動脈硬化症の原因とされている酸化 LDL(oxLDL)とも結合する事を見出し、動脈硬化症への関与の可能性を示唆している。</p> <p>本論文では、CL-P1 遺伝子発現細胞(CHO/CL-P1)及び生体での CL-P1 発現細胞であるヒト血管内皮細胞株を用いて、CL-P1 の siRNA 実験を行い、CL-P1 依存性ファゴサイトーシスの機構を明らかにするための検討を行った。</p>			
材料・方法			
<p>1. 細胞株</p> <p>細胞は、大谷らが作成した CL-P1 遺伝子発現細胞株(CHO/CL-P1)とヒト血管内皮細胞株として、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)、ヒト臍帯動脈内皮細胞(HUAEC)、ヒト大動脈内皮細胞(HAEC)を以下の実験において用いた。</p>			
<p>2. CHO/CL-P1 を用いた yeast ファゴサイトーシスの条件検討</p> <p>CHO/CL-P1 は 35mm Glass-bottom dish に培養し、Texas red で標識された zymosan を培地に添加し、4℃下 30 分間結合させ、更に 2 時間 37℃にて培養した。4℃下、抗 zymosan ポリクローナル抗体及び Alexa488 標識抗ウサギ IgG でラベルした。細胞を 4% パラホルムアルデヒドを用いて固定後、Hoechst33342 を用いて核染色を行った。蛍光顕微鏡で観察すると、細胞表面に結合したままの zymosan は抗 zymosan ポリクローナル抗体及び Alexa488 標識抗ウサギ IgG で二重染色され、細胞内に取り込まれたもののみ Texas red の赤い単染色である事が確認出来た。</p>			

両者を判別して、ファゴサイトーシスされた zymosan を測定した。

3. CHO/CL-P1 において CL-P1 発現と yeast ファゴサイトーシスの検討

3つの CHO/CL-P1 株を、トリプシン処理後、抗 CL-P1 抗体（ウサギ IgG）と Alexa488 標識抗ウサギ IgG でラベルさせ、Flow cytometry にて、表面の CL-P1 発現を測定した。次にそれぞれの CHO/CL-P1 において、zymosan ファゴサイトーシス能を定量した。

4. CL-P1 の siRNA の条件検討

CL-P1 遺伝子発現細胞 CHO/CL-P1 及び HUVEC を対象にして、Nucleofection kit を用いて、CL-P1 の siRNA の効果検討を行った。siRNA としては、4種類の siRNA mixture を用いて、条件検討を行った。さらに、CL-P1 の遺伝子発現抑制は、real-time PCR にて、messenger RNA (mRNA) の相対定量を行い、比較検討した。

5. HUVEC における種々の遺伝子発現の検討

HUVEC で発現している他のスカベンジャー受容体や血管内皮増殖因子関連分子を real-time PCR を用いて mRNA の定量を行い、内部標準である 18S rRNA との比較により他のスカベンジャー受容体やその他の増殖因子間の mRNA 発現量の比較を行った。

6. ヒト血管内皮細胞における CL-P1 及びその他のスカベンジャー受容体の siRNA によるファゴサイトーシスの検討

ヒト血管内皮細胞を CL-P1 及びその他のスカベンジャー受容体 siRNA 処理を行ってから、2日後 35mm Glass-bottom dish に培養し、Texas red で標識された zymosan を培地に添加し、更に2時間 37°C にて培養した。4°C 下、抗 zymosan ポリクローナル抗体及び Alexa488 標識抗ウサギ IgG でラベルした。細胞を 4% パラホルムアルデヒドを用いて固定後、Hoechst33342 を用いて核染色を行った。蛍光顕微鏡観察により、ファゴサイトーシスされた zymosan を測定した。

7. CL-P1 依存性ファゴサイトーシスのメカニズム解析

遺伝子強発現細胞 CHO/CL-P1 及び HUVEC を対象にして貪食細胞のファゴサイトーシス阻害剤である、Cytochalasin D 及び wortmannin などを用いて、細胞表面結合及びファゴサイトーシスの阻害実験を行った。さらに、スカベンジャー受容体の結合阻害剤である、dextran sulfate や Poly(I) を用いて zymosan の細胞表面へ結合やファゴサイトーシスの阻害実験を行った。

8. CL-P1 のヒトにおける組織発現解析

ヒト CL-P1 に対するマウスモノクローナル抗体とウサギポリクローナル抗体を用いて、ヒト正常組織において CL-P1 の発現を組織免疫染色法にて、検討した。組織は市販のサンプル、旭川医科大学内科第3講座や外科学2講座にて、インフォームドコンセントの得られたヒト組織を用いて行った。本組織は即時に 4% パラホルムアルデヒドで 4°C overnight で固定した。その後パラフィンブロックを作成し、超薄切片を作成し、上記2種類の抗体を用いて、2次抗体としてそれぞれ ABC 法を用いて、染色を行った。染色後、confocal microscope を用いて観察を行った。

9. 統計学的解析

すべてのデータは平均値 標準誤差で示した。また、分散分析に加えて多重比較検定を行い、有意差を判定した。P<0.05 で有意差ありと判定した。

成 績

1. CHO/CL-P1 細胞における CL-P1 依存性ファゴサイトーシス

CL-P1 遺伝子発現細胞 CHO/CL-P1 において、ファゴサイトーシスの過程で結合した粒子と細胞内部へ取り込んだ粒子を簡易に判別できる実験系を樹立した。以下の検討は、この実験系を用いて行った。Flow cytometry 実験とファゴサイトーシス実験により CHO/CL-P1 細胞においては、発現された細胞表面の CL-P1 量に依存して、zymosan が結合し、ファゴサイトーシスされることが明らかとなった。次に、アクチン重合阻害剤である cytochalasin D と PI3 キナーゼに対するインヒビターである wortmannin 処理によりそれぞれの濃度依存的にファゴサイトーシスは阻害された。

2. 血管内皮細胞における種々の遺伝子発現の検討と siRNA の影響

Real-time PCR 実験により HUVEC におけるスカベンジャー受容体の mRNA では CL-P1 は、測定した中でも多量に存在していた。また、通常状態では LOX-1, SR-A, MARCO, Stabilin-2 などのスカベンジャー受容体は real-time PCR では検出限界値以下のレベルであった。HUVEC において、Nucleofection システムを用いて、CL-P1 の siRNA を行ったが、CL-P1 mRNA と蛋白の抑制のみで、他のスカベンジャー受容体の mRNA レベルでの抑制・亢進には影響を及ぼさなかった。また、血管増殖因子やその受容体群への影響も認めなかった。

3. 血管内皮細胞における CL-P1 の siRNA によるファゴサイトーシスの変化

複数のヒト血管内皮細胞株におけるファゴサイトーシスを zymosan の取込みで比較検討したが、siRNA による CL-P1 発現抑制に依存して、zymosan の取込みが低下した。さらに、HUVEC においては 10 細胞株において、同様の実験を試み、程度の差はあるが、CL-P1 発現抑制に応じて、zymosan の取り込みの減少が確認された。

4. 血管内皮細胞における種々の阻害剤によるファゴサイトーシスの変化

血管内皮細胞では、CHO/CL-P1 と同じく cytochalasin D と wortmannin の処理により濃度依存的に zymosan の取込みは阻害された。また、スカベンジャー受容体の阻害剤である、dextran sulfate、poly (I)、酸化 LDL など処理した時にも zymosan の細胞表面への結合や取込みが低下した。

5. CL-P1 の生体組織発現解析

ヒト全身組織における種々な血管部位に、普遍的に CL-P1 の発現が観察された。Tie-2 transgenic マウスの心臓組織において血管内皮マーカーである Tie-2 遺伝子の発現部位との発現が一致している事が明らかになった。

考 案

当初、CL-P1 分子は酸化 LDL の取込み能を持つことにより、この面でのスカベンジャー受容体として注目され、ラット虚血再灌流モデルでの、その発現亢進や、それらの部位における酸化 LDL の取り込み上昇より、動脈硬化の進展への関与が推測されてきた。今回のヒト血管内皮細胞株における siRNA 実験では、CL-P1 分子がこれらの細胞では、通常の培養条件下でも比較的に多量に存在すること、更に血管内皮において、オプソニン非依存性にファゴサイトーシスする機構に主にかかわることが明らかになった。通常は、マクロファージや貪食細胞がオプソニン依存性に微生物をファゴサイトーシスする系で重要であるとされているが、血管内壁では血管自らが、膜蛋白質を介して直接微生物をファゴサイトーシスする自然免疫能を有することが示唆された。

結 論

CL-P1 は、ヒト血管内皮において、オプソニン非依存性に真菌類のファゴサイトーシスに主に関与することが明らかになった。

引 用 文 献

1. Ohtani, K., Suzuki, Y., Eda, S., Kawai, T., Keshi, H., Sakai, Y., Fukuoh, A., Sakamoto, T., Itabe, H., Suzutani, T., Ogasawara, M., Yoshida, I., and Wakamiya, N. The membrane-type collectin CL-P1 is a scavenger receptor on vascular endothelial cells. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 44222-44228
2. Tjelle, T.E., Lovdal, T., and Berg, T. Phagosome dynamics and function. (2000) *BioEssays* **22**, 255-263
- Tse, S. M. L., Furuya W., Gold, E., Schreiber, A. D., Sandvig, K., Inman, R. D., and Grinstein, S. Differential role of actin, clathrin, and dynamin in Fc gamma receptor-mediated endocytosis and phagocytosis. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 3331-3338

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	張 成宰
<p>審査委員長 立野正敏 ㊟</p> <p>審査委員 谷口隆信 ㊟</p> <p>審査委員 若宮伸隆 ㊟</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Scavenger receptor, CL-P1 is mainly involved in fungal phagocytosis in human vascular endothelial cells. (ヒト血管内皮ではコレクチン CL-P1 がファゴサイトーシスに重要な役割を担う)</p>			
<p>コレクチンは、内部にコラーゲン様領域、糖認識領域を持つC型レクチンファミリーであり、糖鎖を有する病原体に結合することにより生体防御に関与している。スカベンジャー機能を有する膜型コレクチン CL-P1 が血管内皮細胞において真菌の接着/食食に生理的な受容体として機能していることを示した論文である。</p> <p>論文提出者は、まず CL-P1 発現細胞 CHO/CL-P1 においてファゴサイトーシスの過程で結合した粒子と細胞内に取り込まれた粒子とを簡便に判別できる実験系を確立した。この系を用いて CHO/CL-P1 細胞において遺伝子導入された CL-P1 の発現量と細胞が zymosan を食食する活性との間に正の相関を示すことを示した。さらに、食食の第1段階である真菌と内皮細胞との接着は CL-P1 特異的な陰性荷電物質で阻害されるが、細胞内情報伝達系、特に食食の主要な因子であるアクチンフィラメント形成を抑制しても阻害されないことを見出している。CL-P1 を内在性に持つ HUVEC 細胞を用いた実験においてもこの現象を確認し、CL-P1 の siRNA を用いた実験において導入された siRNA は CL-P1 mRNA 発現量および蛋白質発現の低下を来すとともに、食食活性の低下をもたらすことを示している。またこれまで</p>			

知られている他のスカベンジャー受容体をノックダウンしても食食活性は低下しないことから、CL-P1は血管内皮細胞において生理的に機能している真菌食食受容体であることを示唆している。マウスおよびヒトの心筋組織像においても CL-P1 は血管内皮細胞に一致して発現しており、説得力のある興味深い知見であると考えられる。論文の構成および手法も適切である。

諮問審査においても非常に適切で論理的な回答がなされ、関連する分野においても十分な知識を有していることを確認した。

以上の結果から、申請者の論文が医学博士の学位に値するものと判定した。