

東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	ネクローシス細胞が誘発する炎症応答におけるS100A9 protein産生細胞の同定
別タイトル	Identification of S100A9 protein producing cells in inflammatory responses induced by necrotic neutrophils
作成者(著者)	玉城, 豊
公開者	東邦大学
発行日	2012.3
掲載情報	東邦大学理学修士論文(生物分子専攻)平成23年度. 62. p.1 58.
資料種別	学位論文
内容記述	学位所得年月: 2012年3月 / 指導教員: 永田喜三郎
著者版フラグ	author
メタデータのURL	https://mylibrary.toho-u.ac.jp/webopac/TD09212715

平成 23 年度 修士論文

ネクローシス細胞が誘発する炎症応答に
おける S100A9 protein 産生細胞の同定

指導教員 永田 喜三郎 准教授
東邦大学 理学研究科 生物分子科学専攻
分子医学部門 永田研究室
6310021 玉城 豊

Contents

Introduction	2
Materials and Methods (<i>in vitro</i>)	
・中皮細胞の単離から培養	4
・ネクローシス細胞の調整	6
・腹腔常在性細胞と腹腔浸潤細胞の調整	7
・フローサイトメーターによる解析	8
・中皮細胞との各種共培養	10
・細胞の溶解	11
・細胞磁気分離法による腹腔浸潤細胞内の単球・好中球単離、好中球除去	12
・ELISA 法による検出	15
・Western blotting 法による検出	16
Materials and Methods (<i>in vivo</i>)	
・細胞投与及び腹腔浸潤細胞の回収	20
・リポソーム封入クロドロネートの作製	21
・nec P-PMN とリポソーム封入クロドロネートの腹腔内投与	22
Results and Discussion (<i>in vitro</i> I)	23
Results and Discussion (<i>in vivo</i>)	26
Results and Discussion (<i>in vitro</i> II)	30
Conclusion	32
Figures	35
References	53
Acknowledgement	57

Introduction

生体内で起こる細胞死にはアポトーシスとネクローシス（壊死）が存在する。アポトーシスとはウイルス感染した細胞や癌細胞、または、自己に対する抗体を持ってしまった B 細胞などが、個体の生命を維持するために、遺伝子などの制御によって能動的に起こす死である。また、ネクローシスとは火傷や外科手術など物理的あるいは化学的な損傷により、受動的に起こる死である。

生体内でアポトーシスが起これば、マクロファージなどの貪食細胞により貪食・除去され、その際、炎症は伴わない。一方、多量のアポトーシスが組織内で発生すると貪食細胞により除去しきれずに残存し、二次的ネクローシスに陥る。これにより、細胞小器官を構成する膜の崩壊、細胞の膨化、細胞溶解が起こり、傷害性をもつ細胞内容物が放出される。このネクローシス細胞から放出される傷害性内容物には、**danger signal** として免疫細胞に作用し、炎症促進に関与する物質が多数報告されている。これらは **DAMPs** (**damage-associated molecular patterns**) と総称され、**heat-shock proteins (HSPs)**、尿酸、**high-mobility group box 1 protein (HMGB-1)**、**S100 family** などが含まれる¹⁾。**DAMPs** は **receptor for advanced glycation end-products (RAGE)** や **toll-like receptors (TLRs)** などの受容体に認識されることで、組織内に激しい炎症を誘発する^{2) 3) 4)}。臨床的にも、ネクローシスは急性肝炎などの増悪に寄与していると報告されている⁵⁾。

DAMPs の中でも **S100 family** は特に盛んに研究されている。**S100 family** はカルシウム結合性タンパク質であり、そのうちの **S100A8**、**S100A9**、**S100A12** は自然免疫に関与していることで知られている⁶⁾。**S100A9** はミエロイド系細胞の細胞質に局在しており、好中球では細胞質タンパク質の 30~40 % を占めている。また、ホモ二量体、あるいは **S100A8** とヘテロ二量体を形成することが知られており、特に **S100A8** との結合では **S100A8** の安定性の維持に関与している⁷⁾。炎症下では浸潤してきた好中球により放出され、さらなる好中球の浸潤を誘発するなど炎症促進性因子として機能するとされている^{4) 6) 8) 9)}。臨床では、関節炎、慢性肺炎、炎症性腸疾患など、急性あるいは慢性炎症疾患の炎症巣において検出されることから、これらの疾患の病態形成への関与が示唆されている¹⁰⁾。

一方、近年では、**S100A9** が炎症抑制性因子として機能するという報告もなされている^{11) 12)}。例えば、炎症巣に浸潤してきた好中球は役目を終えるとアポトーシスを起こし、マクロファージに貪食除去されるが、その際に **S100A9** は

好中球ごとマクロファージに取り込まれ、マクロファージの NO、H₂O₂、TNF- α 産生能を抑制するという報告や¹¹⁾、ラットにおいて S100A8/A9 複合体は LPS 投与による肝炎を抑制するという報告などがある¹²⁾。

これらの相反する S100A9 の機能については、S100A9 の翻訳後修飾¹³⁾¹⁴⁾、発現細胞、受容体、微小環境など様々な要因が複雑に絡み合った結果だと考えられているが、その機能の包括的な解明は未だなされていない。

当研究室ではこれまでに、マウス骨髄性白血病細胞株 P388 やチオグリコレート誘導好中球のネクローシス細胞をマウス腹腔内に投与すると、投与初期に好中球が浸潤し、次いで単球/マクロファージの浸潤が認められ、炎症応答が誘発されることが分かっている。また、これらの炎症応答において、腹腔内の S100A9 量を検出したところ、S100A9 の産生ピークが炎症後期にあることが明らかとなった。このことから、S100A9 が炎症の終息に関与している可能性が考えられる。また、S100A9 を分泌するとされる好中球の浸潤ピークとも大きな時間差があることから、好中球以外の S100A9 産生細胞が存在している可能性も考えられる。好中球以外の S100A9 発現細胞としては、単球やマクロファージ、炎症下における上皮細胞、内皮細胞、角化細胞、そして繊維芽細胞などが報告されている¹⁵⁾。このことから、腹膜炎における好中球以外の S100A9 産生細胞としては、中皮細胞、あるいは炎症後期に浸潤してくる単球が考えられる。

そこで、本研究では、ネクローシス細胞により誘発された炎症下における S100A9 の機能を探る一環として、好中球、中皮細胞、単球の S100A9 産生能の検討を行った。最終的には、S100A9 産生細胞がどのような条件下で S100A9 を産生し、産生された S100A9 はどのような役割を果たすのかを明らかにすることで、ネクローシスに関与する炎症疾患の治療に応用することを展望としている。

Materials and Methods (*in vitro*)

《中皮細胞の単離から培養》

◇実験動物

- ・CDF1 マウス (BALB/C ♀ × DBA/2 ♂) (H - 2^d) 5~8 週齢 ♂
実験まで conventional 動物舎で飼育した。

[三協ラボサービス株式会社]

◇試薬

- ・PBS (phosphate buffered saline) リン酸緩衝生理食塩水
0.5 M Na₂HPO₄ 14 ml と 0.5 M KH₂PO₄ 6 ml、NaCl 4.25 g を 超純水 500 ml に溶解させ、120 °C、20 min オートクレーブしたものを 4 °C にて保存した。
各[Nacarai]
- ・FCS (Fetal Bovin Serum) : ウシ胎児血清 [biowest]
56 °C、30 min 非動化したものを使用した。
- ・0.1 % ゼラチン溶液
ゼラチン (精製粉末) [Nacarai] 0.1 g を超純水 100 ml に溶解させ、120 °C、20 min オートクレーブしたものを 4 °C にて保存した。
- ・0.05 % Trypsin/0.02 % EDTA-PBS
Trypsin Cryst [Wako] 0.025 g、EDTA [Nacarai] 0.01 g を PBS 50 ml に溶解させ、濾過滅菌したものを 4 °C にて保存した。

◇培地

- ・DMEM 培地
DMEM [日水製薬株式会社] 9.5 g を超純水 1 L に溶解し、120 °C、20 min オートクレーブした。これに、L-グルタミン [Nacarai] 0.584 g とカナマイシン硫酸塩 [Wako] 0.3 g を超純水 20 ml に溶解し濾過滅菌したものを加えた。さらに、炭酸水素ナトリウム [Nacarai] を 10 % NaHCO₃ 水溶液とし、オートクレーブしたものを 10 ml 加え、4 °C にて保存した。
- ・0.4 mg/ml hydrocortizone 溶液
10 ml の DMEM 培地に 4 mg の hydrocortizon [Sigma] を溶解し、濾

過滅菌したものを 4 °C にて保存した。

- 2.5 µg/ml EGF (Epidermal Growth Factor) 溶液

2.5 µg/ml となるように EGF [Sigma] を DMEM に溶解し、-30 °C にて保存した。

- 12 % FCS-DMEM

- 12 % FCS-DMEM+hydrocortisone+EGF

12 % FCS-DMEM に 0.4 mg/ml hydrocortisone 溶液 100 µl、2.5 µg/ml EGF 溶液 800 µl を加え、4 °C にて保存した。

【中皮細胞の初代培養】

前日、6 cm シャーレに 0.1 % ゼラチン溶液 2 ml をコートし、翌日 PBS で 3 回洗浄して、37 °C で乾燥させた。

マウス 2 匹を脱血死させ、皮を剥ぎ、腹膜、腎臓、脾臓を摘出した。各臓器を PBS を入れたシャーレ内に浸して洗浄後、0.05 % Trypsin/0.02 % EDTA-PBS を入れたシャーレに浸し、37 °C で 50 min インキュベートした。その後、シャーレ内の細胞浮遊液をメッシュに通して回収し、等量の FCS で Trypsin の働きを阻害した。続いて、遠心 (800 rpm、10 min、r. t.) して上清を除去し、12 % FCS-DMEM 10 ml に懸濁してもう一度遠心 (800 rpm、10 min、r. t.) して上清を除去した。12 % FCS-DMEM 3 ml に懸濁し、ゼラチンコートした 6 cm シャーレに播種して 37 °C でインキュベートした。

翌日、非接着性細胞を除去し、12 % FCS-DMEM+hydrocortisone+EGF 3 ml で培養した。2~3 日後、シャーレの約 70 % 以上が敷石上になっていることを確認した。

【中皮細胞の植え継ぎと培養】

植え継ぐ前日、10 cm シャーレをゼラチンコートし、翌日 PBS で洗浄した。

初代培養で約 70 % 以上が敷石上になっていることを確認し、上清を除去した。

0.05 % Trypsin/0.02 % EDTA-PBS を PBS で 5 倍希釈したものを 3 ml 加え、37 °C で 5 min インキュベートした。等量の FCS を加え Trypsin の働きを阻害したのち、チューブに回収して遠心 (1000 rpm、5 min、r. t.) した。上清を除去し、12 % FCS-DMEM 10 ml に懸濁してもう一度遠心 (1000rpm、5 min、r. t.) した。上清を除去し、12 % FCS-DMEM+hydrocortisone+EGF 7 ml に懸濁して、ゼラチンコートした 10 cm シャーレ 1 枚に播種した。

二日後、同様の操作で中皮細胞を剥がし、ゼラチンコートした 10 cm シャーレ 3~4 枚に播種し、さらに二日後に植え継ぐ中皮細胞を実験に用いた。

《ネクロシス細胞の調整》

◇実験動物

- ・CDF1 マウス 5~8 週齢 ♂

◇試薬

- ・PBS
- ・TG 培地 (thioglycollate medium)

TG 培地顆粒 [日水製薬株式会社] 29.3 g を超純水 1 L に加温溶解し、120°C、20 min オートクレーブした後、急冷し、遮光して 3 ヶ月以上経過したものを使用した。

- ・Trypan blue
- ・7 % FCS-DMEM
- ・10×HBSS

HBSS (HANKS' BALANCED SALTS Modified) [SIGMA] 9.5 g, 炭酸水素ナトリウム 0.35 g を超純水で溶解して、pH を 7.0 に調整し、全量を 100 ml とした。濾過滅菌した後、4 °C にて保存した。

- ・1×HBSS

10×HBSS を無菌的な超純水で 1 × に希釈し、4 °C にて保存した。

- ・40 % Percoll

10×HBSS 120 µl, Percoll [GE Healthcare] 1080 µl を混ぜたものを 100% Percoll 1.2 ml とした。これに 1×HBSS 1.8 ml を加え 40 % Percoll とした。

【共培養用ネクロシス TG 誘導好中球の誘導】

TG 培地を 2 ml/mouse で腹腔内投与した 6 h 後に、マウスを脱血死させた。70 % エタノールで消毒し、腹側の外皮を剥いで薄膜を露出させた。腹膜内に冷 PBS 5 ml をシリンジで注射し、腹部を 60 回程度マッサージして腹腔浸潤細胞を浮遊させた。同シリンジにて回収し、あらかじめ氷冷しておいた 15 ml チューブに移し、遠心 (1000 rpm、10 min、4 °C) した。冷 PBS で 2 回洗浄 (1000 rpm、10 min、4°C) し、次に 7 % FCS-DMEM で 1 回洗浄 (1000 rpm、

10 min、4℃) した。これを 1000×10^4 cells/ml に調整し 1.5 ml シリコン処理マイクロチューブに分取した後、液体窒素で凍結し、37 °C、30 min 溶解するという作業（以下凍結融解とする）を 3 回行った。これを -80 °C にて保存し、necrotic DMEM TG 誘導好中球（以下 nec D-PMN）とした。

【腹腔内投与用ネクロシス TG 誘導好中球の誘導】

TG 培地を 2 ml/mouse で腹腔内投与した 6 h 後に腹腔滲出液を冷 PBS で回収した。冷 PBS で 2 回洗浄（1000 rpm、10 min、4℃）し、次に 0.22 μm ミリポアフィルターで 2 回フィルトレーションした冷 PBS で 1 回洗浄（1000 rpm、10 min、4℃）した。これを 450×10^4 cells/ml に調整し 1.5 ml シリコン処理マイクロチューブに 1.2 ml 分取した後、凍結融解を 3 回行った。これを -80 °C にて保存し、necrotic PBS TG 誘導好中球（以下 nec P-PMN）とした。

【ELISA 用ネクロシス TG 誘導好中球の誘導】

TG 培地を 2 ml/mouse で腹腔内投与した 6 h 後に腹腔滲出液を冷 PBS で回収した。遠心（1000 rpm、5 min、4 °C）して上清を除去し、全量が約 4 ml になるくらいまで PBS を加えた。細胞懸濁液を 15 ml チューブ内の 40 % Percoll の上に静かにのせ、遠心（1700 rpm、30 min、4 °C）した。白い層を含む中間層を 15 ml チューブに回収し、10 ml の PBS を加えて遠心（1200 rpm、10 min、4 °C）して上清を除去した（以下 wash）。続けて、wash（1200 rpm、5 min、4 °C）を 2 回行った。PBS に懸濁後、細胞数をカウントして、それぞれ 200、400、600、800、 1000×10^4 cells/ml に調整したものをシリコンチューブに分注した。凍結融解を 3 回行い、-30 °C にて保存して ELISA sample とした。Percoll による好中球精製はフローサイトメーターにて確認した。

《腹腔常在性細胞と腹腔浸潤細胞の調整》

◇実験動物

- ・ CDF1 マウス 5~8 週齢 ♂

◇細胞

- ・ nec P-PMN

◇試薬

- ・ PBS
- ・ Trypan blue
- ・ 7 % FCS-DMEM
- ・ 12 % FCS-DMEM

【腹腔常在性細胞の回収と調整】

マウスを脱血死させ、腹腔常在性細胞を冷 PBS 5 ml であらかじめ氷冷しておいた 15 ml チューブに回収した。遠心 (1000 rpm、10 min、4 °C) し、上清を除去した。続いて、Trypan blue 染色して生細胞をカウントし、7 % FCS-DMEM で細胞数を調整した。

【nec P-PMN の腹腔内投与および腹腔浸潤細胞の回収と調整】

凍結融解後のネクロシス細胞は比較的大きめな、白い浮遊物を生じる。そのため腹腔へ投与する際、そのままでは針を通らずシリンジの中に残留してしまう。そこで、針を付けたシリンジで出し入れをし、白い浮遊物を細かくした。これをマウスに 1 ml (450×10^4 cells) 腹腔内投与し、6 h、9 h、16 h 後にマウスを脱血死させ、冷 PBS 5 ml で腹腔滲出液を回収した。そして、あらかじめ氷冷しておいたシリコンチューブに移し、遠心 (3000 rpm、5 min、4 °C) した。上清を除去し、12 % FCS-DMEM で懸濁しもう一度遠心 (3000 rpm、5 min、4 °C) した。上清を除去し、Trypan blue 染色して生細胞数をカウントし、12 % FCS-DMEM で細胞数を調整した。

《フローサイトメーターによる解析》

◇試薬

- ・ PBS
- ・ 0.01 % NaN_3 /0.5 % BSA-PBS (以下 wash buffer)
 NaN_3 [Nacarai] 0.01 g、BSA (bovine serum albumin) [Sigma] 0.5 g を PBS に溶解し、4 °C にて保存した。
- ・ シース液 (ISO FLOW) [BECKMAN COULTER]
- ・ Trypan blue
- ・ streptavidin-phycoerythrin [R&D Systems]
- ・ propidium iodide (以下 PI) [Bender MedSystems]

5 µg/ml に調整したものを 10 µl/sample で使用した。

◇抗体

- rat anti mouse CD64 (Fcγ receptor I) antibody (clone MOPC-21)
- rat anti mouse CD16/32 (Fcγ receptor III/II) antibody (clone 2.4G2)
- biotin-conjugated rat anti mouse CD11b (Mac-1α subunit) antibody (clone M1/70)
- FITC-conjugated rat anti mouse Ly-6G/6C (Gr-1) antibody (clone RB6-8C5)
- FITC-conjugated rat anti mouse F4/80 antibody (clone HB198)
- isotype control:FITC-conjugated rat anti HLA antibody (IgG_{2b}) (clone SFR8-6B)
- isotype control:biotin-conjugated rat anti HLA antibody (IgG_{2b}) (clone SFR8-6B)

【腹腔浸潤細胞の解析】

Trypan blue 染色にて腹腔浸潤細胞の生存率を確認し、総細胞数を算出した後に、遠心 (3000 rpm、5 min、4°C) した。上清を除き、総細胞を wash buffer 1 ml に懸濁して、再び細胞数をカウントし、 50×10^4 cells 相当量を氷冷した 1.5 ml シリコン処理マイクロチューブに分取した (1 sample×7 本のチューブを用意)。それぞれに rat anti mouse CD64 (Fcγ receptor I) antibody (0.25 mg/ml) 4 µl と、anti CD16/CD32 (FcγR III/II) antibody (0.25 mg/ml) 4 µl を添加し、氷上に 30 min 静置した。遠心 (3000 rpm、5 min、4°C) して上清を除き、biotin-conjugated rat anti mouse CD11b (Mac-1α subunit) antibody (0.5 mg/ml) または biotin-conjugated rat anti human HLA antibody (IgG_{2b}) (0.5 mg/ml) を 2 µl 添加し、氷上に 30 min 静置した。wash buffer を 1 ml 加え遠心・洗浄 (3000 rpm、5 min、4°C) し上清を除く作業 (以下 wash) を 2 回行い、FITC-conjugated rat anti human HLA antibody (IgG_{2b}) (0.5 mg/ml) または FITC-conjugated rat anti mouse Ly-6G/6C (Gr-1) antibody (0.5 mg/ml) または FITC-conjugated rat anti mouse F4/80 antibody (0.5 mg/ml) をそれぞれ 2 µl 添加した。また anti Gr-1 Ab と anti F4/80 Ab には、anti CD11b Ab との二重染色も行い、biotin-conjugated Ab を添加したのものには streptavidin-phycoerythrin 1 µl を添加した。遮光し、氷上に 30 min 静置した後、wash を 2 回行った。その後 PI を 10 µl 加え、遮光して 10 min 氷上で静置した。wash を 2 回行い、500 µl のシース液に懸濁して、フローサイ

トメーターで解析した。各染色抗体において、control 抗体の染色パターンと比較し、蛍光強度が強い細胞集団を positive として評価した。

《中皮細胞との各種共培養》

◇細胞

- ・ 中皮細胞
- ・ nec D-PMN
- ・ 腹腔常在性細胞
- ・ nec P-PMN 誘導腹腔浸潤細胞

◇試薬

- ・ 0.1 % ゼラチン溶液
- ・ 12 % FCS-DMEM
- ・ PBS
- ・ Trypan blue

～ELISA 用～

【腹膜中皮細胞の調整】

共培養実験を行う前日に 12 % FCS-DMEM で懸濁した中皮細胞を 5×10^4 cells/200 μ l/well でゼラチンコートした 96 well plate に播種し、翌日 well 全体が敷石上になっていることを確認した。PBS で 3 回洗浄し実験に用いた。

【腹膜中皮細胞と nec D-PMN との共培養】

張り付いている中皮細胞に nec D-PMN を 10×10^4 cells/well となるように加え、総量 200 μ l/well で培養した。その後、継時的に上清を回収し、-30 °C に保存して ELISA sample とした。

【腹膜中皮細胞と腹腔常在性細胞と nec D-PMN の三種共培養】

中皮細胞と nec D-PMN 10×10^4 cells/well と腹腔常在性細胞 20×10^4 cells/well を総量が 200 μ l/well となるように三種共培養した。その後、継時的に上清を回収し、-30 °C に保存して ELISA sample とした。

【腹膜中皮細胞と腹腔浸潤細胞との共培養】

中皮細胞に腹腔浸潤細胞を 10×10^4 cells/well となるように加え、総量 200 μ l/well で培養した。その後、継時的に上清を回収し、 -30°C に保存して ELISA sample とした。

～Western blotting 用～

【腹膜中皮細胞と腹腔常在性細胞と nec D-PMN の三種共培養】

細胞数、試薬量等を全て ELISA 用の 5 倍量で行った。

《細胞の溶解》

◇試薬

- lysis buffer : 1 % NP-40/4 mM EDTA/2 mM EGTA/20 mM Tris-HCl (pH 7.4)
Trizma-base [Sigma] 0.242 g、EDTA [Nacalai] 0.149 g、EGTA [Nacalai] 0.076 g、NP-40 [Nacalai] 1 ml を超純水に溶解し、HCl [Nacalai] で pH を調整して 100 ml とし、 4°C にて保存した。
- protease inhibitor 溶液
aprotinin [Nacalai]、leupeptin [Sigma]、antai-trypsin [Sigma] をそれぞれ 1 mg/ml、soybeen trypsin inhibitor [Sigma] を 10 μ g/ml となるように超純水に溶解し、 -30°C にて保存した。
- 100 mM PMSF
phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) [Nacalai] 0.0174 g を methanol [Nacalai] 1 ml に溶解し、 -30°C にて保存した。
- PBS
- FCS
- 0.05 % Trypsin/0.02 % EDTA-PBS
- Trypan blue

【共培養した細胞の溶解】

共培養後、0.05 % Trypsin/0.02 % EDTA-PBS を PBS で 5 倍希釈したものを 5 ml 加え、 37°C で 5 min インキュベートした。等量の FCS を加え Trypsin の働きを阻害したのち、15 ml チューブに回収して遠心 (1000 rpm、5 min、 4°C) した。上清を除去し、PBS 10 ml に懸濁して再び遠心 (1000 rpm、

5 min、4 °C) した。出来る限り上清を除去し、PBS 500 µl に懸濁してエッペンドルフチューブに移した。完全に細胞を回収するため、15 ml チューブを PBS 500 µl で洗浄し、先ほどのエッペンドルフチューブに移して総量 1 ml とした。続いて、細胞数をカウントし、遠心 (1000 rpm、5 min、4 °C) して出来る限り上清を除去した。あらかじめ lysis buffer と protease inhibitor 溶液を混合しておいたもの (lysis buffer: protease inhibitor 溶液 = 200:1) を 100 µl /250×10⁴ cells で添加し、さらに 100 mM PMSF を 1µl /250×10⁴ cells で加えて、氷上で 20 min 静置した。その後、遠心 (15000rpm、15 min、4 °C) して上清を回収した。-80 °C にて保存し、western blotting sample とした。

《細胞磁気分離法による腹腔浸潤細胞内の単球・好中球単離、好中球除去》

◇実験動物

- ・ CDF1 マウス 5~8 週齢 ♂

◇細胞

- ・ nec P-PMN

◇試薬

- ・ labeling buffer : 2 mM EDTA/0.5 % BSA-PBS
EDTA 0.0745 g、BSA 0.5 g を PBS 100 ml に溶解させ、濾過滅菌したものを 4 °C にて保存した。
- ・ MACS Columns [Miltenyi Biotec]
細胞単離 : LS Column
細胞除去 : LD Column
- ・ MACS Separators [Miltenyi Biotec]
- ・ streptavidin microbeads [Miltenyi Biotec]
- ・ Trypan blue

◇抗体

- ・ Fc Block 溶液
rat anti mouse CD64 (Fcγ receptor I) antibody (0.25 mg/ml) 80 µl と、anti CD16/CD32 (FcγR III/II) antibody (0.25 mg/ml) 80 µl を labeling buffer で希釈して総量 1 ml にしたものの。

- biotin-conjugated rat anti mouse Ly-6G/6C (Gr-1) antibody
- biotin-conjugated rat anti mouse F4/80 antibody

【腹腔浸潤細胞の磁気染色法】

作業は全て氷上にて行った。

マウスに nec P-PMN を腹腔内投与し、6 h 後に冷 PBS 5 ml にて腹腔浸潤細胞を 30 μ m ナイロンメッシュに通しながら 15 ml チューブに回収した。細胞数をカウントし、 1000×10^4 cells 相当量を別の 15 ml チューブに移して、遠心 (1000 rpm, 5 min, 4 $^{\circ}$ C) した。上清を除去し、細胞を labeling buffer 1 ml に懸濁してシリコンチューブに移した後、遠心 (3000 rpm, 5 min, 4 $^{\circ}$ C) した。上清を除去し、Fc block 溶液 1 ml を添加して 30 min 静置した。遠心 (3000 rpm, 5 min, 4 $^{\circ}$ C) して上清を除去し、labeling buffer 1 ml に溶解した biotin-conjugated rat anti mouse F4/80 antibody (0.5 mg/ml) 40 μ l (単球・好中球分離用) あるいは biotin-conjugated rat anti mouse Ly-6G/6C (Gr-1) antibody (0.5 mg/ml) 40 μ l (好中球除去用) を添加して、30 min 静置した。遠心 (3000 rpm, 5 min, 4 $^{\circ}$ C) して上清を除去し、labeling buffer 1 ml による遠心・洗浄 (3000 rpm, 5 min, 4 $^{\circ}$ C) を 2 回行った。labeling buffer 90 μ l に細胞を懸濁した後、streptavidin microbeads を 10 μ l 添加し、4 $^{\circ}$ C で 15 min 静置した。labeling buffer 1 ml による遠心・洗浄 (3000 rpm, 5 min, 4 $^{\circ}$ C) を 1 回行い、labeling buffer 500 μ l に細胞を懸濁した。

【単球・好中球分離】

LS column を MACS separator の磁場の中に置き、labeling buffer 3 ml を流した。biotin-conjugated rat anti mouse F4/80 antibody で染色した細胞懸濁液 500 μ l をカラムに入れ、カラムスルー溶液を 15 ml チューブに回収しながら、labeling buffer 3 ml を 3 回流した。カラムを MACS separator から外し、labeling buffer 5 ml でカラム内の細胞を 15 ml チューブにプランジャーで押し出して回収した。カラムスルー溶液と精製溶液を遠心 (1000 rpm, 5 min, 4 $^{\circ}$ C) して上清を除去し、labeling buffer 1 ml に懸濁した後、細胞数をカウントした。フローサイトメーター用と細胞培養用にそれぞれ分取した。

【好中球除去】

LD column を MACS separator の磁場の中に置き、labeling buffer 2 ml を流した。biotin-conjugated rat anti mouse Ly-6G/6C (Gr-1) antibody で染色

した細胞懸濁液 500 μ l をカラムに入れ、カラムスルー溶液を 15 ml チューブに回収しながら、labeling buffer 1 ml を 2 回 流した。カラムスルー溶液を遠心 (1000 rpm, 5 min, 4 $^{\circ}$ C) して上清を除去し、labeling buffer 1 ml に懸濁した後、細胞数をカウントした。フローサイトメーター用と細胞培養用にそれぞれ分取した。

【フローサイトメーターによる分離確認】

◇試薬

- PBS
- 0.01 % NaN_3 /0.5 % BSA-PBS (以下 wash buffer)
- シース液 (ISO FLOW)
- Trypan blue
- streptavidin-phycoerythrin
- propidium iodide (以下 PI)
5 μ g/ml に調整したものを 10 μ l/sample で使用した。

◇抗体

- rat anti mouse CD64 (Fc γ receptor I) antibody
- rat anti mouse CD16/32 (Fc γ receptor III/II) antibody
- FITC-conjugated rat anti mouse CD11b (Mac-1 α subunit) antibody
- biotin-conjugated rat anti mouse Ly-6G/6C (Gr-1) antibody
- biotin-conjugated rat anti mouse F4/80 antibody
- isotype control:FITC-conjugated rat anti HLA antibody (IgG_{2b})
- isotype control:biotin-conjugated rat anti HLA antibody (IgG_{2b})

細胞磁気分離法を行った細胞溶液を遠心 (3000 rpm, 5 min, 4 $^{\circ}$ C) して上清を除去し、wash buffer 5 ml に懸濁した。再び遠心 (3000 rpm, 5 min, 4 $^{\circ}$ C) して上清を除去し、wash buffer 1 ml に懸濁した後、細胞数をカウントした。50 \times 10⁴ cells 相当量を氷冷した 1.5 ml シリコン処理マイクロチューブに分取した (1 sample \times 7 本のチューブを用意)。それぞれに rat anti mouse CD64 (Fc γ receptor I) antibody (0.25 mg/ml) 4 μ l と、anti CD16/CD32 (Fc γ R III/II) antibody (0.25 mg/ml) 4 μ l を添加し、氷上に 30 min 静置した。遠心 (3000 rpm, 5 min, 4 $^{\circ}$ C) して上清を除き、biotin-conjugated rat anti mouse Ly-6G/6C

(Gr-1) antibody (0.5 mg/ml) または biotin-conjugated rat anti mouse F4/80 antibody (0.5 mg/ml) または biotin-conjugated rat anti human HLA antibody (IgG_{2b}) (0.5 mg/ml) を 2 µl 添加し、氷上に 30 min 静置した。wash buffer を 1 ml 加え遠心・洗浄 (3000 rpm、5 min、4°C) し上清を除く作業 (以下 wash) を 2 回行い、FITC-conjugated rat anti human HLA antibody (IgG_{2b}) (0.5 mg/ml) または FITC-conjugated rat anti mouse CD11b (Mac-1α subunit) antibody (0.5 mg/ml) をそれぞれ 2 µl 添加した。また anti Gr-1 Ab と anti F4/80 Ab には、anti CD11b Ab との二重染色も行い、biotin-conjugated Ab を添加したのものには streptavidin-phycoerythrin 1 µl を添加した。遮光し、氷上に 30 min 静置した後、wash を 2 回行った。その後 PI を 10 µl 加え、遮光して 10 min 氷上で静置した。wash を 2 回行い、500 µl のシース液に懸濁し、フローサイトメーターで解析した。

【細胞培養】

細胞磁気分離法を行った細胞溶液を遠心 (3000 rpm, 5 min, 4 °C) して上清を除去し、12 % FCS-DMEM 1 ml に懸濁した。再び遠心 (3000 rpm, 5 min, 4 °C) して上清を除去し、12 % FCS-DMEM 1 ml に懸濁した後、細胞数をカウントした。細胞を 10×10⁴ cells/well となるよう 96 well plate に加え、総量 200 µl/well で培養した。その後、1 h、3 h 後に上清を回収し、-30 °C に保存して ELISA sample とした。

《ELISA 法による検出》

◇試薬

・PBS

ELISA で使用する PBS は全て 0.22 µm のミリポアフィルターで濾過したものをを用いた。

・wash buffer : 0.05 % Tween 20-PBS

polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween-20) [Nacalai] 250 µl を PBS 500 ml に溶解した。

・blocking buffer : 1 % BSA-PBS

BSA 0.5 g を PBS 50 ml に溶解し、0.22 µm のミリポアフィルターで濾過したものをを用いた。

・diluent : 0.1 % BSA/0.05 % Tween-20-PBS

BSA 0.1 g を PBS 100 ml に溶解し、0.22 μm のミリポアフィルターで濾過した後、Tween-20 を 50 μl 加えたものを用いた。

- Streptavidin-HRP [R&D Systems]
- ABTS-substrate (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) [Sigma]

◇抗体

- rabbit anti S100A9

本研究室の小松修弥氏、湯浅瑛介氏によって作製された。

- recombinant S100A9

本研究室の小松修弥氏によって作製された。200 ng/ml から 11 段階の 2 倍希釈系列を diluent で作成し、standard とした。

- biotin-rabbit anti S100A9

本研究室の湯浅瑛介氏によって作製された。

【ELISA 法による S100A9 の検出】

96 half well plate に recombinant S100A9 1 $\mu\text{g/ml}$ を 50 $\mu\text{l/well}$ でまき、室温で一晩おいた。

翌日、wash buffer を 150 $\mu\text{l/well}$ 入れて洗い、プレートをキムタオルに叩くようにして、well の水気をとった。これを 4 回行った (以下 wash)。次に、blocking buffer を 150 $\mu\text{l/well}$ でまき、室温で 1 h 静置した。wash 後、sample と standard を 50 $\mu\text{l/well}$ でまき、室温で 2 h 静置した。wash 後、biotin-rabbit anti S100A9 を diluent で 200 倍希釈したものを 50 $\mu\text{l/well}$ でまき、室温で 2 h 静置した。wash 後、streptavidin-HRP を diluent で 200 倍希釈したものを 50 $\mu\text{l/well}$ でまき、室温で 30 min 静置した。wash 後、ABTS-substrate を 50 $\mu\text{l/well}$ でまき、室温で 5~30 min 後 405 nm (対照波長 655 nm) の吸光度を測定した。

《Western blotting 法による検出》

◇試薬

~SDS PAGE~

- 30 % acrylamide

acrylamide monomer [Nacarai] 76 g と N,N'-methlenebisacrylamide

[Nacalai] 4 g を超純水 200 ml に溶解し、4 °C にて保存した。

- 1.5 M Tris-HCl (pH8.8)

Trizma-base 18.165 g を超純水に溶解し、HCl で pH を調整して 100 ml とし、室温にて保存した。

- 1.0 M Tris-HCl (pH 6.8)

Trizma-base 12.11 g を超純水に溶解し、HCl で pH を調整して 100 ml とし、室温にて保存した。

- 10 % SDS

sodium lauryl sulfate [Nacalai] を 10 % となるように超純水に溶解し、室温にて保存した。

- 10 % APS

ammonium peroxodisulfate [Nacalai] 0.1 g を超純水 1 ml に溶解し、-30 °C にて保存した。

- N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) [Nacalai]

- 3× sample buffer

1.0 M Tris-HCl (pH6.8) 15 ml、2-mercaptoethanol [Nacalai] 6 ml、sucrose [Nacalai] 6 g、SDS 2.4 g を超純水に溶解して 40 ml にしたものを室温にて保存した。

- 10× running buffer

Trizma-base 90 g、glycine [Nacalai] 432 g、SDS 30 g を脱イオン水 3 L に溶解して、室温にて保存した。

- 4× dye solution

bromophenol blue [Wako] 1.4 mg、sucrose 0.28 g を超純水 14 ml に溶解して、室温にて保存した。

- Rainbow Marker [Amarsham]

～Western blotting～

- Hybond-P PVDF membrane [Amarsham]

- Extra Thick Blot Paper [BIO-RAD]

- 10× TBS

Trizma-base 30.3 g、NaCl 80 g、KCl 2 g を超純水に溶解し、HCl で pH を 7.5 に調整して 1 L とし、室温にて保存した。

- 0.05 % Tween 20-TBS (TBS-T)

10× TBS を超純水で 1× に希釈したものを 3 L 作製し、Tween-20 1.5

ml を溶解して、室温にて保存した。

- transfer buffer

Trizma base 3.03 g、glycine 14.4 g、methanol を超純水 1 L に溶解して、4 °C にて保存した。

- 2 % skim milk

skim milk [Wako] 4 g を TBS-T 200 ml に加え、一晚室温にて振盪して溶解した。

- SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate [PIERCE]

- recombinant S100A9

- recombinant GST

本研究室の伊与田拓哉氏によって作製された。

◇抗体

- rabbit anti S100A9

- HRP-Goat Anti-Rabbit IgG [Zymed]

【SDS-PAGE】

①ゲルの作製

12.5 % acrylamide lower gel を作成するために、まず 30 % acrylamide 溶液 6.67 ml、1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) 4 ml、10 % SDS 160 μ l、10 % APS 100 μ l、超純水 5.07 ml を転倒混和した。そこに TEMED 10 μ l を加えてさらに 10 回程度転倒混和し、組み立てたゲル板に流し入れ、超純水を 2 ml 重層して、一晚静置・重合させた。次に、5 % upper gel を作成するために、30 % acrylamide 溶液 670 μ l、1.0 M Tris-HCl (pH 6.8) 500 μ l、10 % SDS 40 μ l、10 % APS 50 μ l、超純水 2.74 ml を転倒混和した。そこに TEMED 3 μ l を加えてさらに 10 回程度転倒混和し、あらかじめ濾紙で超純水を除去した lower gel の上に流し込み、コームを刺して、30 min 静置・重合させた。

②泳動 sample と泳動マーカの調整

sample 22 μ l に 3×sample buffer 11 μ l を添加し 5 min 煮沸した。ここに 4×dye solution 10 μ l を加えたものを泳動 sample とした。また、3×sample buffer を超純水で 2× にしたもの 15 μ l に Rainbow Marker 15 μ l を添加し、泳動マーカースとした。

③電気泳動

10×running buffer を脱イオン水で 1× になるように希釈し、泳動層（下

層)に適量入れた。ゲル板からコーム類をはずし、ゲルの破片が残らないように超純水で洗浄し、濾紙で超純水を除去した後、ゲルの下端に気泡が入らないように注意しながら泳動層に沈めて固定した。1×running buffer を泳動層(上層)にゲルのウェルが浸かる程度加えた。ウェルに泳動 sample 30 µl 及び泳動マーカー 20 µl をアプライした。準備が完了したら、20 mA/gel で upper gel を過ぎるまで(およそ 1.5 h)電気泳動し、以降は 30 mA/gel でおよそ 2.3 h 電気泳動した。

【Western blotting】

①セミドライ式トランスファー

SDS-PAGE 後の lower gel を transfer buffer で 10 min 平衡化した。また、Hybond-P PVDF membrane は methanol で 10 sec 平衡化した後、超純水 5 min、transfer buffer 10 min 振盪して平衡化した。Extra Thick Blot Paper も transfer buffer に 10 min 浸して平衡化した。メンブレンとゲルを密着させ、Blot Paper で挟んで TRANS-BLOT SD [BIO-RAD] にセットし、1 h 電圧をかけてタンパク質をメンブレンに転写した。

②抗原抗体反応

メンブレンのマーカーの位置にボールペンで印を付けた後、超純水 5 min、TBS 5 min 振盪して洗浄し、2 % skim milk で 1 h 振盪してブロッキングを行った。その後、TBS-T 5 min 洗浄を三回行い、キムタオルに挟んで水分を除去した。2 % skim milk で 2 µg/ml に希釈した rabbit anti S100A9 2~3 ml を広げたラップ上に滴下し、そこに気泡が入らないようにメンブレンを密着させて室温で 1 h 反応させた。TBS-T で 10 min、5 min、5 min と振盪して、キムタオルで水分を除去した。2 % skim milk で 1/500 に希釈した HRP-Goat Anti-Rabbit IgG を一次抗体と同様に室温で 1 h 反応させた。TBS-T で 10 min、5 min、5 min と振盪して、さらに TBS で 5 min 振盪した。そして、メンブレンに SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate を抗体と同様の方法で付着させ、遮光して室温で 5 min 反応させた。その後、Intelligent Dark Box II [FUJI FILM] で発光を観察した。

Materials and Methods (*in vivo*)

《細胞投与及び腹腔浸潤細胞の回収》

◇実験動物

- ・ CDF1 マウス 5~8 週齢 ♂

◇細胞

- ・ nec P-PMN

◇試薬

- ・ PBS
- ・ Trypan blue

◇中和抗体

- ・ rabbit anti mouse GST antibody
本研究室の伊与田拓哉氏によって作製された。
- ・ rat anti mouse Ly-6G/6C (Gr-1) antibody
- ・ rabbit anti mouse MCP-1 antibody
本研究室の白土佳子氏によって作製された。
- ・ normal rabbit IgG [Sigma]

【nec P-PMN の腹腔内投与および腹腔浸潤細胞・腹腔内洗浄液の回収】

in vitro と同様に行い、投与 16 h 後に腹腔滲出液を冷 PBS 5 ml でシリコンチューブに回収した。遠心 (3000 rpm、5 min、4 °C) して、腹腔浸潤細胞と腹腔内洗浄液に分離し、腹腔内洗浄液は -30 °C にて保存して ELISA sample とした。

【中和抗体と nec P-PMN の腹腔内投与及び腹腔浸潤細胞の回収】

中和抗体は全て 0.2 mg/mouse で nec P-PMN と同時投与し、投与 16 h 後に冷 PBS 5 ml で腹腔浸潤細胞と腹腔内洗浄液を回収した。腹腔内洗浄液は -30 °C にて保存して ELISA sample とした。

《リポソーム封入クロドロネートの作製》

◇実験動物

- ・CDF1 マウス 5~8 週齢 ♂

◇試薬

- ・L- α -Phosphatidylcholine, hydrogenated [Sigma]
- ・Dihexadecyl Phosphate (DCP) [Sigma]
- ・Cholesterol [Wako]
- ・650 mM クロドロネート溶液
Dichloromethylene Diphosphonic Acid [Sigma] 1 g を PBS 5.41 ml に溶解させた。
- ・Nuclepore ポリカーボネートトラックエッチメンブレン [GE Healthcare]
- ・クロロホルム [Nacalai]
- ・TG 培地
- ・Trypan blue
- ・PBS

【リポソーム封入クロドロネートの作製】

L- α -Phosphatidylcholine, hydrogenated (水素添加卵黄ホスファチジルコリン) 0.059 g、Dihexadecyl Phosphate 0.0089 g、Cholesterol 0.025 g を 500 ml ナス型フラスコに採取し、クロロホルムを十分量加え、完全に溶解させた。ロータリーエバポレーター (10~20 min, 37 °C) でクロロホルムを留去させ、フラスコ内に脂質の薄膜を形成させた。さらに完全な溶媒除去のため、真空ポンプを用いて 1 h 乾燥させた後、薄膜に 650 mM クロドロネート溶液を加え、薄膜を剥がしつつよく振り水和した (これ以降の操作は無菌的に行った)。作製したリポソームを 0.8 μm のポリカーボネート膜に通して、15 ml チューブに回収した。さらに、1.5 ml のエッペンドルフチューブに均等に分注し、遠心 (10000 \times g, 60 min, 4 °C) することで、リポソームに封入されなかったフリーのクロドロネートを除去した (この際、フリーのクロドロネートより比重の小さいリポソームは上部に浮遊するため、白い浮遊物を回収した)。続いて、PBS 1 ml を各エッペンに加え、遠心 (10000 \times g, 60 min, 4 °C) して上清を除去するという作業を 2 回行うことで洗浄した。その後、ペレットを PBS 4 ml に懸濁し、15 ml チューブに回収して密封状態で 4 °C にて保存した (この方法での使用

期限は約半年である。)

【リポソーム封入クロドロネートの力価測定】

マウスに TG 培地 2 ml を腹腔内投与し 72 h 後、作成したリポソーム封入クロドロネート 50 μ l、100 μ l、150 μ l をフィルトレーションした PBS にそれぞれ希釈して総量 200 μ l としたものを、マウスに腹腔内投与した。24 h 後、冷 PBS 5 ml で腹腔浸潤細胞を回収した。

《nec P-PMN とリポソーム封入クロドロネートの腹腔内投与》

◇実験動物

- ・CDF1 マウス 5~8 週齢 ♂

◇細胞

- ・nec P-PMN

◇試薬

- ・PBS
- ・リポソーム封入クロドロネート溶液

作成したリポソーム封入クロドロネート 150 μ l をフィルトレーションした PBS に希釈して総量 200 μ l としたものを。

【nec P-PMN とリポソーム封入クロドロネートの腹腔内投与】

マウスに nec P-PMN 1 ml を腹腔内投与し 2 h、6 h、9 h、12 h 後にリポソーム封入クロドロネート溶液をマウスに腹腔内投与した。nec P-PMN 投与 16 h 後に冷 PBS 5 ml で腹腔浸潤細胞と腹腔内洗浄液を回収した。腹腔内洗浄液は -30 $^{\circ}$ C にて保存して ELISA sample とした。

《フローサイトメーターによる解析》

in vitro と同様に行った。

Results and Discussion (*in vitro* I)

A. フローサイトメーターによる腹腔浸潤細胞の解析方法 (Figure 1, 2)

死細胞は PI で染まることが分かっている。PI は FL-3 で検出できるが、FL-2 にも PI の蛍光が漏れこんでしまうため (Fig. 1A)、FSC と PI で、PI ポジティブの死細胞を除き (Fig. 1B)、R1 の細胞を解析対象とした。

CD11b は好中球と単球、好酸球では intermediate (以下 int) に発現しており、マクロファージでは high に発現している。また、Gr-1 は好中球では high に発現しており、単球と好酸球では int、マクロファージでは発現していない。F4/80 はマクロファージでは high に発現しており、単球と好酸球では int、好中球では発現していない。これらのことから、Gr-1^{high}/CD11b^{int} 細胞を好中球 (R2)、Gr-1^{int}/CD11b^{int} 細胞を単球 (R3)、F4/80^{high}/CD11b^{high} 細胞をマクロファージ (R4) とした。また、好酸球は単球と同じ F4/80^{int}/CD11b^{int} 細胞で表面抗原の違いが明確ではないため、さらに FSC、SSC で区別した (R6)。

B. 中皮細胞との各種共培養による S100A9 産生

[1] 中皮細胞と nec D-PMN との共培養 (Figure 3)

TG 培地で誘導した好中球を凍結融解でネクロシスさせ、これを中皮細胞と共培養して、継時的に培養上清を回収した。そして、培養上清中の S100A9 量を ELISA にて検出した。

<結果>

中皮細胞のみの培養上清中からは S100A9 はほとんど検出されず、中皮細胞とネクロシス好中球を共培養した上清中からは高濃度の S100A9 が検出された。しかし、共培養においては 0 h でも S100A9 が高濃度に検出されており、上清中の S100A9 量が継時的に増加するという事はなかった。

<考察>

中皮細胞のみの培養上清中からは S100A9 が検出されなかったことから、中皮細胞は通常状態では S100A9 を分泌しないということが明らかとなった。また、ネクロシス好中球と共培養することで、高濃度の S100A9 が全ての時間帯において検出されたが、共培養 0 h でも検出されていることから、これはネクロシス好中球由来のものであると考えられる。上清中の S100A9 量も一定であったことから、中皮細胞からの新たな S100A9 の分泌はなかったといえる。これらの結果から、中皮細胞はネクロシス好中球から直接刺激されて

S100A9 を分泌しないと考えられる。

[2] 腹膜中皮細胞と腹腔常在性細胞と nec D-PMN の三種共培養 (Figure 4)

ネクロシス好中球が中皮細胞に直接影響を与えないということが示唆されたので、次に間接的に影響を与える可能性を検討した。ここでは、ネクロシス好中球により刺激された腹腔常在性細胞（およそ 50 % が常在性マクロファージ）が中皮細胞に作用する可能性を考え、これらの三種共培養を行った。

<結果>

培養 9 h 後において、中皮細胞とネクロシス好中球、腹腔常在性細胞の三種共培養の方が、ネクロシス好中球と腹腔常在性細胞の二種共培養よりも上清中の S100A9 量が有意に多く検出された (Figure 4-A)。また、腹腔常在性細胞のみからは S100A9 は検出されなかった。

しかしながら、ELISA 法では誤差が大きく、得られた結果に信憑性を欠けるため、同様の条件下で培養した細胞の細胞質に含まれる S100A9 を western blotting 法で検出した。

結果、三種共培養した細胞内に S100A9 は検出されなかった。

<考察>

ELISA 法では 9 h 後において、三種共培養の方が、中皮細胞を除いた二種共培養よりも上清中の S100A9 量が有意に多く検出された。一方で、western blotting 法では同条件下の細胞内に S100A9 を検出する事が出来なかった。このことから、上清中の S100A9 の有意差はネクロシス好中球含有量の微妙な誤差などから生じたものと考えられる。これらの結果から、三種共培養下においても、中皮細胞は S100A9 を分泌しないということが明らかとなった。そこで、腹腔常在性細胞ではなく、腹腔浸潤細胞が中皮細胞に作用する可能性を検討した。

[3] 腹膜中皮細胞と nec P-PMN 誘導腹腔浸潤細胞との共培養 (Figure 5)

炎症下における浸潤細胞が中皮細胞に作用して S100A9 を分泌させる可能性を検討するために、中皮細胞と nec P-PMN 誘導腹腔浸潤細胞との共培養を行った。ここでは、nec P-PMN 投与 6 h、9 h、16 h 後の腹腔浸潤細胞を共培養に用いた。

<結果>

腹腔浸潤細胞のみを培養した場合でも上清中に S100A9 が検出された。また、培養 3 h 後に検出された S100A9 量は、nec P-PMN 投与 6 h、9 h 後と比較

して 16 h 後では減少傾向にあった。しかし、腹腔浸潤細胞と中皮細胞を共培養しても、腹腔浸潤細胞のみより上清中の S100A9 量が増加するという事はなかった (Figure 5A)。

また、共培養に用いた腹腔浸潤細胞の大半は好中球と単球が占めていることが確認できた (Figure 5B)。

<考察>

腹腔浸潤細胞と中皮細胞を共培養しても、腹腔浸潤細胞のみと上清中の S100A9 量が変わらなかったことから、中皮細胞は腹腔浸潤細胞でも刺激されないということが明らかとなった。また、腹腔浸潤細胞のみでも S100A9 が検出されたことから、炎症下における S100A9 産生細胞は浸潤細胞の中に存在していることが示唆されたといえる。S100A9 産生細胞の候補としては、浸潤細胞の大半を占める好中球あるいは単球が考えられる。特に、炎症後期の腹腔浸潤細胞 (16 h) では初期の浸潤細胞 (6 h、9 h) と比較して S100A9 分泌能が減退していることから、炎症初期に浸潤してくる好中球である可能性が高いと考えられる。

Results and Discussion (*in vivo*)

A. nec P-PMN と中和抗体の同時腹腔内投与

in vitro の実験において、ネクロシス細胞が誘発する炎症応答における S100A9 産生細胞は浸潤してきた細胞であり、好中球あるいは単球である可能性が高いと推察された。そこで、*in vivo* でもこれを検討するために、中和抗体による好中球の枯渇実験、単球浸潤の阻害実験を行った。好中球の枯渇には rat anti mouse Ly-6G/6C (Gr-1) antibody、単球浸潤の阻害には rabbit anti mouse MCP-1 antibody を用いた。

[1] nec P-PMN と rat anti mouse Ly-6G/6C (Gr-1) antibody の同時投与 (Figure 6)

<結果>

anti Gr-1 Ab の同時投与により、nec P-PMN のみを投与した場合と比較して著しく好中球の浸潤が抑制されていた。しかしながら、単球浸潤も同時に著しく抑制されてしまっていた (Figure 6A)。

また、anti Gr-1 Ab の同時投与では腹腔内の S100A9 量も、nec P-PMN のみと比較して著しく抑制されていた (Figure 6B)。

<考察>

anti Gr-1 Ab の同時投与により、好中球の浸潤が著しく抑制されていたことから、好中球の枯渇は成功したといえる。しかしながら、影響を受けないと考えていた単球まで浸潤が抑制されていた。これは、炎症応答において単球の浸潤には好中球の浸潤が不可欠であり、好中球の枯渇により連続的に単球の浸潤も阻害されてしまったためであると考えられる。また、Gr-1 のサブセットである Ly-6C は単球にも発現しているため、anti Gr-1 Ab が直接単球に影響を及ぼしてしまっただけの可能性もある¹⁶⁾。

腹腔内の S100A9 量は、anti Gr-1 Ab 投与により著しく抑制されていた。これは好中球・単球の浸潤抑制と非常に相関している。これらの結果から、腹腔内に浸潤してきた好中球、あるいは単球が S100A9 産生に重要な機能を有していると示唆された。

[2] nec P-PMN と rabbit anti mouse MCP-1 antibody の同時投与 (Figure 7)

<結果>

anti MCP-1 Ab の同時投与により、nec P-PMN のみを投与した場合と比較して単球の浸潤を有意に抑制することができた (Figure 7A)。一方で、腹腔内の S100A9 量は anti MCP-1 Ab の同時投与により有意に増加していた。また、anti MCP-1 Ab の control Ab として用いた anti GST Ab でも同様に nec P-PMN のみを投与した場合と比較して、腹腔内の S100A9 量が有意に増加していた (Figure 7B)。

<考察>

anti MCP-1 Ab の同時投与により、単球浸潤を有意に抑制することができたが、一方で腹腔内の S100A9 量は有意に増大していた。このことから、単球浸潤と S100A9 産生には相関がないといえる。これらの結果から、単球は S100A9 産生には関与しておらず、むしろ好中球が関与していると考えられる。

しかしながら、anti MCP-1 Ab の同時投与により、S100A9 産生に関与していると考えられる好中球の浸潤は影響を受けず、また、単球浸潤は減少しているのにも関わらず、腹腔内の S100A9 量が増加している。これと同様の現象が anti GST Ab でも生じていることから、anti GST Ab が腹腔内で何らかの影響を及ぼしていると考えられるが、詳細は不明である。

B. nec P-PMN とリポソーム封入クロドロネートの腹腔内投与

anti MCP-1 Ab 投与により、単球浸潤を有意に抑制することに成功したが、抑制後も浸潤単球数は多く確認されていた。そこで、より強力に単球を阻害するため、単球やマクロファージなどの貪食細胞を枯渇できるリポソーム封入クロドロネートを nec P-PMN 投与後に腹腔内投与することとした。

[1] リポソーム封入クロドロネートの力価測定 (Figure 8, 9)

まず、作成したリポソーム封入クロドロネートが貪食細胞を枯渇できるかどうかを検討するために、チオグリコレート誘導マクロファージ (96 h) の枯渇実験を行った。

<結果>

リポソーム封入クロドロネートを腹腔内投与すると、腹腔浸潤細胞をフローサイトメーターによって解析する際に、腹腔内に残存していたリポソームが検出されてしまっていた。そこで、解析の段階で残存しているリポソームの除去

を F4/80、CD11b の二重染色を用いて行った (Figure 8)。

結果、腹腔内投与したリポソーム封入クロドロネートの量依存的にマクロファージ数が減少していたが、一方で、好中球数の増加が見られた (Figure 9)。

<考察>

リポソーム封入クロドロネートの腹腔内投与により、control と比較して著しくマクロファージ数が減少していたため、作成したリポソーム封入クロドロネートは単球・マクロファージ等の貪食細胞の枯渇に有効であるということが示された。

一方で、好中球数が増加していたが、これは腹腔内に浸潤してきた単球・マクロファージがクロドロネートによりアポトーシスを起こし、続いて二次的ネクロシスに陥ったために、炎症応答が誘発されたためであると考えられる。

実際に単球阻害実験に用いるリポソーム封入クロドロネート量は、最もマクロファージ数が減少していた 150 μ l とした。

[2] nec P-PMN とリポソーム封入クロドロネートの腹腔内投与 (Figure 10)

作製したリポソーム封入クロドロネートが貪食細胞枯渇に有効であることが確認できたため、nec P-PMN 腹腔内投与後にリポソーム封入クロドロネートを腹腔内投与し、腹腔内の S100A9 量にどのような影響が出るのかを検討した。ここでは、最も効果的なリポソーム封入クロドロネートの投与時間を検討するために、様々な時間帯にリポソーム封入クロドロネートの投与を行った。

<結果>

nec P-PMN 投与 2、6 h 後のリポソーム封入クロドロネート投与では、好中球数が有意に減少していた。また、リポソーム封入クロドロネート投与により全ての時間帯で単球数の有意な減少が確認できた。さらに、12 h 後の投与では好酸球数も有意に減少していた (Figure 10A)。一方で、腹腔内 S100A9 量は 2、12 h 後の投与において有意な減少が確認できた (Figure 10B)。

<考察>

nec PMN 投与 2、6 h 後のリポソーム封入クロドロネート投与では、クロドロネート未投与と比較して好中球数・単球数共に有意に減少していた。この時間の単球数が 9 h、12 h よりも大きく減少したのは、好中球数減少に伴う腹腔内 MCP-1 量の減少による影響だと考えられる。また、その際の腹腔内 S100A9 量も有意に減少していたが、好中球数、単球数共に減少していたため、どちらがその変化に大きく貢献していたのかは不明である。また、リポソーム封入クロドロネートは本来貪食細胞の枯渇に有効なものであり、好中球数が減少して

いる結果はこれと矛盾する。その原因として、リポソーム封入クロドロネートによる腹腔常在性マクロファージの枯渇が影響を及ぼしている可能性が挙げられる。腹腔常在性マクロファージは、炎症早期における MIP-2 や KC の分泌だけでなく、MMP-9 という好中球走化性因子を炎症中期 (30 min ~ 6 h) まで分泌しているという報告があり¹⁷⁾、クロドロネート投与はこういった腹腔常在性マクロファージの機能を阻害してしまった可能性がある。

一方で、nec PMN 投与 9、12 h 後のリポソーム封入クロドロネート投与では、単球数のみが有意に減少していた。しかし、その際の腹腔内 S100A9 量は 12 h 後の投与でのみ有意な減少が確認され、単球数との相関は見られなかった。このことから、浸潤単球数が腹腔内 S100A9 産生に関与している可能性は少ないと考えられる。同時に、好中球においてもクロドロネート投与 9、12 h で細胞数に変化が見られず、S100A9 産生と相関が見られないため、同様のことが言える。

唯一、クロドロネート投与 12 h の S100A9 減少と相関するように、原因は不明だが、クロドロネート投与 12 h の好酸球数が有意に減少していた。しかしながら、好酸球が S100A9 を産生・分泌しているとは考えにくく、anti Gr-1 Ab 投与により好中球・単球を枯渇すると、腹腔内 S100A9 も枯渇されることから、好中球または単球が S100A9 産生に重要な機能を有していることは明らかである。これらのことを踏まえると、好酸球が浸潤してきた好中球または単球に何らかの影響を及ぼすことで、これらの細胞から S100A9 を産生させている可能性が考えられるが、より詳細な検討が必要であるといえる。

Results and Discussion (*in vitro* II)

A 細胞磁気分離法による細胞分離を用いた単球・好中球からの S100A9 産生検討

これまでの *in vitro*、*in vivo* の結果から、ネクロシス細胞による炎症応答における炎症後期の S100A9 産生細胞は浸潤してきた好中球である可能性が考えられる。そこで、腹腔内に浸潤してきた細胞から細胞磁気分離法を用いて好中球を単離、あるいは除去して培養することで S100A9 産生にどのような影響が出るかを検討した。ここでは、S100A9 産生能が確認されたネクロシス好中球投与 6 h 後の腹腔浸潤細胞を用いている (Figure 5A)。また、単球も単離して同様の実験を行った。

[1] biotin-conjugated rat anti mouse F4/80 antibody による nec P-PMN 誘導腹腔浸潤細胞からの単球と好中球の分離 (Figure 11)

anti F4/80 Ab を用いて F4/80 positive である単球と F4/80 negative である好中球との分離を行い、フローサイトメーターを用いてこれを確認した。そして、分離した細胞を培養し、上清中に含まれる S100A9 を検出した。

<結果>

分離後は F4/80 positive である単球と好酸球が細胞構成の大半を占めていた。一方で、カラムを通過した細胞はほとんどが好中球であったが、わずかながら単球が残存していた (Figure 11B-A)。分離に使用した抗体濃度を倍にしても結果は同様であった (data not shown)。しかしながら、含まれていた単球はおよそ 10% とわずかであるため、この細胞集団を好中球とした。

また、分離した単球・好酸球集団を培養した場合は、上清中に S100A9 は検出されなかった。一方で、好中球集団を培養した場合は、腹腔浸潤細胞そのものを培養した場合とほぼ同程度の S100A9 が検出された (Figure 11B-B)。

<考察>

分離後の単球・好酸球集団の培養上清からは S100A9 が検出されなかったことから、これらの細胞は S100A9 産生には関与していないことが示唆された。しかしながら、単球・好酸球には実験に用いた anti F4/80 Ab が結合しているため、抗体により何らかの影響を受けて S100A9 産生能が失われた可能性も考えられる。

一方で、好中球集団の培養上清からは S100A9 が腹腔浸潤細胞の培養上清とほぼ同程度に検出された。このことから、ネクロシス細胞が誘発する炎症応

答における S100A9 産生細胞は好中球であることが示唆された。

[2] biotin-conjugated rat anti mouse Ly-6G/6C (Gr-1) antibody による nec P-PMN 誘導腹腔浸潤細胞からの好中球の除去 (Figure 12)

次に、単球・好酸球に結合していた anti F4/80 Ab が、これらの細胞の S100A9 産生能を阻害していないかどうかを検討するために、好中球と結合する anti Gr-1 Ab を用いて好中球の除去を行った。

<結果>

細胞磁気分離法により、カラムを通過した細胞集団からは好中球が完全に除去されていた。しかし、単球と好酸球、マクロファージを合わせても細胞構成の 30% にしか満たなかった (Figure 12B-A)。

また、好中球を除去した細胞集団の培養上清からは S100A9 は検出されなかった (Figure 12B-B)。

<考察>

好中球の除去後、単球・好酸球・マクロファージを合わせても細胞集団の 30% にしか満たなかったが、これは今回用いた抗体染色ではフローサイトメーターで認識できない細胞群が残りの 70% を占めていたためであると考えられる。また、anti Gr-1 Ab は一部の単球にも結合する。これにより好中球と一部の単球が除去されたことが、フローサイトメーターで認識できない細胞群の割合を高めた一因であると考えられる。

また、好中球を除去した細胞集団、すなわち単球・好酸球の培養上清からは S100A9 は検出されなかった。これらの細胞には抗体は結合していない。このことから、anti F4/80 Ab が結合したことで S100A9 産生能が失われたという可能性は否定された。

B 浸潤好中球にふくまれる S100A9 量 (Figure 13)

細胞磁気分離法により浸潤好中球が S100A9 産生細胞である可能性が示唆されたため、浸潤好中球内にはどれだけの S100A9 が含まれているのかを検討した。ここでは、マウスにチオグリコレート培地を腹腔内投与し 6 h 後に回収した後、percoll によって好中球の精製を行った。そして、細胞数を調整した後に、凍結融解でネクロシスへと誘導し、ネクロシス溶液に含まれる S100A9 量を検出した。

<結果>

200×10⁴ cells/ml の好中球にネクロシスを誘発させると、およそ 15.97 μg/ml の S100A9 が検出された。また、好中球数依存的に S100A9 量も増加した (Figure 13)。

<考察>

nec P-PMN 誘導腹膜炎では、好中球は約 200~400×10⁴ cells 浸潤し、S100A9 はおよそ 10 μg/mouse 腹腔内に産生される。結果と比較すると、好中球内には炎症時における S100A9 産生を十分担う事ができるだけの S100A9 が存在している事が明らかとなった。

Conclusion

今回、ネクローシス細胞が誘発する炎症応答の後期における S100A9 産生細胞を同定するために、中皮細胞、単球、好中球に着目して実験を行った。

まず、中皮細胞はネクローシス細胞に直接刺激されることで¹⁸⁾、あるいは炎症性細胞と相互作用することでも炎症応答に関与することから¹⁹⁾、中皮細胞について *in vitro* で検討した。

はじめに、中皮細胞がネクローシス好中球に直接あるいは間接的に刺激されることを考え、腹腔常在性細胞の存在下および非存在下で、中皮細胞とネクローシス好中球とを共培養した。しかし、どちらにおいても中皮細胞からの S100A9 産生は認められなかった (Figure 3, 4)。次に、腹腔に浸潤してきた細胞が中皮細胞を刺激する可能性を考え、中皮細胞と腹腔浸潤細胞との共培養も行ったが、この場合も中皮細胞からの S100A9 産生はなかった (Figure 5A)。これらの結果は、中皮細胞はネクローシス細胞が誘発する炎症応答における S100A9 産生に関与していない事を示唆している。

一方で、腹腔浸潤細胞のみを培養した場合でも S100A9 は培養上清中に検出された (Figure 5A)。培養に用いた腹腔浸潤細胞は、ほとんどが好中球と単球で構成されていたため、どちらかが S100A9 産生に関与している可能性が高いと考えられる (Figure 5B)。

そこで、次に *in vivo* で中和抗体による好中球枯渇、単球浸潤阻害実験を行った。結果、anti MCP-1 Ab により単球浸潤を阻害しても S100A9 の産生に影響はなかったが (Figure 7)、anti Gr-1 Ab により好中球・単球を枯渇すると S100A9 の産生も相関するように枯渇されていた (Figure 6)。これらの結果は、浸潤してきた好中球が S100A9 産生細胞である可能性を示唆している。

そこで、細胞磁気分離法を用いて腹腔浸潤細胞から好中球を単離あるいは除去して培養し、上清中に S100A9 が産生されるかを検討した。結果、好中球を単離した場合は、上清中に S100A9 が検出されたが (Figure 11B-B)、好中球を除去すると S100A9 は検出されなかった (Figure 12B-B)。また、好中球内には *in vivo* で産生されている S100A9 を十分補えるだけの S100A9 が含まれていた (Figure 13)。

以上の結果より、ネクローシス細胞が誘発する炎症応答の後期における S100A9 産生細胞は、浸潤してきた好中球であることが明らかとなった。しかしながら、炎症初期に浸潤してくる好中球が、どのようにして炎症後期の S100A9 産生に関与しているのかは不明である。

近年、好中球からの S100A9 分泌は、好中球の生存率と相関しているという報告がなされている²⁰⁾。また、炎症巣に浸潤してきた好中球は、役目を終えるとアポトーシスを起こし、貪食細胞に除去されるが、これが炎症の終息に重要である²¹⁾。さらに、アポトーシス細胞は膜構造を維持しており、細胞内タンパク質は放出されないと考えられているが、一方で Annexin A1 などのタンパク質はアポトーシス細胞から分泌され炎症抑制性機能を発揮するという報告もなされている²²⁾。これらをふまえると、炎症初期に浸潤してきた好中球は、アポトーシスを介して炎症後期に S100A9 を分泌している可能性が考えられる。今後は、浸潤好中球の細胞死の継時的な観察や、好中球のアポトーシス阻害が S100A9 の分泌に影響を及ぼすかなどの検討が必要である。

また、S100A9 は炎症後期に検出されていることから、浸潤好中球から分泌された S100A9 は炎症抑制性機能を発揮していると考えられる。しかしながら、本研究で用いたネクローシス好中球は、浸潤好中球由来の S100A9 を多量に含んでいるにもかかわらず炎症応答を誘発している。S100A9 の中和抗体投与などの実験から炎症後期における S100A9 の機能を明確にする必要があるが、この矛盾は S100A9 が翻訳後修飾や微小環境によって機能を改変する可能性があることから説明できるかもしれない。すなわち、好中球のアポトーシスという環境の変化が S100A9 の機能に影響している可能性が考えられるが、より詳細な検討が必要である。

本研究では、ネクローシス細胞が誘発する炎症応答における S100A9 産生細胞が好中球であることを明らかにすることができた。今後は、好中球が炎症後期に S100A9 を分泌するメカニズムを明らかにするとともに、どのような条件下で S100A9 を分泌するのかということも検討し、S100A9 の機能解明を目指す予定である。

Figures
(in vitro)

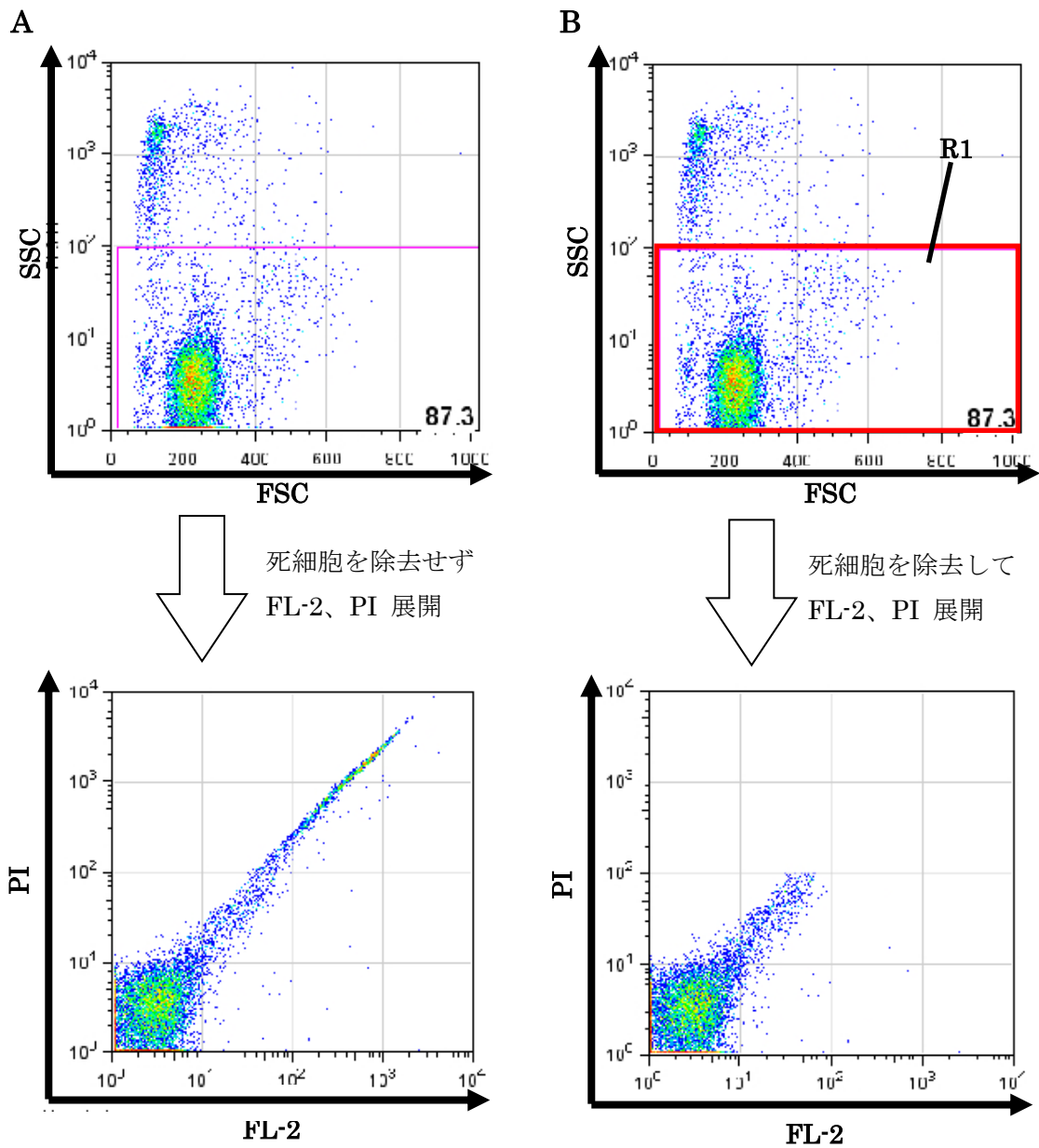


Figure 1. フローサイトメーターによる腹腔浸潤細胞の解析における死細胞除去

PI 染色による死細胞除去を行わず、FL-2 と PI で展開した (A)。FSC と PI で示したものに、R1 のゲートをかけ死細胞を除き、その R1 を FL-2 と PI で展開した (B)。

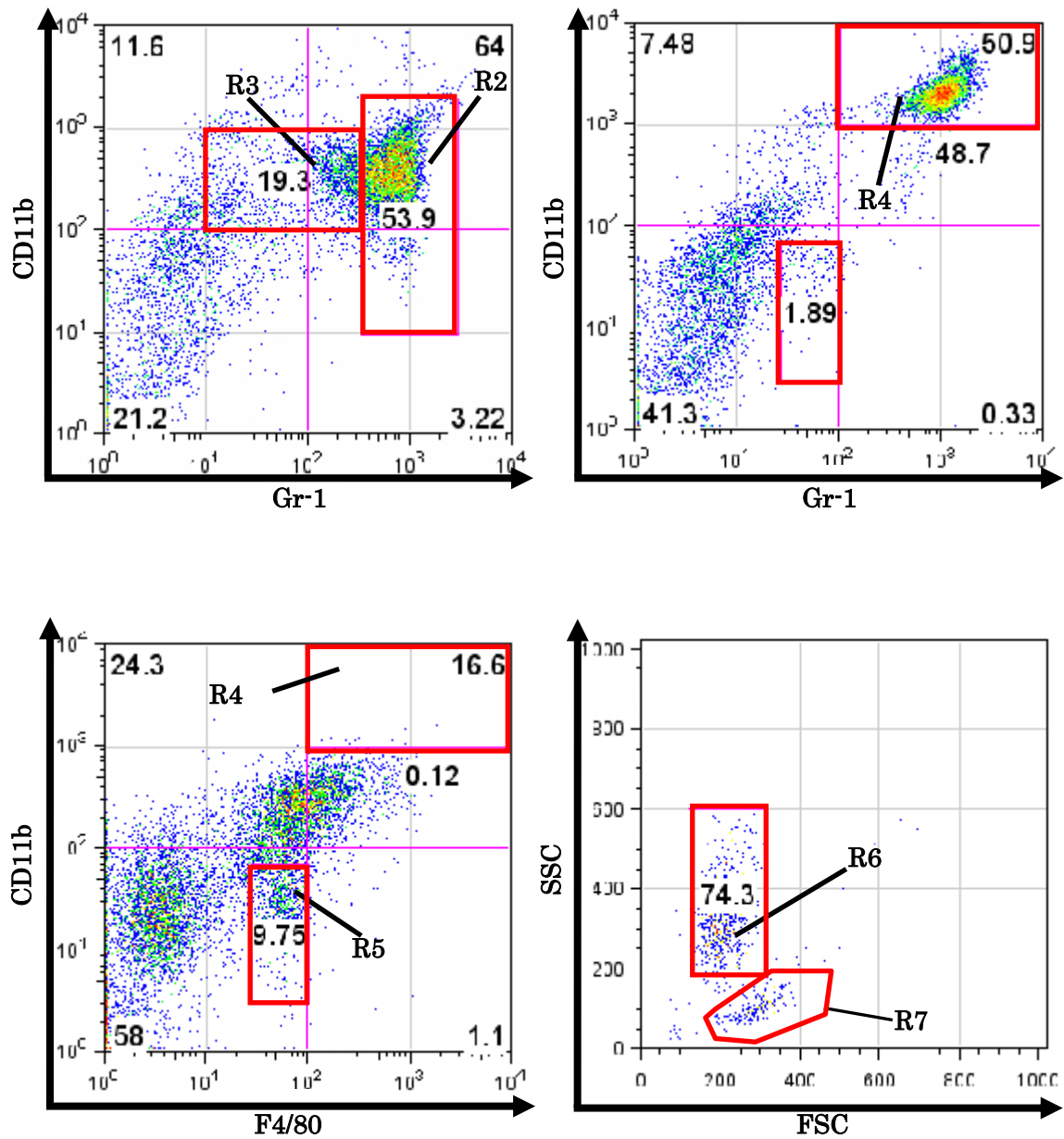


Figure 2. フローサイトメーターによる腹腔浸潤細胞の解析方法

Figure 1. で死細胞を除いた R1 中の細胞を、好中球、単球、マクロファージ、好酸球それぞれの表面抗原の違いによりゲートをかかけた。好中球・好酸球は表面抗原の違いのみでは混在してしまうため (R3, R5)、さらに FSC、SSC 展開でゲートをかかけた (R6, R7)。R2. 好中球 (Gr-high / CD11b^{int})、R4. マクロファージ (F4/80^{high}/CD11b^{high})、R6. 好酸球 (F4/80^{int}/CD11b^{int})、R7. 単球 (Gr-1^{int} / CD11b^{int}) とした。

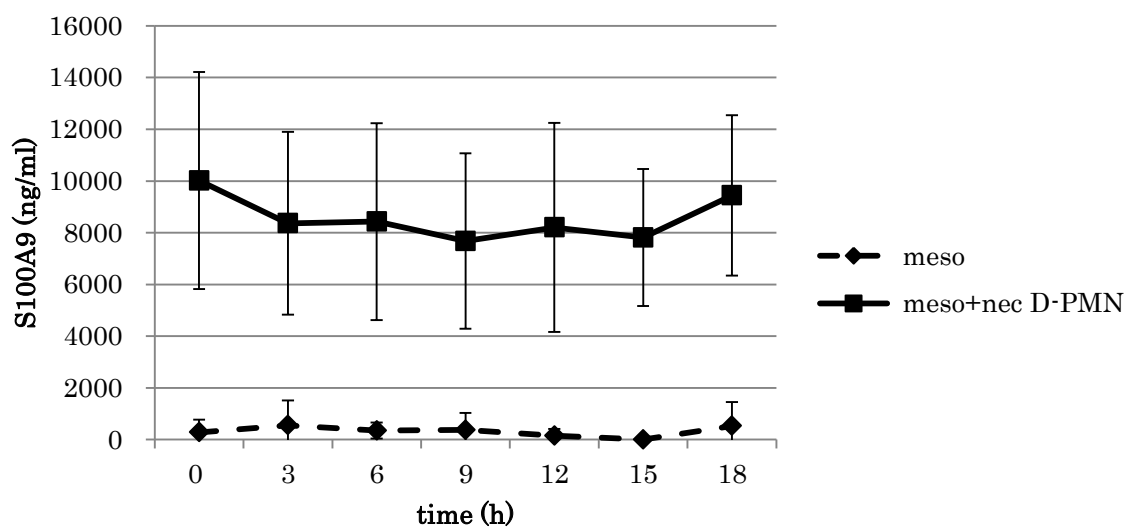


Figure 3. 中皮細胞とネクロシス好中球との共培養における上清中 S100A9 量の継時的変化

中皮細胞 (meso) とネクロシス好中球 (nec D-PMN) とを共培養し、継時的に培養上清中に含まれる S100A9 量を ELISA にて検出した。

n=3 (mean±S.D.)

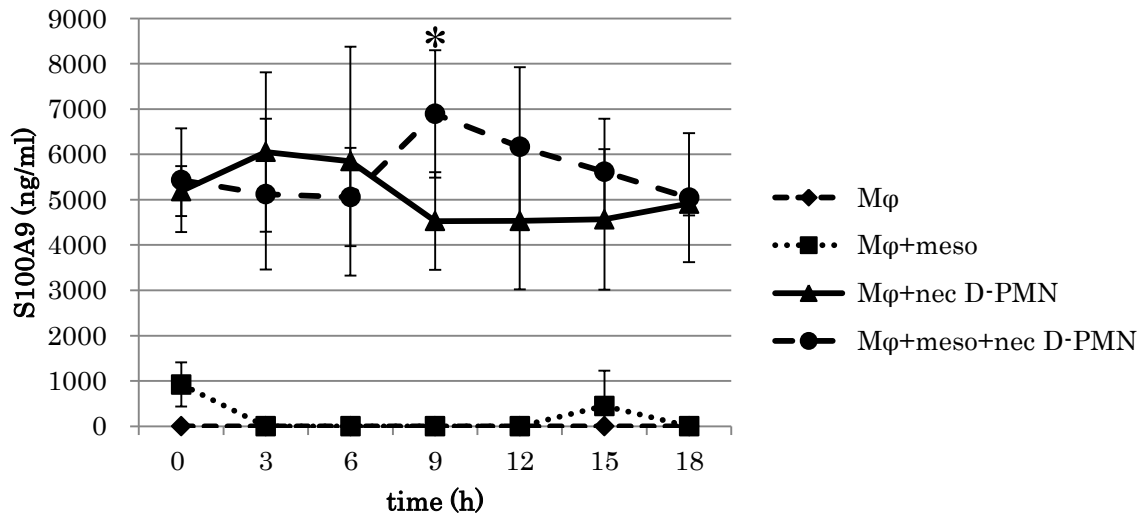


Figure 4-A. 中皮細胞とネクロース好中球と腹腔常在性細胞との三種共培養における上清中 S100A9 量の継時的変化

中皮細胞とネクロース好中球と腹腔常在性細胞 (Mφ) とを共培養し、継時的に培養上清中に含まれる S100A9 量を ELISA にて検出した。

n=3 (mean±S.D.) *p<0.05

	meso+	meso+	Mφ+	meso+Mφ+
	meso	nec D-PMN	Mφ	nec D-PMN
	lysate	lysate	lysate	lysate
rGST				
rS100A9				

Figure 4-B. 中皮細胞とネクロース好中球と腹腔常在性細胞との三種共培養 9 h 後における上清中 S100A9 量

中皮細胞とネクロース好中球、腹腔常在性細胞 (Mφ) を共培養し、9 h 後に培養上清中に含まれる S100A9 量を western blotting 法にて検出した。

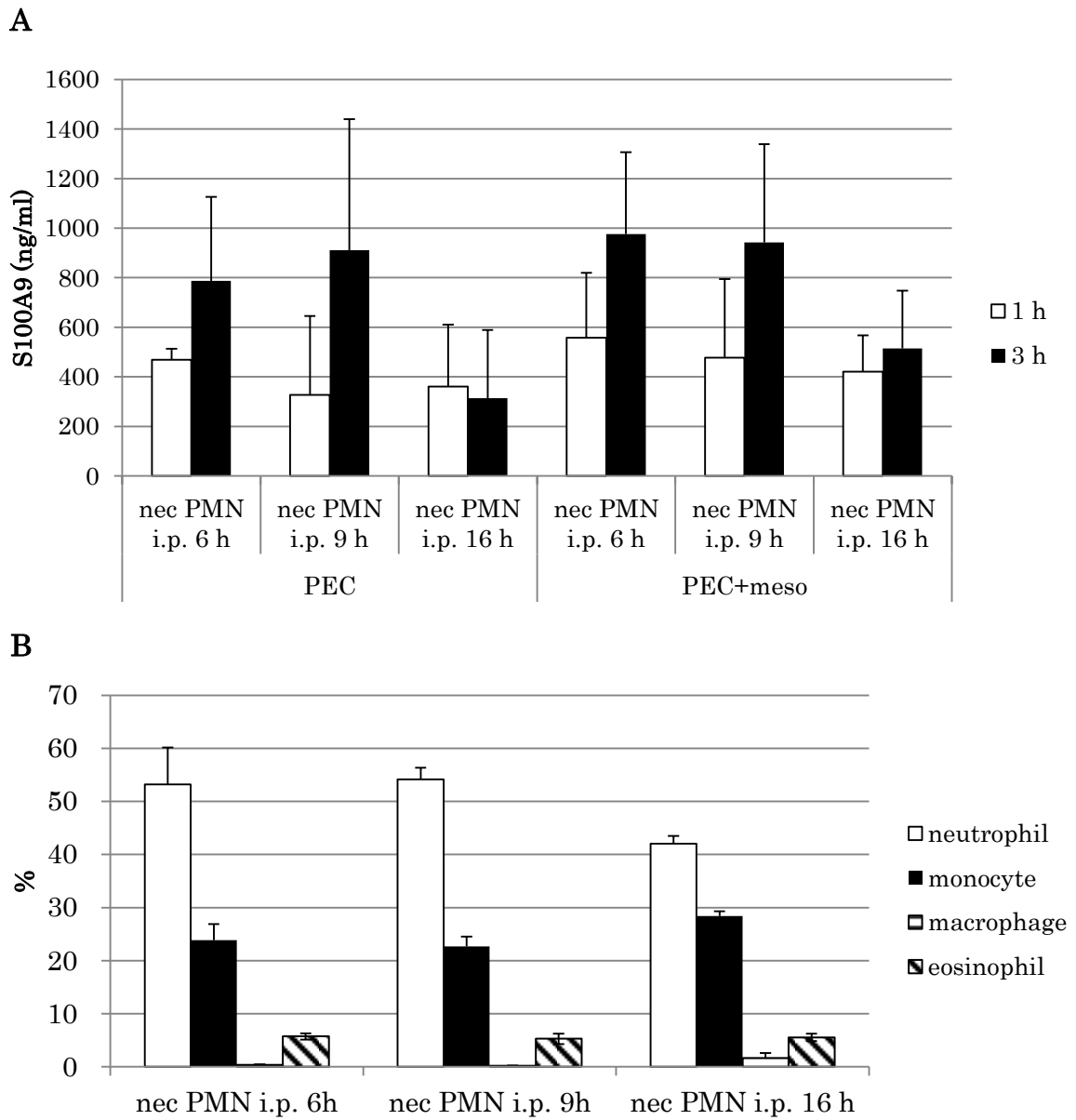


Figure 5. 中皮細胞と nec P-PMN 誘導腹腔浸潤細胞との共培養における上清中 S100A9 量

nec P-PMN を腹腔内投与し 6 h、9 h、16 h 後に冷 PBS にて腹腔浸潤細胞 (PEC) を回収した。中皮細胞と各 PEC を共培養し、1 h、3 h 後に上清を回収した。上清中に含まれる S100A9 を ELISA にて検出した (A)。また、共培養に用いた PEC の細胞構成をフローサイトメーターにて解析した (B)。

n=2-3 (mean±S.D.)

Figures

(in vivo)

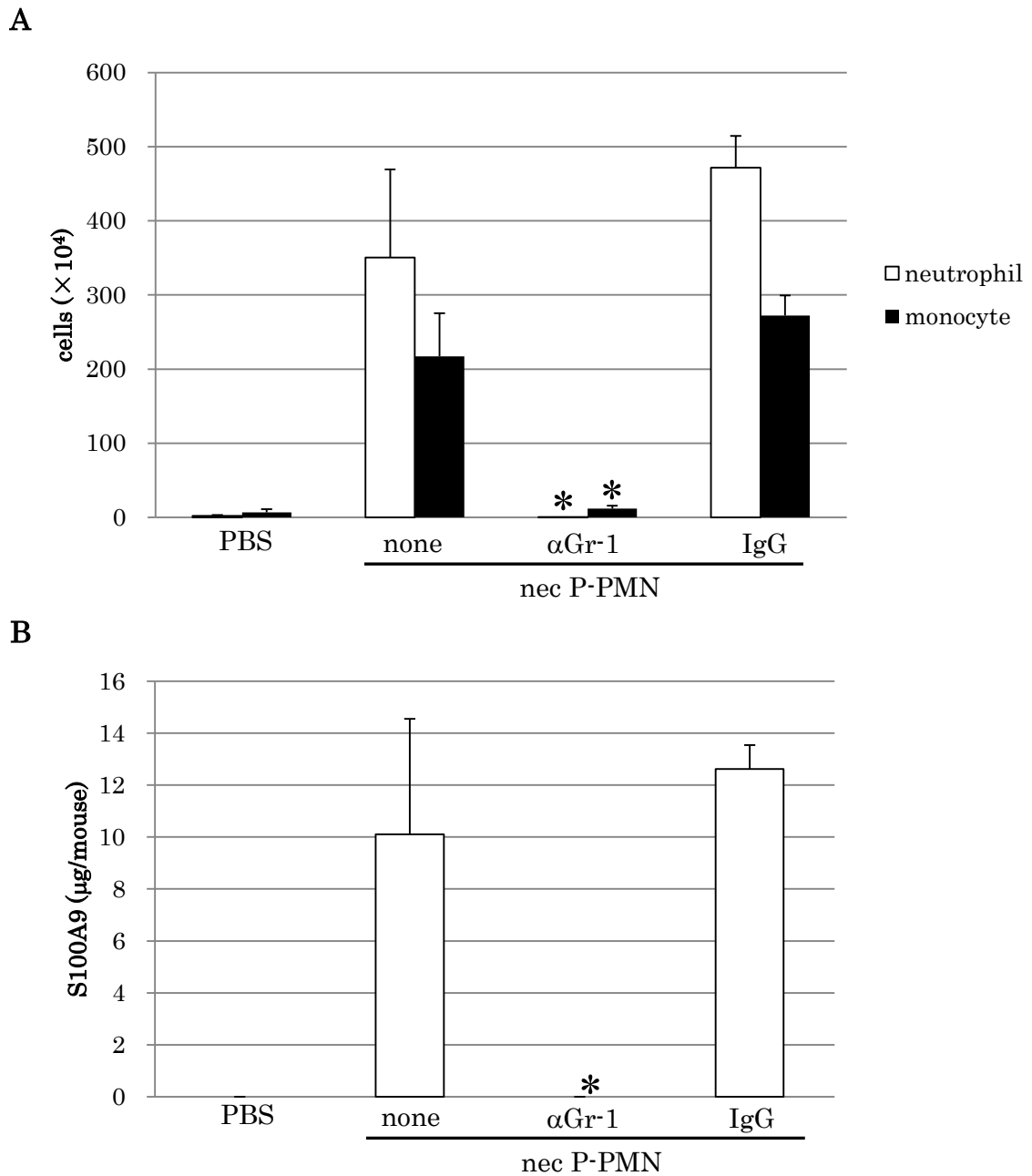


Figure 6. α Gr-1 Ab 同時投与が nec P-PMN 誘導腹膜炎の腹腔内 S100A9 量に与える効果

nec P-PMN と α Gr-1 Ab を同時に腹腔内投与し、16 h 後に腹腔滲出液を冷 PBS 5 ml にて回収した。腹腔浸潤細胞をフローサイトメーターで解析し (A)、腹腔内洗浄液中に含まれる S100A9 を ELISA にて検出した (B)。

n=3-6 (mean \pm S.D.) *p<0.01 versus none

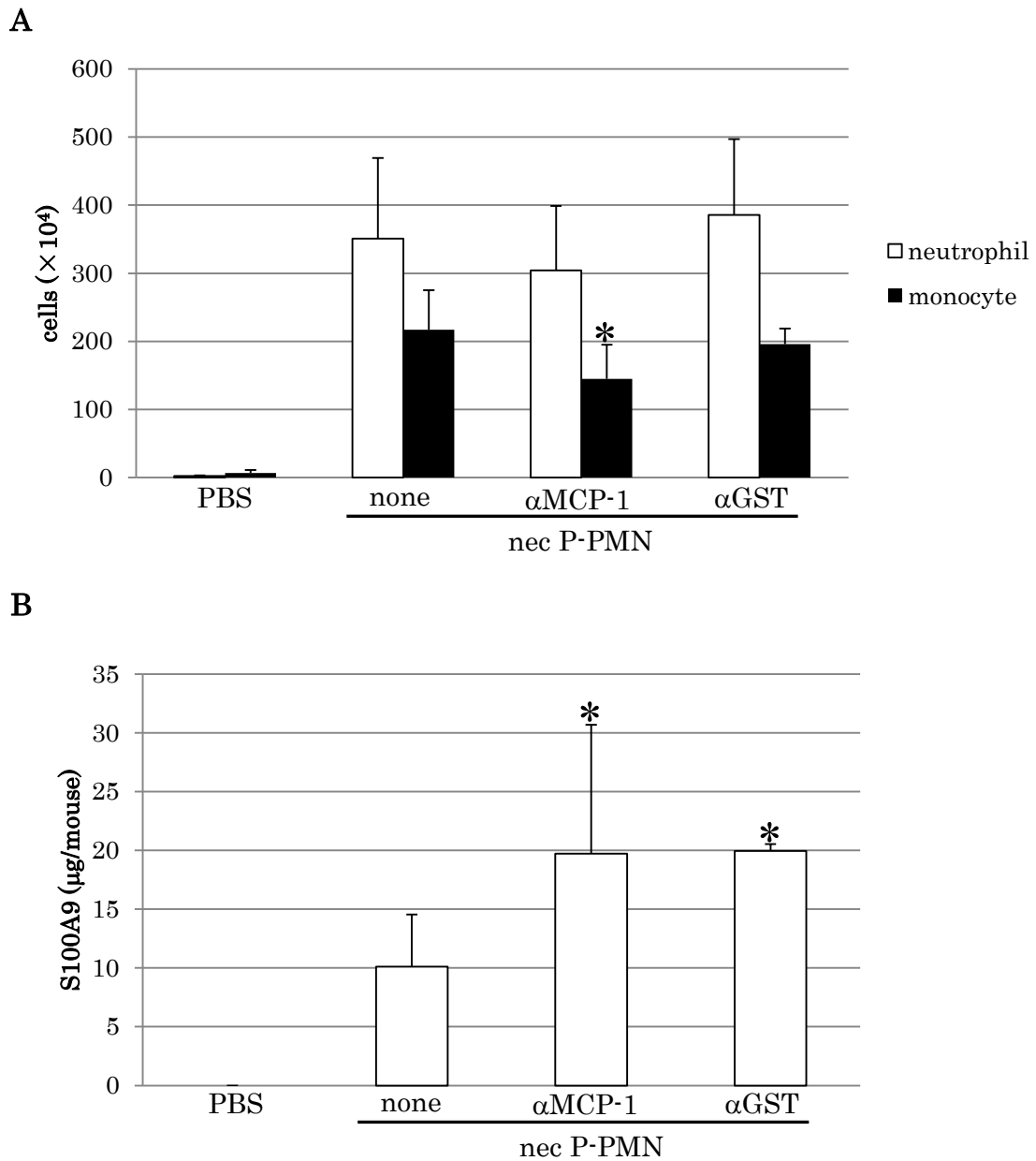


Figure 7. α MCP-1 Ab 同時投与が nec P-PMN 誘導腹膜炎の腹腔内 S100A9 量に与える効果

nec P-PMN と α MCP-1 Ab を同時に腹腔内投与し、16 h 後に腹腔滲出液を冷 PBS 5 ml にて回収した。腹腔浸潤細胞をフローサイトメーターで解析し (A)、腹腔内洗浄液中に含まれる S100A9 を ELISA にて検出した (B)。

n=3-6 (mean \pm S.D.) *p<0.05 versus none

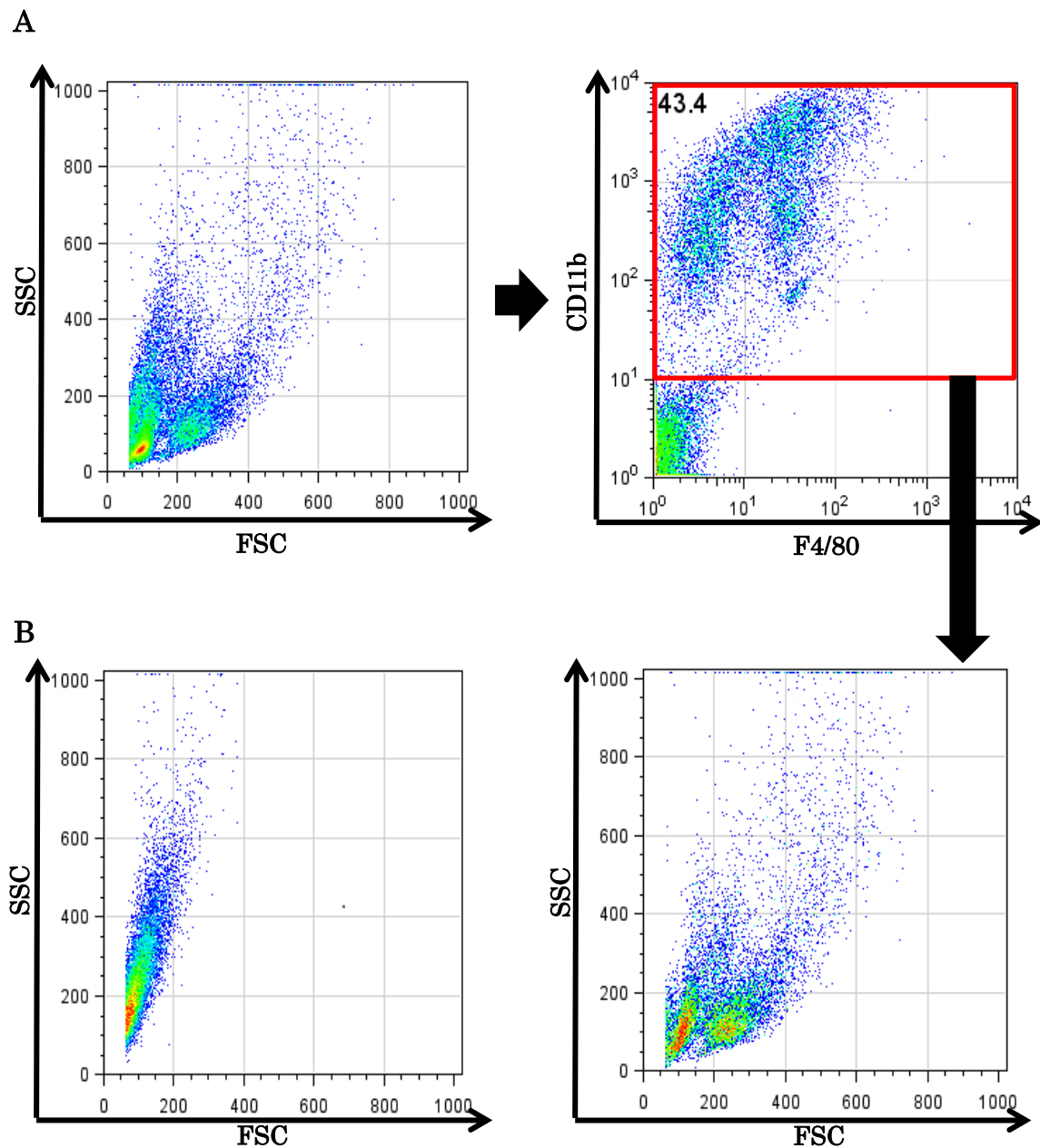


Figure 8. リポソーム封入クロドロネートを腹腔内投与した際の残留リポソームの除去

nec P-PMN を腹腔内投与し、72 h 後にリポソーム封入クロドロネートを腹腔内投与した。nec P-PMN 投与 96 h 後に腹腔滲出液を回収し、腹腔浸潤細胞をフローサイトメーターにて解析した (A)。また、作成したリポソーム封入クロドロネートそのものもフローサイトメーターで解析した (B)。

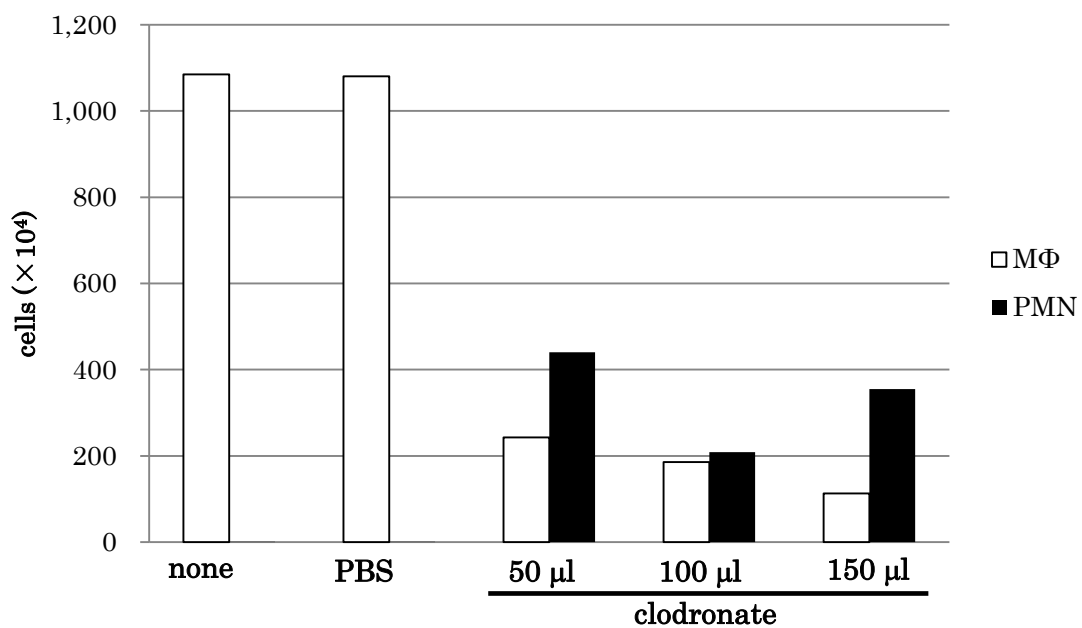


Figure 9. リポソーム封入クロドロネートの力価測定

nec P-PMN を腹腔内投与し、72 h 後にリポソーム封入クロドロネートを腹腔内投与した。nec P-PMN 投与 96 h 後に腹腔滲出液を回収し、腹腔浸潤細胞をフローサイトメーターにて解析した。

n=1

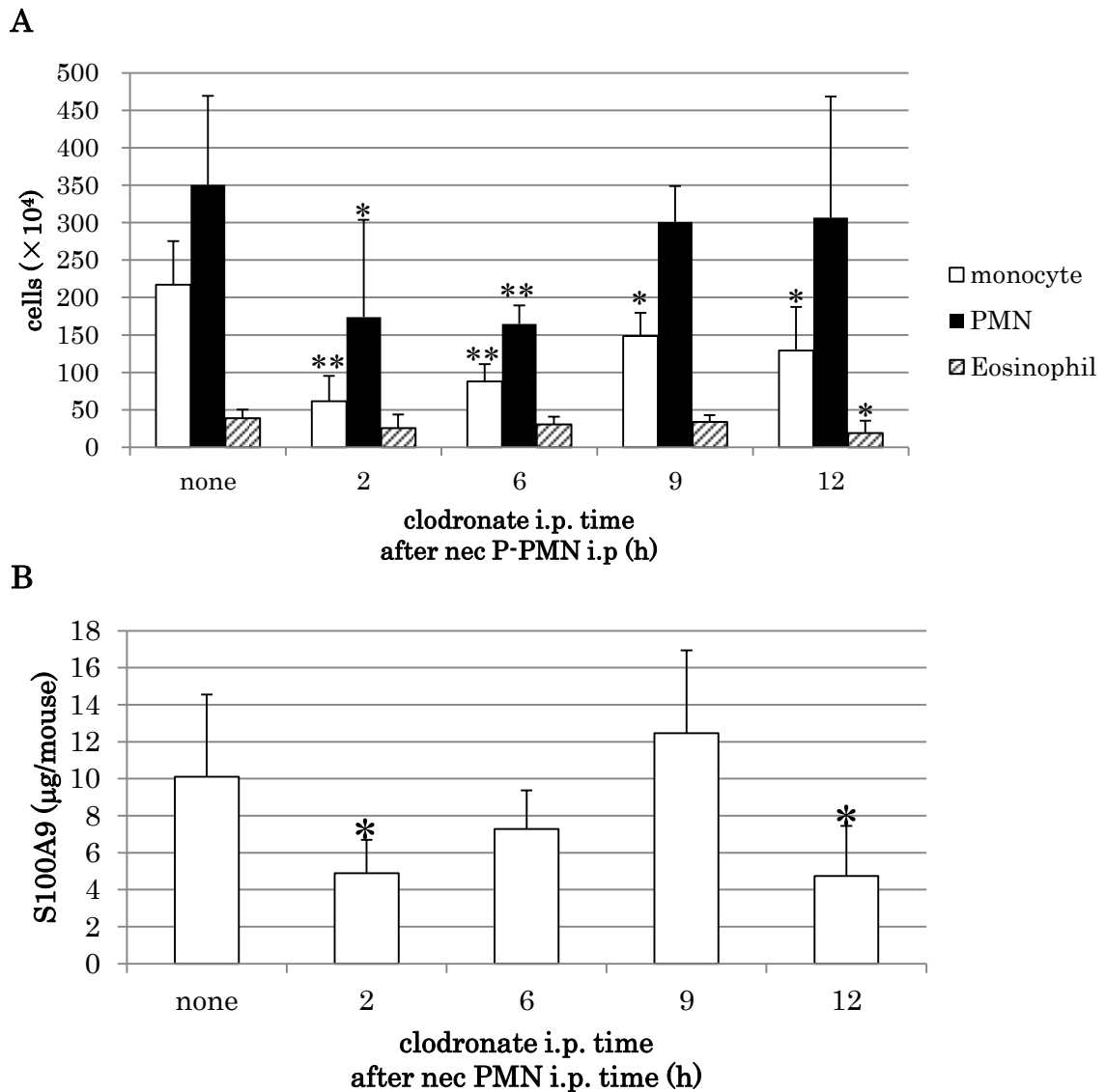


Figure 10. nec P-PMN とリポソーム封入クロドロネートの腹腔内投与

nec P-PMN を腹腔内投与し、2、6、9、12 h 後にリポソーム封入クロドロネートの腹腔内投与を行った。nec P-PMN 投与 16 h 後に腹腔滲出液を回収し、腹腔浸潤細胞をフローサイトメーターにて解析した (A)。また、腹腔内洗浄液中の S100A9 量を ELISA にて検出した (B)。

n=4-6 (mean \pm S.D.) * p <0.05, ** p <0.01 versus none

Figures
(in vitro II)

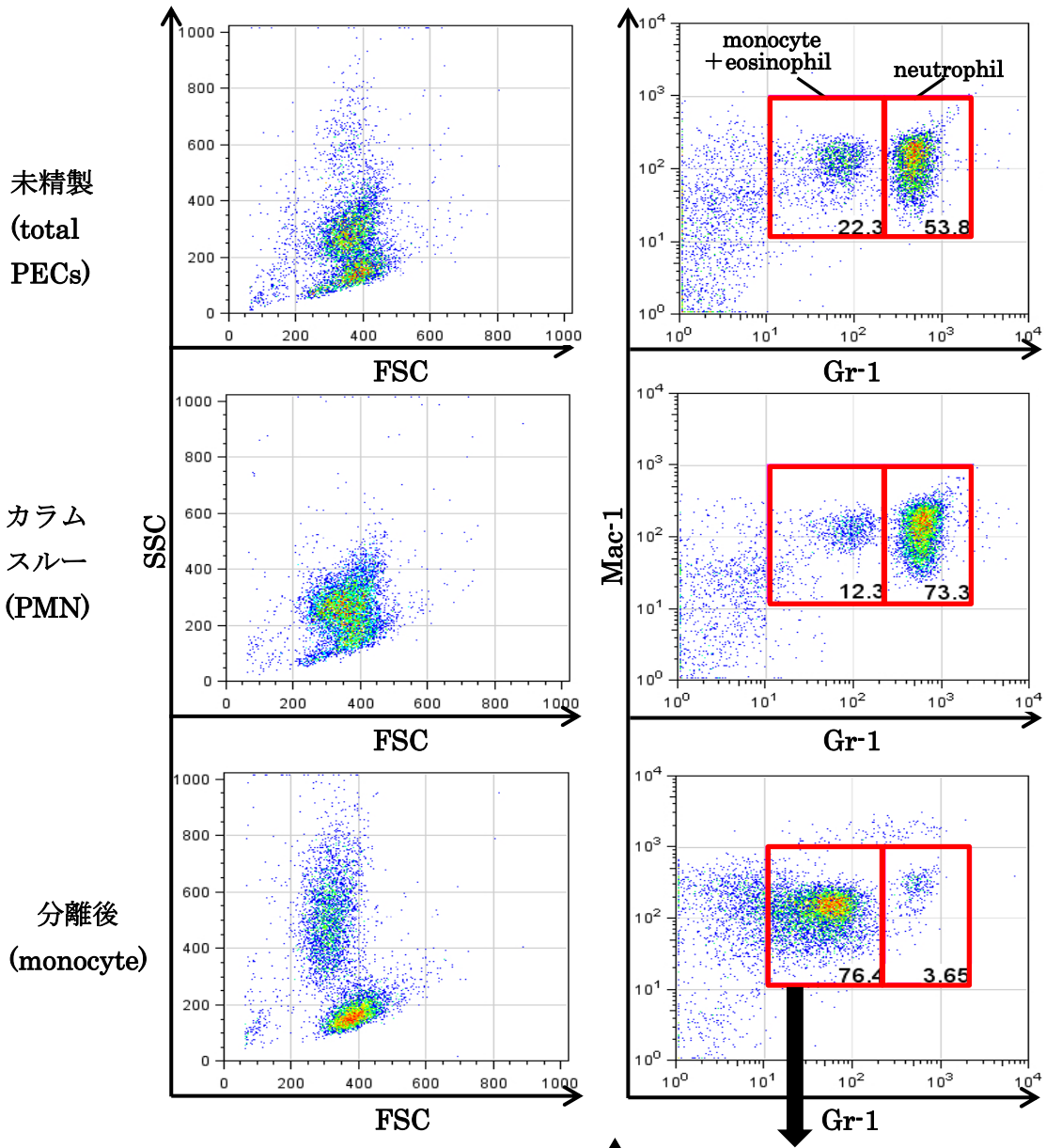
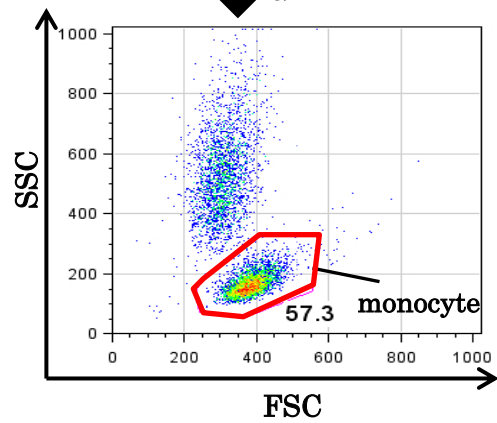


Figure 11-A. 細胞磁気分離法による腹腔浸潤細胞からの単球・好中球分離のフローサイトメーターによる解析

nec P-PMN を腹腔内投与し、6 h 後に冷 PBS で腹腔浸潤細胞を回収した。anti F4/80 を用いた細胞磁気分離法により単球と好中球を単離し、フローサイトメーターにて確認した。



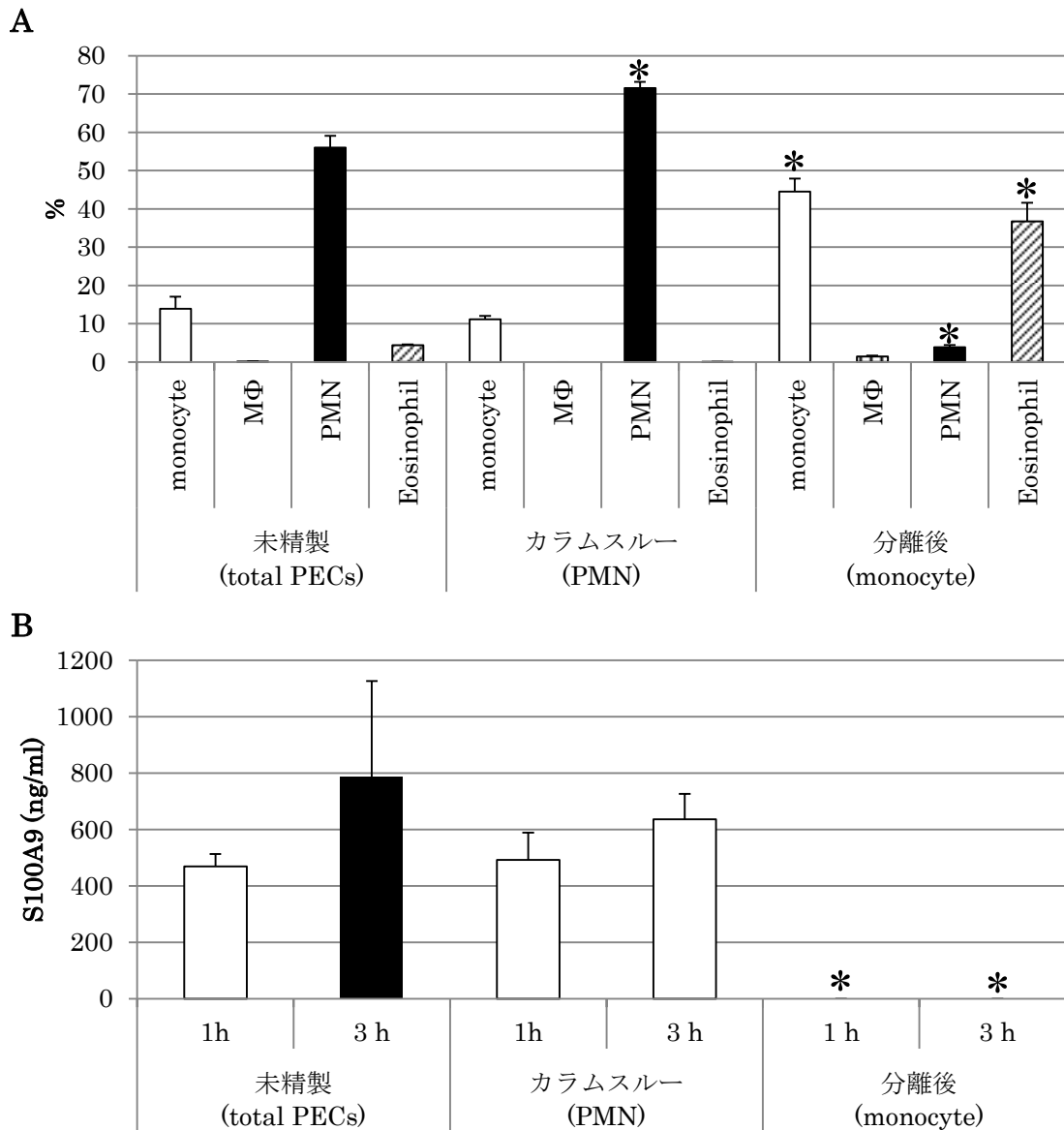


Figure 11-B. 細胞磁気分離法により腹腔浸潤細胞から分離した単球・好中球からの S100A9 産生

nec P-PMN を腹腔内投与し、6 h 後に冷 PBS で腹腔浸潤細胞を回収した。anti F4/80 Ab を用いた細胞磁気分離法により単球と好中球を単離し、フローサイトメーターにて解析した (A)。また、未精製・単離単球・単離好中球をそれぞれ培養し、1、3 h 後に上清中の S100A9 を ELISA にて検出した。

n=3 (mean±S.D.) *p<0.01 versus total PECs

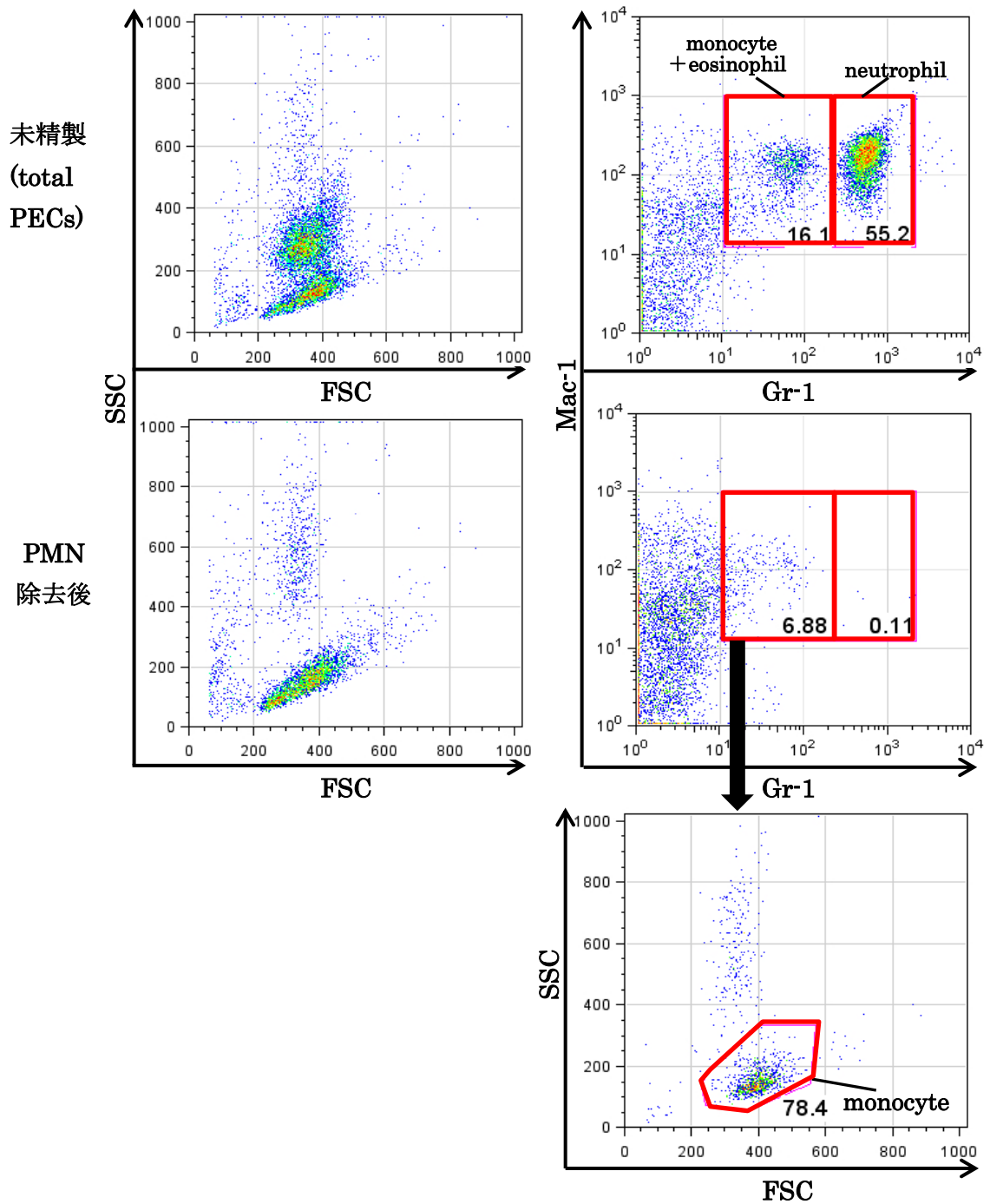


Figure 12-A. 細胞磁気分離法による腹腔浸潤細胞からの好中球除去のフローサイトメーターによる解析

nec P-PMN を腹腔内投与し、6 h 後に冷 PBS で腹腔浸潤細胞を回収した。anti Gr-1 Ab を用いた細胞磁気分離法により好中球を除去し、フローサイトメーターにて確認した。

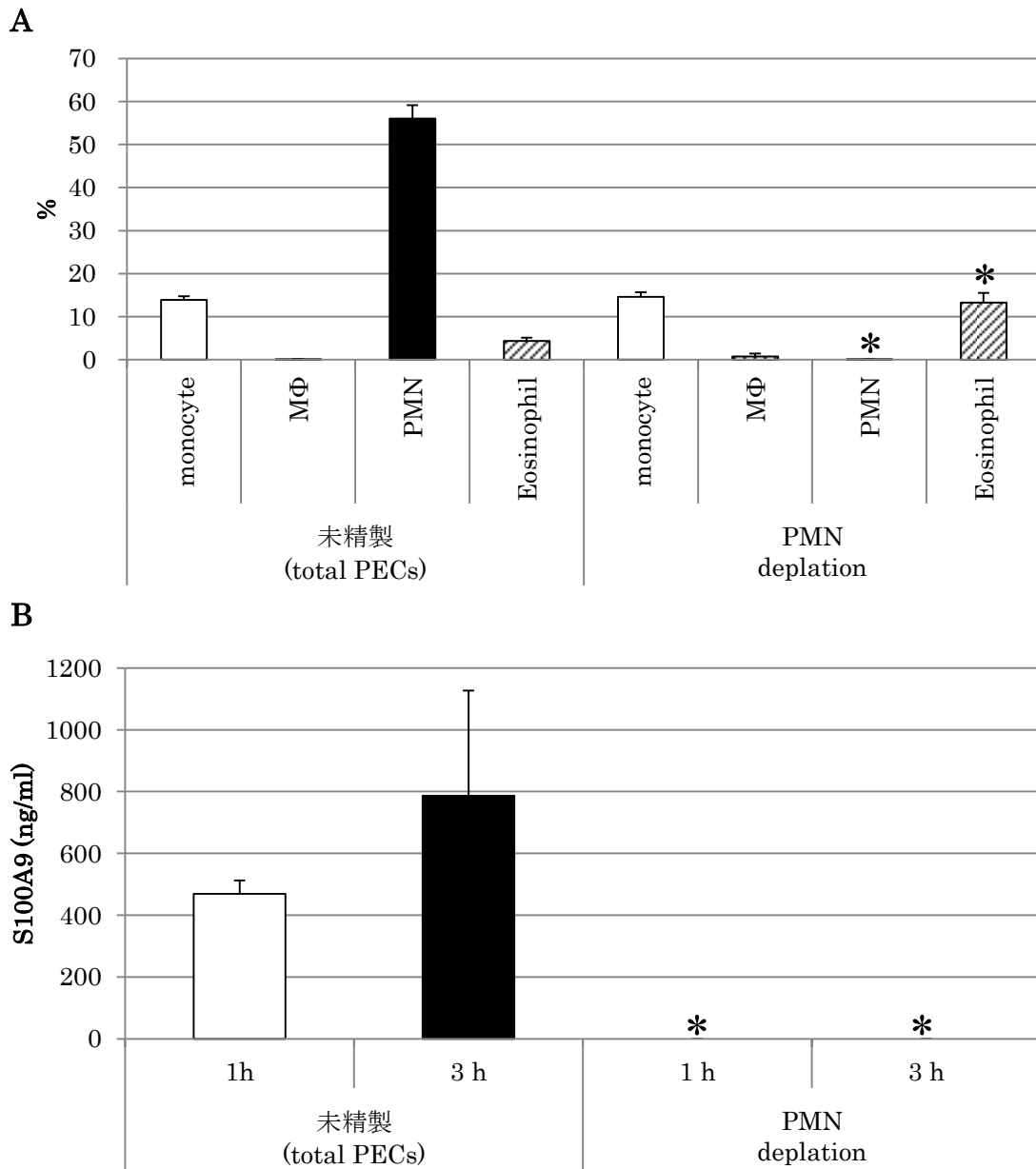


Figure 12-B. 細胞磁気分離法により好中球を除去した腹腔浸潤細胞からの S100A9 産生

nec P-PMN を腹腔内投与し、6 h 後に冷 PBS で腹腔浸潤細胞を回収した。anti Gr-1 Ab を用いた細胞磁気分離法により好中球を除去し、フローサイトメーターにて解析した (A)。また、未精製・好中球を除去した浸潤細胞をそれぞれ培養し、1、3 h 後に上清中の S100A9 を ELISA にて検出した。

n=3 (mean ± S.D.) *p<0.01 versus total PECs

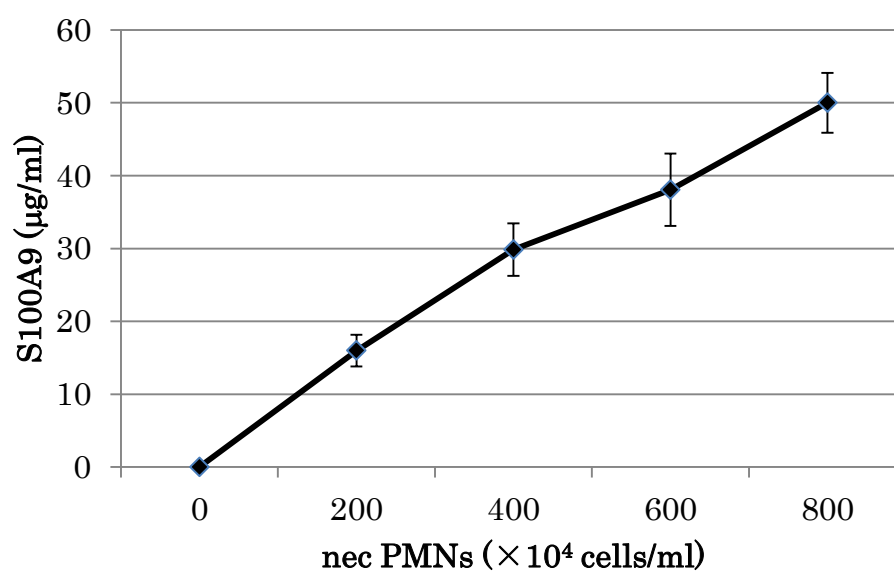


Figure 13. nec PMNs と S100A9 量との相関関係

チオグリコレート培地を腹腔内投与し 6 h 後に冷 PBS にて腹腔浸潤細胞を回収した。Percoll により好中球の精製を行い、細胞数を調整した後、結融解によりネクロシスへと誘導した。ネクロシス溶液に含まれる S100A9 を ELISA にて検出した。精製後の好中球の割合は $76.2 \pm 8.3 \%$ 。

n=3 (mean \pm S.D.)

References

- 1) How dying cells alert the immune system to danger, *Nat Rev Immunol*.
Kono H, Rock KL.
2008 Apr;8(4):279-89. Epub 2008 Mar 14. Review.
- 2) Toll-like Receptor.
Takagi M.
J Clin Exp Hematop. 2011;51(2):77-92.
- 3) Mechanisms of disease: a 'DAMP' view of inflammatory arthritis.
Foell D, Wittkowski H, Roth J.
Nat Clin Pract Rheumatol. 2007 Jul;3(7):382-90. Review.
- 4) Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock.
Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, van Zoelen MA, Nacken W, Foell D, van der Poll T, Sorg C, Roth J.
Nat Med. 2007 Sep;13(9):1042-9. Epub 2007 Sep 2.
- 5) Characteristics of patients dying from acute viral hepatitis in Serbia.
Svrtlih N, Delic D, Simonovic J, Dokic L, Gvozdenovic E, Dulovic O, Nestic Z, Boricic I.
Turk J Gastroenterol. 2011;22(2):152-7.
- 6) S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules.
Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J.
J Leukoc Biol. 2007 Jan;81(1):28-37. Epub 2006 Aug 30. Review.
- 7) Myeloid cell function in MRP-14 (S100A9) null mice.
Hobbs JA, May R, Tanousis K, McNeill E, Mathies M, Gebhardt C, Henderson R, Robinson MJ, Hogg N.
Mol Cell Biol. 2003 Apr;23(7):2564-76.

- 8) The calcium binding protein S100A9 is essential for pancreatic leukocyte infiltration and induces disruption of cell-cell contacts.
Schnekenburger J, Schick V, Krüger B, Manitz MP, Sorg C, Nacken W, Kerkhoff C, Kahlert A, Mayerle J, Domschke W, Lerch MM.
J Cell Physiol. 2008 Aug;216(2):558-67.
- 9) Expression and role of myeloid-related protein-14 in clinical and experimental sepsis.
van Zoelen MA, Vogl T, Foell D, Van Veen SQ, van Till JW, Florquin S, Tanck MW, Wittebole X, Laterre PF, Boermeester MA, Roth J, van der Poll T.
Am J Respir Crit Care Med. 2009 Dec 1;180(11):1098-106. Epub 2009 Sep 17.
- 10) Phagocyte-specific calcium-binding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammation.
Foell D, Frosch M, Sorg C, Roth J.
Clin Chim Acta. 2004 Jun;344(1-2):37-51. Review.
- 11) Macrophage suppression following phagocytosis of apoptotic neutrophils is mediated by the S100A9 calcium-binding protein.
De Lorenzo BH, Godoy LC, Novaes e Brito RR, Pagano RL, Amorim-Dias MA, Grosso DM, Lopes JD, Mariano M.
Immunobiology. 2010 May;215(5):341-7. Epub 2009 Aug 4.
- 12) [Possible mechanism for regulation of inflammatory responses with the S100A8/A9 protein].
Namura T, Arai S, Koike A, Yamada S, Totani M, Ikemoto M.
Rinsho Byori. 2010 Jul;58(7):651-7. Japanese.
- 13) S-glutathionylation regulates inflammatory activities of S100A9.
Lim SY, Raftery MJ, Goyette J, Geczy CL.
J Biol Chem. 2010 May 7;285(19):14377-88. Epub 2010 Mar 11.

- 14) Oxidative modifications of DAMPs suppress inflammation: the case for S100A8 and S100A9.
Lim SY, Raftery MJ, Geczy CL.
Antioxid Redox Signal. 2011 Oct 15;15(8):2235-48. Epub 2011 Apr 11.
- 15) ANTI-INFECTIVE PROTECTIVE PROPERTIES OF S100 CALGRANULINS.
Hsu K, Champaiboon C, Guenther BD, Sorenson BS, Khammanivong A, Ross KF, Geczy CL, Herzberg MC.
Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem. 2009 Dec 4;8(4):290-305.
- 16) Ly6c+ "inflammatory monocytes" are microglial precursors recruited in a pathogenic manner in West Nile virus encephalitis.
Getts DR, Terry RL, Getts MT, Müller M, Rana S, Shrestha B, Radford J, Van Rooijen N, Campbell IL, King NJ.
J Exp Med. 2008 Sep 29;205(10):2319-37. Epub 2008 Sep 8.
- 17) Resident peritoneal leukocytes are important sources of MMP-9 during zymosan peritonitis: superior contribution of macrophages over mast cells.
Kolaczowska E, Lelito M, Kozakiewicz E, van Rooijen N, Plytycz B, Arnold B.
Immunol Lett. 2007 Nov 15;113(2):99-106. Epub 2007 Aug 24.
- 18) Cutting edge: critical role for mesothelial cells in necrosis-induced inflammation through the recognition of IL-1 alpha released from dying cells.
Eigenbrod T, Park JH, Harder J, Iwakura Y, Núñez G.
J Immunol. 2008 Dec 15;181(12):8194-8.
- 19) Macrophages and mesothelial cells in bacterial peritonitis.
Topley N, Mackenzie RK, Williams JD.
Immunobiology. 1996 Oct;195(4-5):563-73.

- 20) Mechanism of extracellular release of human neutrophil calprotectin complex.
Voganatsi A, Panyutich A, Miyasaki KT, Murthy RK.
J Leukoc Biol. 2001 Jul;70(1):130-4.
- 21) Role of neutrophil apoptosis in the resolution of inflammation.
El Kebir D, Filep JG.
ScientificWorldJournal. 2010 Sep 1;10:1731-48. Review.
- 22) Annexin A1 released from apoptotic cells acts through formyl peptide receptors to dampen inflammatory monocyte activation via JAK/STAT/SOCS signalling.
Pupjalis D, Goetsch J, Kottas DJ, Gerke V, Rescher U.
EMBO Mol Med. 2011 Feb;3(2):102-14. doi: 10.1002/emmm.201000113.
Epub 2011 Jan 20.

Acknowledgement

本研究を行うにあたり、終始御教示、御鞭撻賜りました小林芳郎教授と永田喜三郎准教授に深く感謝し、御礼申し上げます。そして、常に細やかなご指導とお力添えを頂きました佐々木宗一郎先輩、岩佐卓哉先輩に厚くお礼申し上げます。最後に、色々と支えてくださるとともに、充実した日々を共にした研究室の皆さん、本当に有難う御座いました。