

論文内容の要旨

論文提出者氏名 角谷 昌俊

論文題目

Allograft inflammatory factor-1 stimulates chemokine production and induces chemotaxis in human peripheral blood mononuclear cells

論文内容の要旨

Allograft inflammatory factor-1 (AIF-1)は、12のアミノ酸配列を有する分子量約17kDの蛋白であり、Ca結合に関与するEF-handと類似した立体構造を有する。AIF-1遺伝子はヒトでは第6染色体のMHC class III領域に座位しており、細胞増殖や炎症細胞の活性化に関与している。AIF-1は乾癬・扁平苔癬・全身性強皮症患者の皮膚組織において、マクロファージやランゲルハンス細胞で発現していることが報告されている。

一方、関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA)は、様々な要因により関節滑膜に炎症が生じ、滑膜細胞が増殖するとともに骨および関節が破壊されることを本態とする疾患である。そこには滑膜線維芽細胞や滑膜細胞の増殖、マクロファージやリンパ球などの炎症細胞のサイトカイン分泌や関節腔内への遊走に関与している。

以前我々はRA患者から採取した単核球や滑膜線維芽細胞においてAIF-1の発現が亢進しており、AIF-1の刺激により滑膜細胞の増殖が促進することを報告した。

またケモカインは白血球などの細胞遊走を惹起するサイトカインで、局所の炎症反応に深く関与している。そのためRAなどの慢性炎症疾患において、ケモカインやケモカイン受容体は重要な治療ターゲットと考えられている。しかしAIF-1とサイトカイン・ケモカインとの関係についてはほとんど知られていない。

今回、健常人の末梢血CD14陽性細胞をAIF-1で刺激し、種々のサイトカイン・ケモカインのmRNA発現をMicroarrayで網羅的に調べた。またCD14陽性細胞をAIF-1で刺激し、得られた細胞上清液に含まれるサイトカイン・ケモカインの産生量をELISAにて定量した。さらにこのAIF-1の刺激で得られた細胞上清液で末梢血単核球の遊走が誘導されるのかcell migration assaysにて評価した。

まず、ヒト末梢血単核球からPCRによりHuman AIF-1のcDNAを得た。cDNAをpGEX-4のBamHI/XhoIサイトに挿入することでAIF-1とグルタチオンS-トランスフェラーゼの融合タンパク質を作成、AIF-1₁₁₃₋₁₂₉抗体

アフィニティークロマトグラフィーによりrhAIF-1 (recombinant human AIF-1)を精製した。抗AIF-1抗体の作成はHuman AIF-1の遺伝子配列の53-71、113-129残基から蛋白質を合成し抗原として用いた。10日間隔で計6回ラビットに免疫することで抗AIF-1抗体を得た。

CD14陽性細胞は健常人5名の末梢血よりFicoll-Paque遠心法で単核球を分取、さらにMACS (磁気細胞分離法)にて採集した。5名の健常人から採集したCD14陽性細胞にrhAIF-1 (100ng/ml)もしくは等量のPBSを添加し、37°Cで24時間培養した。その後CD14陽性細胞を回収しtotal RNAを抽出した。

抽出されたmRNAの発現をMicroarrayにて網羅的に検索したところ、種々のサイトカイン・ケモカイン (CCL1, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1a, CCL7/MCP-3, CCL20/MIP-3a, IL-6 など)がmRNAレベルでup-regulateされていることを確認した。

続いてrhAIF-1で健常人末梢血CD14陽性細胞を刺激しCCL1, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1a, CCL7/MCP-3, CCL20/MIP-3a, IL-6の産生をELISAで定量的に評価した。その結果、CCL1, CCL2/MCP-1, CCL7/MCP-3, CCL20/MIP-3aの産生量はごく少量であったが、CCL3/MIP-1a, IL-6では有意に産生が亢進していた。さらにCCL3/MIP-1a, IL-6はrhAIF-1濃度依存性 (1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml)に産生が亢進することも確認された。

最後に健常人の末梢血CD14陽性細胞をrhAIF-1濃度別 (1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml)に12時間刺激し、その培養上清液を回収。その回収した細胞上清液を用いて健常人末梢血単核球を遊走させたところrhAIF-1濃度依存性に単核球の遊走を認めた。

以上の結果より、rhAIF-1が健常人のCD14陽性細胞を刺激し、サイトカイン・ケモカインに関連する遺伝子を発現させることが確認された。またrhAIF-1の刺激により健常人のCD14陽性細胞が種々のサイトカイン・ケモカインを産生し、実際に細胞遊走を誘導することが確認された。

今回我々はAIF-1がマクロファージを刺激し、末梢血単核球の細胞遊走を誘導することを健常人のCD14陽性細胞とrhAIF-1を用いてin vitroで初めて証明した。このことはAIF-1がRAの病態において病巣への炎症細胞浸潤を誘導し、さらに様々な炎症性サイトカインを産生させることで病態形成に重要な役割を果たしていると考えられた。今後さらにその作用機序が解明されれば、AIF-1はRAをはじめ様々な慢性炎症性疾患の治療ターゲットになり得ると思われた。