

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	松田 佳也
<p>学位論文題目</p> <p>マウス急性肺障害モデルにおける骨髄系細胞のMDL-1の機能と役割についての検討</p> <p>北海道医学雑誌 88巻 133頁～140頁 2013年 掲載</p> <p>研究目的</p> <p>myeloid DNAX activation protein 12 (DAP12)-associating lectin 1 (MDL-1, CLEC5A)は、CTLDファミリーに属するレクチン型のII型膜タンパクで、ヒト・マウスの単球やマクロファージなどの骨髄系細胞に発現している。リガンドからのシグナルは、会合分子であるDAP12またはDAP10を介して細胞質内へ伝達される。</p> <p>MDL-1のリガンドは未だ不明だが、デングウイルスや日本脳炎ウイルスに結合することが分かっており、MDL-1活性化により肝炎マウスに致死性ショックが引き起こされたとの報告がある。感染やショックの場合において、骨髄系細胞のMDL-1/DAP12 またはMDL-1/DAP10シグナルがこれら病態に対する免疫応答になんらかの役割を担っていることが推測される。</p> <p>さらに、自然免疫系においてTLR4リガンドの1つであるLPSが骨髄系細胞におけるMDL-1シグナルに対して相乗的に作用してRANTES, MDCなどのケモカイン産生を増強することが報告された。また、TLR7 pathwayがMDL-1とともにTNF-α, IFN-γの産生に強く関与していることが示されている。MDL-1からのシグナルは、TLRとのクロストークを通じ自然免疫系において重要な役割をはたしていると考えられる。</p> <p>しかし、肺障害とMDL-1との関係については未だ報告がなく、今回我々は骨髄系細胞におけるMDL-1分子の機能と肺障害との関係に注目し、LPS急性肺障害モデルを用いて検討を行った。</p> <p>材料・方法</p> <p>1. マウス骨髄細胞、腹腔マクロファージ、肺胞洗浄細胞の採取と急性肺障害モデルの作成</p> <p>8-14週齢のC57BL/6マウスを使用した。マウスから骨髄細胞に加え、腹腔洗浄または気管支肺胞洗浄を行い、腹腔マクロファージまたは肺胞洗浄細胞(BAL細胞)を採取した。マウス急性肺障害モデルは、LPSを経鼻的に投与して作成した。肺障害モデルマウスからも同様に各種細胞・組織を採取し検討を行った。</p>			

2. Western blotting によるMDL-1発現の検討

マウス各細胞または組織をlysis bufferで溶解し、各種抗体を結合したSephrose beadsを用いて免疫沈降を行った。免疫複合体を非還元下でSDS-PAGEを行い、メンブレン転写後、anti MDL-1 antibodyでイムノブロットを行った。

3. マウス骨髄系細胞への刺激によるサイトカイン産生能とMDL-1発現の変化

マウス肺胞洗浄細胞、骨髄細胞、腹腔マクロファージの刺激のため抗MDL-1抗体または各種サイトカインを添加のうえ細胞培養を行い、48時間から72時間後に培養上清を回収した。培養上清のTNF- α の測定にはキットを使用した。マウス肺胞洗浄細胞、骨髄細胞、腹腔マクロファージのサイトカイン刺激によるMDL-1の発現はWestern blottingにより検討した。

成 績

1. マウス急性肺障害モデルでのBAL細胞とMDL-1の発現

LPS投与後Day3で、肺障害が最も高度となり、BAL細胞数が最多で、好中球の占める割合が高かった。BAL細胞についてWestern blottingを行ったところ、LPS投与後Day3でMDL-1の発現が最も強かった。

2. MDL-1刺激によるBAL細胞からのTNF- α 産生

肺障害モデルマウスからDay 1, 4にBAL細胞を採取し抗MDL-1抗体で刺激したところDay 1ではTNF- α の産生はむしろ減弱した。一方、Day 4ではMDL-1刺激により著明なTNF- α の産生を認めた。MDL-1抗体に加えLPS添加したところ、より高いTNF- α の産生を認めた。

3. BAL細胞からのTNF- α 産生に対するMDL-1刺激と炎症性サイトカインの相乗効果

Day 3にBAL細胞を採取のうえ、抗MDL-1抗体で刺激し、培養時にRANTES, GM-CSF, IL-12, IFN- γ , TNF- α を添加し、培養上清中のTNF- α をELISAにて解析した。IL-12, IFN- γ 添加群ではいずれも対照群と比較して高いTNF- α 産生能を認めたが、特にIFN- γ 添加群でMDL-1とIFN- γ によるTNF- α 産生能の増強効果を認めた。

4. 炎症性サイトカインによる骨髄系細胞でのMDL-1発現の検討

肺障害マウスの骨髄細胞、腹腔マクロファージ、BAL細胞を採取し、IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-33, IL-4で刺激しMDL-1発現を調べたところ、骨髄細胞で変化を認めず、腹腔マクロファージとBAL細胞でIFN- γ , TNF- α の添加によりMDL-1発現が増強した。IL-33でMDL-1発現の増強を認めIL-17では変化なかったが、IL-4を添加するとBAL細胞でMDL-1発現が増強した一方、腹腔マクロファージでは減弱した。

考 案

LPSはグラム陰性菌の成分であり、DICや多臓器不全を引き起こし敗血症性ショックの原因となる。LPSの経気管的投与は急性肺障害を引き起こし、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)のモデルとして知られている。臨床的にも肺障害またはARDSの原因疾患として重症肺炎や敗血症などの感染症の頻度が多くなっている。肺胞内にはマクロファージが存在し、炎症で滲出してくる好中球や滲出性マクロファージとともに、感染や炎症での免疫応答や肺胞障害の創傷治癒などに重要な役割を担っている。今回のマウス肺組織の検討では、Day 3をピークに炎症細胞浸潤が目立ちBAL細胞のMDL-1発現が最も強かったとの結果から、炎症とMDL-1との関連が考えられた。

敗血症性ショックはサイトカインの過剰産生によって引き起こされ、特にTNF- α が主要な役割を担うと言われている。急性肺障害モデルではTNF- α は組織障害因子の1つとされていることから、今回MDL-1の肺障害への関与の可能性について調べるため、TNF- α 産生を主体に検討を行った。マウスLPS投与後Day1で認めた炎症細胞浸潤においては少なくともLPS投与効果のみで、抗体によるMDL-1刺激では明らかなTNF- α 産生の増強を認めなかった。しかしDay 3, 4では好中球に加え、滲出マクロファージまたは炎症メディエーターにより刺激された組織マクロファージ主体の時期になると、これら骨髄系細胞MDL-1への刺激でより高いTNF- α 産生能を認めた。

BAL細胞の検討では、MDL-1刺激に加えIFN- γ やTNF- α を添加するとBAL細胞のTNF- α 産生能がMDL-1刺激単発よりも高かった。ただ、有意差を認めず、BAL細胞TNF- α 産生能においてIFN- γ やTNF- α による相乗効果がみられたとは言い難い結果であったが、MDL-1は炎症や組織障害増悪の一端を担っている可能性が示唆された。また別に、IFN- γ やTNF- α を付加した場合には、BAL細胞のMDL-1発現が増強しており、この結果からも炎症性サイトカインとMDL-1は相互に関係しつつ、病態進行に関わっている可能性が考えられた。




結 論

MDL-1からのシグナル伝達は骨髄系細胞である好中球やマクロファージの機能と深くかかわっていると考えられ、感染症のみならず、肺障害やARDSの新たな治療戦略のターゲットとなりうるかもしれない。骨髄系細胞においてMDL-1がその分化や活性化においてどのような作用機序を有しているかについては未だ不明な点が多いため、今後さらに解析が進められることが期待される。

引 用 文 献

1. Bakker AB, Baker E, Sutherland GR, Phillips JH, Lanier LL. Myeloid DAP12-associating lectin (MDL)-1 is a cell surface receptor involved in the activation of myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 9792-9796.
2. Aoki N, Kimura Y, Kimura S, Nagato T, Azumi M, Kobayashi H, Sato K, Tateno M. Expression and functional role of MDL-1 (CLEC5A) in mouse myeloid lineage cell. *J Leukoc Biol* 2009; **85**: 508-517.
3. Cheung R, Shen F, Phillips JH, McGeachy MJ, Cua DJ, Heyworth PG, Pierce RH. Activation of MDL-1 (CLEC5A) on immature myeloid cells triggers lethal shock in mice. *J Clin Invest* 2011; **121**: 4446-4461.

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	松田 佳也
審査委員長 原 渕 保明 			
審査委員 大 崎 能伸 			
審査委員 小 林 博也 			
学 位 論 文 題 目			
マウス急性肺障害モデルにおける骨髄系細胞の MDL-1 の機能と役割についての検討			
北海道医学雑誌 88 巻 133 頁～140 頁 (2013 年) に掲載済			
<p>[目的] myeloid DNAX activation protein 12 (DAP12)-associating lectin 1 (MDL-1)は、CTLDファミリーに属するレクチン型の膜タンパクでヒトやマウスの骨髄系細胞に発現している。MDL-1からのシグナルは、会合分子のDAP12またはDAP10を介し細胞質内へ伝達されると考えられている。ウイルス感染やショックなどの病態においてMDL-1の免疫応答への関与が存在すると推測されており、今回、MDL-1と肺障害との関係に注目し、LPS急性肺障害モデルを用いて検討した。</p> <p>[方法] C57BL/6マウスから骨髄細胞、腹腔マクロファージ、肺胞洗浄細胞(BAL細胞)を採取した。マウス急性肺障害モデルは、LPSを経鼻的に投与して作成した。肺障害モデルマウスからも同様に各種細胞や肺組織を採取し検討を行った。骨髄系細胞のMDL-1発現についてはWestern blottingにより検討した。細胞刺激のため抗MDL-1抗体または各種サイトカインを添加して細胞培養を行い、48～72時間後に培養上清を回収のうえTNFαをELISAにより定量した。</p>			

[結果] マウス LPS 投与後 Day3 において肺障害が最も高度で, BAL 細胞数が最多となり, 細胞上の MDL-1 の発現が最も強かった. さらに IFN γ , TNF α , IL-4, IL-33 の添加により MDL-1 発現が増強した. 肺障害モデルマウスから LPS 投与後 Day 1, 4 に BAL 細胞を採取し抗 MDL-1 抗体で刺激したところ Day 1 では TNF α 産生は減弱し, Day 4 では増大した. 抗 MDL-1 抗体刺激に加え IFN γ 添加群では対照群と比較して高い TNF α 産生能の増強効果を認めた.

[要約] 今回の検討で, MDL-1 は炎症性サイトカインと相互に関係しつつ, 炎症や組織障害増悪の一端を担い病態進行に関与していると考えられた. MDL-1 からのシグナル伝達は骨髄系細胞の機能と深く関わっていると考えられ, 肺障害や ARDS の新たな治療戦略のターゲットになり得る可能性が示唆された.

本論文の内容は独創的で, データ解析も十分なされていた. 論文提出者は, 各審査委員から論文内容, 関連領域について試問がなされ, これに対して適切な回答が寄せられた. 以上より当審査委員会は, 本論文が博士の学位に値するものであると結論した.