

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DAMPs:S100A9 proteinの役割
別タイトル	The role of S100A9 protein in the late stage of inflammatory response induced by necrotic neutrophils.
作成者(著者)	與座, 法子
公開者	東邦大学
発行日	2013.3
掲載情報	東邦大学理学修士論文(生物分子科学専攻)平成24年度. 57. p.1 51.
資料種別	学位論文
内容記述	学位所得年月: 2013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/TD98711500

平成 24 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
DAMPs : S100 A9 protein の役割

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

6311015 與座 法子

Contents

I	Introduction	2
II	Materials and Methods	4
III	Results and Discussion	27
IV	Figures	33
V	References	47
VI	Acknowledgement	51

I 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がある。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、自己に対する免疫を持ってしまった 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細胞死である。また、ネクローシスとは火傷、毒物など物理的・化学的な外的環境因子による受動的に起こる細胞死である。

生体内で生じたアポトーシス細胞は、マクロファージなどの貪食細胞に速やかに貪食・除去され、その際、炎症は伴わない。一方、生体内で多量のアポトーシス細胞が生じると、貪食細胞により除去しきれなかった残存したアポトーシス細胞は二次的ネクローシスに陥る。細胞がネクローシスを起こすと、細胞小器官を構成する膜の崩壊を引き起こし、細胞傷害性の細胞内容物が漏出し、その結果、組織内で激しい炎症を引き起こされる。炎症部位では多量の白血球浸潤が認められる。特に急性炎症では多量の好中球が炎症部位へ浸潤し、続いて、単球が浸潤してくる。この単球は速やかにマクロファージへと分化し、炎症の終息に関与している⁹⁾。これらの白血球の浸潤には、サイトカインの一種であるケモカインが深く関与していることが知られている。初期の炎症応答において重要なケモカインには、好中球浸潤に重要な役割を担っていると考えられている CXC ケモカインの一種である Macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) と Keratinocyte-derived chemokine (KC) がある¹⁾。

また、ネクローシス細胞から放出される細胞傷害性の細胞内容物には、**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含まれている。これらは総称して DAMPs(damage-associated-molecular-patterns) と呼ばれている¹¹⁾。DAMPs のひとつに S100A9 protein がある¹²⁾。S100A9 protein はミエロイド系細胞に存在するカルシウム結合性タンパク質であり、特に好中球においては細胞質タンパク質の 30-40% を占めている³⁾⁹⁾。また、S100 protein の多くはホモ二量体として存在しているが、いくつかの S100 protein はヘテロ二量体として存在する。多くの S100A9 protein は S100A8 protein と結合することで安定性を維持できるヘテロ二量体として存在していることが

知られている¹³⁾。炎症下において **S100A9 protein** は好中球のケモタクシスや血管内皮細胞への接着を引き起こし、好中球の遊走に関与すると報告されている⁵⁾。また **S100A9 protein** は、細胞がネクロシスしたときの他に、生きた好中球や単球によっても放出されている¹³⁾。臨床では、関節炎、慢性肺炎、敗血症、アルツハイマーなど、急性あるいは慢性炎症疾患の炎症巣において **S100A9 protein** が高濃度に検出されていることから、これらの疾患の病態形成への関与が示唆されている⁹⁾¹¹⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。

しかしながら、近年では **S100A9 protein** は抗炎症性物質として働くという報告もあるが、その機能は未だ十分に解明されていない⁴⁾。抗炎症性物質の例として、ラットでは関節炎モデルや **LPS** 誘発した肝障害において抗炎症性タンパク質として働くと報告されている¹⁴⁾¹⁶⁾¹⁹⁾。

以前に本研究では、ネクロシス細胞投与の際に誘導されるマウス腹腔内炎症モデルを用いて **S100A9 protein** について検討してきた。その結果、炎症初期は **MIP-2** および **KC** の産生に伴って好中球の浸潤がみられ、炎症後期に **S100A9 protein** の産生が検出された。このことから **S100A9 protein** は、炎症初期の好中球浸潤などに関係するのではなく、むしろ抗炎症性物質として作用する可能性が示唆された。

そこで、本研究では抗 **S100A9** 抗体を用いて炎症に対する **S100A9 protein** の役割を解明することを目的とした。

II Materials and Methods

《抗 S100A9 抗体の作製》

①抗原の取得

◇試薬

- ・形質転換 S100A9 大腸菌

本研究室の小松修弥氏によって作製された、プラスミド DNA (pET-28a-c(+)-S100A9) を導入した E.coli。

- ・ LB broth base

[Invitrogen]

- ・ glucose

[ナカライテスク株式会社]

- ・ 30 mg/ml chloramphenicol

chloramphenicol 150 mg を 100% EtOH に溶解して 5 ml とし、1 ml ずつ分注して -30°C で保存した。

[Wako]

- ・ 100 mg/ml kanamycin

Kanamycin sulfate [ナカライテスク株式会社] 500 mg を milli-Q に溶解して 5 ml とした後、孔径 0.20 μm のフィルター [Sartorius] に通して無菌化し、1 ml ずつ分注して -30°C で保存した。

- ・ LB/Cp+Kan broth

LB broth base 2 g と glucose 0.1 g を脱イオン水に溶解して 100 ml にした後、30 mg/ml chloramphenicol を終濃度 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように加えてオートクレーブにかけた。その後、温度が室温に下がったら 100 mg/ml kanamycin を終濃度 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように加えよく攪拌し、4°C で保存した。

- ・ 0.5 mM IPTG

isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) 1.19 g を milli-Q に溶解して 10 ml とした後、孔径 0.20 μm のフィルターに通して無菌化し、1 ml ずつ分注して -30°C で保存した。

[ナカライテスク株式会社]

【抗原の大量発現】

-80℃ で保存してある形質転換大腸菌を爪楊枝ですくい取り、LB/Cp+Kan broth 10 ml に移して、37℃ で 16 h 振盪培養した。この大腸菌クローン培養液を LB/Cp+Kan broth 10 ml に移した。これを 37℃ で大腸菌増殖期に当たる OD₆₀₀ = 0.8 まで振盪培養した (約 4 h)。培養液に 0.5 mM IPTG を終濃度 1 mM になるように添加し、9-12 h 振盪培養を行った。培養液を遠心 (3000 rpm, 20 min, 4℃) して上清を除去し、-30℃ で保存した。サンプルは SDS-PAGE を行い、発現の誘導を確認した。

②rS100A9 の回収と確認

◇試薬

・ 10 mM イミダゾール溶液

各試薬の終濃度が imidazole [Wako] 10 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM になるように milli-Q に溶解し、NaOH を milli-Q で溶解した溶液で pH 8.0 になるように調製した。

各[ナカライテスク株式会社]

・ 0.5 M EDTA

di-Sodium dihydrogenethylene diaminetetraacetate dehydrate (EDTA-2Na) 18.61 g を milli-Q に溶解し、milli-Q に溶解した NaOH で pH 8.0 に調製して、100 ml にした。120℃, 20 min オートクレーブにかけて室温で保存した。

各 [ナカライテスク株式会社]

・ 1 M DTT

dithiothreitol (DTT) を 1 M になるように milli-Q で溶解し、1 ml ずつ分注したものを -30℃ で保存した。

[ナカライテスク株式会社]

・ protease inhibitor mix

aprotinin [ナカライテスク株式会社], leupeptin [SIGMA-ALDRICH], α-anti trypsin [SIGMA-ALDRICH] をそれぞれ 100 μg/ml, soybean trypsin inhibitor [SIGMA-ALDRICH] を 1 mg/ml で milli-Q に溶解したものを -30℃ で保存した。

- lysis buffer

10 mM イミダゾール溶液 10 ml に 0.5 M EDTA を終濃度 2 mM に、1 M DTT を終濃度 0.1 mM になるように加え、protease inhibitor mix を 100 μ l, pepstatin A [ペプチド研] 10 μ l 加えた。使用直前に調製し、氷上で保存した。

- 10% TritonX-100

TritonX-100 を 10% になるように milli-Q で希釈した。

[ナカライテスク株式会社]

【rS100A9 の回収と可溶性の確認】

大量培養を行い、 -30°C で保存した形質転換大腸菌の沈殿を lysis buffer 10 ml に懸濁し、凍結融解を 2 回行った。その後、ULTRASONIC DISRUPTOR (UD-200) [TOMY] を用いて sonication を 30 sec 行い、on ice で静置 1 min 行うという作業を 10 回繰り返す、超音波破碎を行った。そこに 10% TritonX-100 を 0.75% になるように加えてゆっくりと転倒混和し、遠心 (12000 rpm, 10 min, 4°C) した。上清を回収して可溶性画分とし、沈殿を 10 mM イミダゾール溶液 10 ml に懸濁して不溶性画分とした。それぞれの画分で SDS-PAGE を行って、可溶性を確認した。

③SDS-PAGE

◇試薬

- 30% acrylamide

Acrylamidemonomer 58.4 g と N,N'-methylene bisacrylamide 1.6 g を milli-Q に溶解して 200 ml とし、 4°C で保存した。

[ナカライテスク株式会社]

- 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)
- 1.0 M Tris-HCl (pH 6.8)

Trizma-base [SIGMA-ALDRICH] を milli-Q に目的の濃度になるように溶解し、HCl [ナカライテスク株式会社] で pH を調製し、室温で保存した。

- 10% SDS

[ナカライテスク株式会社]

- 10% APS

ammonium peroxodisulfate 0.5 g を milli-Q 5 ml に溶解し -30°C で保存した。

[ナカライテスク株式会社]

- N,N,N',N',-tetramethylethylenediamide (TEMED)

[ナカライテスク株式会社]

- 3×sample buffer

1.0 M Tris-HCl (pH 6.8) 15 ml, 2-mercaptoethanol 6 ml, sucrose 6 g, sodium lauryl sulfate (SDS) 2.4 g を milli-Q に溶解して 40 ml にしたものを室温で保存した。

各[ナカライテスク株式会社]

- SDS-PAGE 分子量スタンダード (LOW)

[BIO-RAD]

- 10 × running buffer

Trizma-base 90.9 g, glycine 432 g, SDS 30 g を milli-Q に溶解して 3.0 L にし、室温で保存した。

[ナカライテスク株式会社]

- 4 × dye solution (for SDS-PAGE)

bromophenolblue 1.4 mg, sucrose 0.28 g を milli-Q に溶解して 14 ml にしたものを室温で保存した。

[Wako]

- staining solution

coomassie brilliant blue (CBB) R-250 1 g を destaining solution 500 ml に溶解し、室温で保存した。

[ナカライテスク株式会社]

- destaining solution

Methanol 600 ml と酢酸 300 ml を脱イオン水で 3.0 L にして、室温で保存した。

[ナカライテスク株式会社]

【ゲルの作製】

15% lower gel の作製 : 30% acrylamide 溶液 2.5 ml, 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) 1.25 ml, 10% SDS 50 μ l, 10% APS 31.3 μ l, milli-Q 1.6 ml を転倒混和して、そこに TEMED 3.1 μ l を加えてさらに 10 回程度転倒混和した。この混合液をあらかじめ組み立てておいたゲル板に流し入れ、milli-Q を 500 μ l 重層して、1 h 静置・重合させた。

5% upper gel の作製 : 30% acrylamide 溶液 0.402 ml, 1.0 M Tris-HCl (pH 6.8) 0.3 ml, 10% SDS 24 μ l, 10% APS 30 μ l, milli-Q 1.644 ml を転倒混和して、そこに TEMED 3 μ l を加えてさらに 10 回程度転倒混和した。この混合液をあらかじめゲル板に重層した milli-Q を濾紙で除去しておき、ただちに 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。

【サンプル・マーカの調整】

サンプル 5 μ l を 4 x dye solution 3 μ l, 3 x sample buffer 4 μ l と混合し、泳動サンプルとした。SDS-PAGE 分子量スタンダード (LOW) 9 μ l, 4 x dye solution 3 μ l を混合し、マーカとした。泳動サンプルとマーカはその後 5 min 煮沸し、遠心 (12000 rpm, 10 min, r.t.) した。

【電気泳動】

10 x running buffer を脱イオン水で 1 x になるように希釈し、泳動槽 (下層) に適量入れた。ゲル板はコーム類を外し、ゲルの破片が残らないように milli-Q で洗浄し、濾紙で milli-Q を除去した後、ゲルの下端に気泡が入らないように泳動槽に沈めて固定し、1 x running buffer を泳動槽 (上層) にゲルのウェルが浸かる程度に加えた。ウェルから残った気泡を除去し、そこに泳動サンプル及びマーカを 10 μ l アプライした。準備が完了したら、20 mA/gel で 1.5 h 電気泳動した。

【染色・脱染】

泳動後、泳動槽からゲル板を外し、upper gel を切り離した。lower gel を staining solution に浸し、15 min 振盪して染色した。その後、lower gel を destaining solution に浸して 3 h 程振盪した。

④rS100A9 の精製

◇試薬

- ・ 10 mM イミダゾール溶液
- ・ wash buffer

各試薬の終濃度が imidazole 20 mM, NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM にな

るように milli-Q に溶解し、NaOH を milli-Q で溶解した溶液で pH 8.0 になるように調製した。

- elution buffer

各試薬の終濃度が imidazole 250 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM になるように milli-Q に溶解し、NaOH を milli-Q で溶解した溶液で pH 8.0 になるように調製した。

- Ni-NTA agarose

[QIAGEN]

- PBS

【rS100A9 の精製】

Poly-Prep Chromatography Columns [BIO-RAD] に Ni-NTA agarose 2 ml 加え、保存液を漏出しきった後、10 mM イミダゾール溶液を 2-3 回流して平衡化した。そこに rS100A9 は含まれている可溶性画分を加え、カラムに栓をして 4°C で一晩ローテートした。その後、カラムから液体分を漏出させ、液体分は、カラムに付着した rS100A9 が漏出していないことを確認するため、SDS-PAGE した。wash buffer で Ni-NTA agarose を 3 回洗浄し、elution buffer 500 µl ずつ入れてそれぞれ ①-⑦ のチューブに分けて溶出させた。それぞれの溶出液を elution buffer で 8 倍に希釈して吸光度 (OD₂₈₀) で測定し、収量の高いものをまとめて混ぜた。これを最終的なサンプルとして SDS-PAGE を行い、目的のタンパク質が含まれていることを確認した。このサンプルを 4°C で二晩 PBS で透析した。収量の定量後、サンプルの一部を用いて SDS-PAGE によって精製状態を確認した。精製サンプルは孔径 0.22 µm のフィルター [MILLIPORE] に通して無菌化し、タンパク質量が 500 µg となるように分注して -80°C で凍結保存した。このとき 500 µl に満たない場合は PBS で 500 µl になるようにした。

⑤収量の定量

◇試薬

- ・ Coomassie Plus-The Better Bradford Assay Kit [PIERCE]
- ・ Albumin Standard (BSA) [PIERCE]
- ・ 96 well plate [TPP]

【収量の定量】

1.5 ml チューブに 2 mg/ml BSA を milli-Q で順次希釈していき standard sample を作成した。また精製サンプルも milli-Q で希釈し、これらを 96 well plate に蒔いた。standard sample と精製サンプルの入ったウェルに Coomassie 300 μ l を添加し、30 sec 振盪した。その後、10 min 遮光しながら室温で反応させて Microplate Reader Model 680 [BIO-RAD] で吸光度 (OD₅₉₅) を測定した。standard sample をもとに検量線を作成し、精製サンプルのタンパク質濃度を算出した。

⑥ウサギに免疫

◇実験動物

- ・ウサギ (JW/CSK) [三協ラボサービス]

◇試薬・器具

- ・ ADJUVANT COMPLETE FREUND (FCA) [DIFCO]
- ・ ADJUVANT INCOMPLETE FREUND (FIA) [DIFCO]
- ・ ロック先ガラス注射筒 [アズワン株式会社]
- ・ 金属製接続管
- ・ 24 G 注射針 [テルモ株式会社]

【ウサギに免疫】

ウサギを免疫の 2 ヶ月ほど前から飼育し、体重を 3.2 kg 程度に増やしておいた。凍結保存した抗原 (500 μ l) とその 1.5 倍容量の FCA をロック先ガラ

ス注射筒 2 本にそれぞれ取り、注射筒を金属製接続管で接続して抗原と FCA を混合してエマルジョンを作製した。これをウサギの皮下に 50-100 $\mu\text{l}/\text{site}$ で注射して一次免疫を行った。この 4 週間後に、抗原 (500 μl 相当) と、その 1.5 倍量の FIA を用いてエマルジョンを作製し、同様にウサギの皮下に注射して二次免疫を行った。二次免疫は 2 週間おきに、抗体価が上昇しきるまで続けた。

⑦抗体価の測定

◇試薬・器具

- 21 G 翼付き静注針 [テルモ株式会社]
- EIA/RIA plate (高吸着 96 well plate) [Costar]
- Albumin Standard (BSA) [PIERCE]
- PBS (ELISA 用)
PBS を孔径 0.22 μm のフィルターにかけた。
- 0.05 M carbonate buffer (pH 9.6)
NaHCO₃ [ナカライテスク株式会社] 0.3 g, Na₂CO₃ [Wako] 0.15 g を milli-Q に溶解し、別に調製した 0.05 M NaHCO₃ を用いて pH 9.6 に調製し、全量を 100 ml にした。これを孔径 0.2 μm のフィルター [ADVANTEC] に通して、4°C で保存した。
- wash buffer : 0.05% Tween-PBS (T-PBS)
PBS (ELISA 用) に終濃度 0.05% になるように polyoxyethylenesorbitanmonolaurate (Tween-20) を溶解し、4°C で保存した。
- blocking buffer : 1% BSA-PBS
PBS (ELISA 用) に終濃度 1% になるように bovine serum albumin (BSA) [SIGMA-ALDRICH] を溶解し、孔径 0.2 μm のフィルターに通し、4°C で保存した。
- diluent : 0.1% BSA T-PBS
T-PBS に終濃度 0.1% になるように BSA を溶解し、孔径 0.2 μm のフィルターにかけ、4°C で保存した。
- 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Biotin Labeled Goat anti Rabbit IgG [STI]
- Streptavidin-HRP [R&Dsystems]

・ABTS Liquid Substrate Solution

[SIGMA-ALDRICH]

【抗血清の準備】

正常血清は一次免疫をする前に、ウサギの耳の裏外側をよく消毒した後、5 ml シリンジと 21 G 翼付き静注針を用いて耳静脈から 5 ml 程採血した。抗血清は一次免疫後の 2 週間後と二次免疫の 1 週間後に、同様に 5 ml 程採血した。回収した血液は 37°C で 1 h インキュベートした後、4°C で一晩静置した。翌日、遠心 (3000 rpm, 20 min, 4°C) した後上清を回収し、100 µl ずつ分注して -30°C で凍結保存した。

【抗体価の測定】

96 well plate に 0.05 M carbonate buffer (pH 9.6) で 100 ng/ml に希釈した抗原溶液をそれぞれ 25 µl/well で蒔き、一晩 4°C で静置してウェル底面に抗原を張り付けた。翌日、wash buffer を用いて各ウェルを 4 回洗浄し、blocking buffer を 150 µl/well で加え、1 h 室温で静置してブロッキングを行った。正常血清及び抗血清は原液から、diluent で 1/32768 まで希釈系列を作製し、4°C で保存した。ブロッキングの後に 4 回洗浄して 96 well plate に、作製した血清希釈系列をそれぞれ 50 µl/well 入れて、2 h 室温で静置して反応させた。2 h 後、各ウェルを 4 回洗浄し、diluent で 1/1000 に希釈した 0.5 µg/ml biotin labeled goat anti rabbit IgG を 50 µl/well で加えて 2 h 室温で静置して反応させた。その後同様に 4 回洗浄し、diluent で 50 µl/ml に希釈した streptavidin-HRP を 50 µl/well で加えて 30 min 室温で静置して反応させた。同様に 4 回洗浄した後、ABTS liquid substrate solution を 50 µl/well で入れ、遮光しながら 5-40 min 室温で反応させ、Microplate Reader Model 680 [BIO-RAD] で吸光度 (OD₄₀₅₋₆₅₀) を測定し、解析した。

⑧全採血

◇試薬・器具

・Nembutal

[大日本製薬]

・1 ml シリンジ

[テルモ株式会社]

・30 ml シリンジ

[テルモ株式会社]

- 24 G 針
- 21 G 翼付き静注針
- diethyl ether

[ナカライテスク株式会社]

【全採血】

全採血は最後の免疫（ブースト）から 1 週間後に行った。まず、Nembutal 1 ml を 24 G 注射針を取り付けた 1 ml シリンジに分取してウサギの耳の裏側外をよく消毒した後、耳静脈に注射した。ウサギに麻酔が効いてきた時点で、ウサギを固定台に固定して麻酔から覚めないようにするために時折 diethyl ether を嗅がせながら開胸した。30 ml シリンジと 18 G 翼付き静脈針を用いて心臓から直接採血を行った。また、胸腔内に流れ出た血液も 30 ml シリンジで採取した。この時、心臓から直接採取した血液とは区別した。

⑨抗体の精製

◇試薬

- 60 mM sodium acetate buffer (pH 4.0)

sodium acetate trihydrate を 60 mM になるように milli-Q に溶解し、pH を HCl で調製して、4°C で保存した。

[ナカライテスク株式会社]

- octanoic acid (n-カプリル酸)

[ナカライテスク株式会社]

- ammonium sulfate

[ナカライテスク株式会社]

- PBS

【血清の回収】

採取した血液は 37°C で 1 h インキュベートして 4°C で一晩静置した。翌日遠心 (3000 rpm, 20 min, 4°C) して上清 (血清) を回収した。この時、血清量を量った。胸腔内に流れ出た血液から回収した血清は脂肪分が多いため心臓から直接回収した血清とは混ぜずに、別々に精製を行うこととした。

【n-カプリル酸による抗体の上清回収】

得られた血清と等量の 60 mM sodium acetate buffer (pH 4.0) を加えた。次に血清の 0.04 倍容量以上の octanoic acid (n-カプリル酸) を室温で 30 min 攪拌しながら少しずつ滴下し加えた。その後、遠心 (3000 rpm, 20 min, 4°C) して上清を回収した。この時上清にできた薄い膜は取り除いた。これをさらに遠心 (12000 rpm, 20 min, 4°C) して上清を回収した。上清が透明になるまで n-カプリル酸から遠心 (12000 rpm, 20 min, 4°C) までの作業を繰り返した。上清を回収後、PBS で 4°C 二晩透析を行った。透析後、遠心 (3000 rpm, 20 min, 4°C) して上清を回収した。

【硫酸沈殿】

Ammonium sulfate を上清 100 ml 当たり 31.4 g 加え、室温で 30 min ロータートした。その後、4°C で 1 h 静置し、遠心 (11000 rpm, 30 min, 4°C) して上清を除去した。ペレットを回収時の血清と等量の PBS で溶解し、PBS で 4°C 二晩透析をした。透析後、遠心 (3000 rpm, 20 min, 4°C) して上清を回収した。

【精製状態の確認】

n-カプリル酸による抗体の上清回収と硫酸沈殿を計 2 回行い、精製サンプルを得た。このサンプルを SDS-PAGE し、サンプルの精製状態を確認した。心臓から直接回収した血清と胸腔内に流れ出た血清から抗体が同程度精製されていることを確認して両者を混合することとした。また、吸光度 (OD₂₈₀) で測定および精製サンプルと BSA 0.5-2.0 mg/ml 希釈系列を同時に SDS-PAGE してバンドの太さをサンプルと比較することにより、精製サンプルの濃度を予想した。

⑩抗体の回収

◇試薬・器具

・GE Histrap Protein G HP [GE Healthcare]

・5 ml テルモシリンジ [テルモ株式会社]

・0.2 M NaH₂PO₄

・0.2 M Na₂HPO₃

・binding buffer : 20 mM phosphate buffer (pH 7.0)

0.2 M NaH₂PO₄ 44.4 ml, 0.2 M Na₂HPO₄ 55.6 ml を milli-Q で 1 L にし、pH 7.0 であることを確認した。4℃ で保存し、使用直前に室温に戻した。

・elution buffer : 0.1 M glycine-HCl (pH 2.7)

glycine 0.7507 g を milli-Q に溶解し、HCl で pH 9.0 に調整して 100 ml にした。4℃ で保存して使用直前に室温に戻した。

各[ナカライテスク株式会社]

・neutralizing buffer : 1 M Tris-HCl (pH 9.0)

Trizma base [Sigma] 12.11 g を milli-Q に溶解し、HCl で pH 2.7 に調整して 100 ml にした。4℃ で保存し、使用直前に室温に戻した。

・wash buffer : 0.1% Triton X-100

Triton X-100 30 µl に milli-Q 30 ml を加え、37℃ で一晩インキュベートして溶解した。溶解後は常温保存した。

・20 % EtOH

【アフィニティーカラムクロマトグラフィーによる抗体の精製】

精製サンプルを 4℃ で二晩 binding buffer で透析をして buffer の交換を行った。GE Histrap Protein G HP カラムの蓋を開けて上部にパーツを取り付け組み立て、5 ml シリンジをセットした。カラム内に空気が入らないように注意しながらシリンジに溶液類を入れた。まず、milli-Q 5 ml, binding buffer 10 ml の順に流して平衡化した。次に、精製したサンプルをカラムの先から出てくる液が 1 滴/2 sec よりも早くなならないように気を付けながら流して抗体を Protein G に結合させた。この時、サンプルの濃度は事前に 4 mg/ml 前後に調節した。出てくる液は回収して計 3-4 回カラムに通した。次に binding buffer を 10 ml 流して非付着性成分を洗浄した。最初にカラムから出てきた 1 ml には抗体が含まれている可能性があるため回収した。またこのとき、抗体がカラ

ム内にあるため抗体が流れないようにゆっくりと binding buffer を流した。次に elution buffer 5 ml を流して抗体の溶出を行った。この時の溶出液はあらかじめ neutralizing buffer 25 μ l を分注しておいたエッペンに 500 μ l ずつ回収し、それぞれボルテックスをかけて攪拌した。その後、回収したサンプルを吸光度 (OD_{280}) で測定し、濃度が濃いサンプルを選び 15 ml チューブで一つにまとめた。得られたサンプルは 4°C で二晩 PBS で透析した。透析後、遠心 (12000 rpm, 5 min, 4°C) して上清を回収し、吸光度 (OD_{280}) で測定してサンプルの濃度を予想した。カラムをかける前、カラムをかけた後のサンプルをそれぞれ SDS-PAGE して目的の抗体が得られたのか、またカラムをかけたことで不純物が取り除けたのかを確認した。また、抗体価の測定 (ELISA) も行った。精製したサンプルは孔径 0.22 μ m のフィルターに通して無菌化して -30°C で保存した。

《細胞とその調整》

◇実験動物

- ・ CDF1 (BALB/C ♀ x DBA/2 ♂) (H-2d) 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

- ・ TG 培地 (thioglycollate medium)

TG Medium 顆粒 29.3 g を精製水 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 1 ヶ月以上経過したものを使用した。

[日水製薬株式会社]

- ・ PBS (Phosphate Buffered Saline)

リン酸緩衝生理食塩水

0.5M Na₂HPO₄ · 12H₂O 28.0 ml

0.5M KH₂PO₄ 12.0 ml

NaCl 8.5 g

超純水 1 L

調製後、高圧蒸気滅菌したのち 4°C で保存した。

各[ナカライテスク株式会社]

- ・ Trypan blue

粉末の Trypan blue を PBS で 0.5% に調製し、濾過滅菌したものを使用した。

[和光純薬工業株式会社]

- ・ 生理食塩液

【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 後にマウス腹腔内滲出細胞を冷 PBS で回収した。冷 PBS で 2 回洗浄 (1000 rpm, 10 min, 4°C) し、次に冷生理食塩水で1回洗浄 (1000 rpm, 10 min, 4°C) 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、液体窒素で凍結し、37°C, 30 min 溶解する作業 (以下凍結融解とする) を 3 回行った。これを necrotic TG 誘導好中球 (以下 nec TG 誘導好中球とする) とした。

《細胞投与および腹腔滲出細胞の回収》

◇実験動物

- ・ CDF1 (BALB/C ♀ x DBA/2 ♂) (H-2d) 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

【ネクロシス細胞の腹腔内投与および腹腔滲出細胞の回収】

-80°C で凍結保存しておいたネクロシス細胞を 37°C, 30 min で解凍し、針をつけたシリンジで出し入れをして軽く攪拌させて白い浮遊物を細かくした。その後、そのネクロシス細胞をシリンジに 1 ml 移し、すぐにマウスに腹腔内に投与した。細胞投与 0.25-24 h 後に、マウスを脱血死させて 70% エタノールで消毒し、腹側の外皮を剥ぎ腹膜を露出させた。そして、腹腔内に冷 PBS 5 ml をシリンジで注入し、腹部を 100 回程マッサージして腹腔内滲出細胞を浮遊させ同シリンジにて回収し、あらかじめ氷冷しておいたシリコン処理マイクロチューブに移した。

《フローサイトメーターによる解析》

◇試薬

- PBS
- BSA (bovine serum albumin)
[SIGMA-ALDRICH]
- NaN₃
[ナカライテスク株式会社]
- 0.01% NaN₃, 0.5% BSA-PBS (以下 wash buffer とする)
- シース液 (ISO FLOW)
[BECKMAN COUKTER]
- trypan blue
- streptavidin-phycoerythrin
[R&D Systems]
- propidium iodide (以下 PI とする)
5 µg/ml に調整したものを 1 sample につき 10 µl 加えて使用。
[Bender MedSystems]

◇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)
- isotypecontrol:FITC-conjugated rat anti HLA antibody (IgG_{2b})
(clone SFR8-6B)
- isotypecontrol:biotin-conjugated rat anti HLA antibody (IgG_{2b})
(clone SFR8-6B)

【腹腔滲出細胞の解析】

trypan blue 染色にて腹腔滲出細胞の生存率を確認し、総細胞数を算出した。1 回遠心 (3000 rpm, 5 min, 4°C) し、上清を除き (この上清は ELISA 用に -30°C で凍結保存した。), wash buffer で 1 回遠心・洗浄 (3000 rpm, 5 min, 4°C) し、 5×10^5 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)。遠心・洗浄後の細胞それぞれに rat anti mouse CD64 (Fc γ receptor I) antibody (0.25 mg/ml) を 4 μ l と、rat anti mouse CD16/32 (Fc γ receptor III/II) antibody (0.25 mg/ml) を 4 μ l を添加し、氷上に 30 min 静置した。その後、biotin 化標識された抗 Mac-1 抗体 (biotin-conjugated rat anti mouse CD11b (Mac-1 α subunit) antibody, 0.5mg/ml) または抗 HLA 抗体 (biotin-conjugated rat anti HLA antibody (IgG_{2b}), 0.5 mg/ml) を 2 μ l 添加した。30 min 静置した後、wash buffer を 1 ml 加えて遠心・洗浄 (3000 rpm, 5 min, 4°C) し、上清を取り除く作業を 2 回行い、FITC 標識された抗 HLA 抗体 (FITC-conjugated rat anti HLA antibody (IgG_{2b}), 0.5 mg/ml) または抗 Gr-1 抗体 (FITC-conjugated rat anti mouse Ly-6G/6C (Gr-1) antibody, 0.5mg/ml) または抗 F4/80 抗体 (FITC-conjugated rat anti mouse F4/80 antibody, 0.5mg/ml) をそれぞれ 2 μ l 添加した。抗 Gr-1 抗体と抗 F4/80 抗体は、抗 Mac-1 抗体との二重染色を行い、biotin 化抗体を添加したものに streptavidin-phycoerythrin を 1 μ l 添加した。遮光し、氷上に 30 min 静置した後、再び wash buffer を 1 ml 加えて遠心・洗浄 (3000 rpm, 5 min, 4°C) し上清を取り除く作業を 2 回行った。その後 PI を 10 μ l 加えて 10 min 氷上で静置し、wash buffer を 1 ml 加えて遠心・洗浄 (3000 rpm, 5 min, 4°C) し上清を取り除く作業を 2 回行い、500 μ l のシース液に懸濁し、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。

《ディフ・クイック染色による腹腔滲出細胞の観察》

◇試薬

- ・固定液：95% MeOH

[ナカライテスク株式会社]

- ・ディフ・クイック染色 I
- ・ディフ・クイック染色 II

各[シスメック株式会社]

【腹腔滲出細胞の観察】

回収した腹腔滲出細胞 20×10^4 cells を 1 ml の PBS に懸濁して、サイトスピン (600 rpm, 5 min, r.t.) をしてスライドガラスに細胞をはりつけた。これに固定液を添加し、風乾させるという作業を 2 回行い細胞を固定させた。また、ディフ・クイック染色 I を添加して 50 sec 静置し、すぐにディフ・クイック染色 I を振り切り除いた。次に、ディフ・クイック染色 II を添加して 10 sec 静置し、すぐにディフ・クイック染色 II を振り切り除いた後に脱イオン交換水で細胞に注意しながらディフ・クイック染色液を完全に除去した。風乾後に顕微鏡で検鏡した。

《ELISA 法による検出》

◇試薬

- ・Tween20

[ナカライテスク株式会社]

- ・ELISA PBS

PBS を $0.2 \mu\text{m}$ フィルターでフィルトレーションし、不溶物を除去した。

- ・BSA

- ・Wash Buffer：0.05% Tween 20 in PBS

PBS に 0.05% となるように Tween 20 を加えた。

- ・Reagent Diluent：0.1% BSA, 0.05% tween 20 in PBS

0.1% の BSA in PBS に 0.05% Tween 20 を加えた。

- Blocking Buffer : 1 % BSA in PBS

PBS に 0.1% となるように BSA を加えた。

- streptavidin-HRP
- ABTS Liquid Substrate Solution
(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid))

[SIGMA-ALDRICH]

S100A9

- rabbit- α -S100A9

9.56 mg/ml を 1 μ g/ml にし、これを capture とした。

当研究室の小松修弥氏により作製された。

- recombinant S100A9

200 ng/ml から 11 段階の 2 倍希釈系列をつくり standard とした。

当研究室の小松修弥氏により作製された。

- biotin-rabbit- α - S100A9

当研究室の小松修弥氏により作製された。

- 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)

[SIGMA-ALDRICH]

- wash buffer : 0.05% Tween 20 in PBS

- reagent diluent : 0.1%BSA, 0.05% tween 20 in PBS

- blocking buffer : 1% BSA in PBS

MIP-2

- rabbit anti-murine MIP-2

capture Antibody (final 0.5 μ g/ml) として用いた。

- Biotinylated rabbit anti-murine MIP-2

detection Antibody (final 0.25 μ g/ml) として用いた。

- recombinant murine MIP-2

2 ng/ml から 7 段階の 2 倍希釈系列を作り standard とした。

- avidinhorseradish Peroxidase

1/2000 に希釈して使用した。

各[PEPROTECH]

- 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)

[SIGMA-ALDRICH]

- wash buffer : 0.05% Tween 20 in PBS
- reagent diluent : 0.1% BSA, 0.05% tween 20 in PBS
- blocking buffer : 1% BSA in PBS

KC

- rabbit anti-murine KC

capture antibody (final 0.25 µg/ml) として用いた。

- Biotinylated rabbit anti-murine KC

detection antibody (final 0.5 µg/ml) として用いた。

- recombinant murine KC

1 ng/ml から 8 段階の 2 倍希釈系列を作り standard とした。

- avidinhorseradish Peroxidase

1/2000 に希釈して使用した。

各[PEPROTECH]

- 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)

[SIGMA-ALDRICH]

- wash Buffer : 0.05% Tween 20 in PBS
- reagent diluent : 0.1% BSA, 0.05% tween 20 in PBS
- blocking buffer : 1% BSA in PBS

MCP-1

- rabbit anti-murine MCP-1
capture antibody (final 0.25 µg/ml) として用いた。
- Biotinylated rabbit anti-murine MCP-1
detection antibody (final 0.5 µg/ml) として用いた。
- recombinant murine MCP-1
2 ng/ml から 8 段階の 2 倍希釈系列を作り standard とした。
- avidinhorseradish Peroxidase
1/200 に希釈して使用した。

各[PEPROTECH]

- 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)

[SIGMA-ALDRICH]

- wash Buffer : 0.05% Tween 20 in PBS
- reagent diluent : 0.1% BSA, 0.05% tween 20 in PBS
- blocking buffer : 1% BSA in PBS

【ELISA 法による S100A9, MIP-2, KC, MCP-1の検出】

S100A9

前日に 96 well plate に Capture Ab を 50 µl/well でまき、室温で一晩おいた。翌日、まず Wash Buffer を各 well に 150 µl 入れて洗い、プレートをペーパーに叩くようにして well の水気をとった。これを 4 回行った(以下、この一連の操作を Wash と記す)。次に Blocking Buffer を各 well に 150 µl ずつまき、室温で 2 h おいた。Wash 後、sample と standard と Blank を各 well に 50 µl ずつまき、室温で 2 h おいた。Wash 後、biotin-rabbit-α-S100A9 を各 well に 50 µl でまき、室温で 2 h おいた。Wash 後、streptavidin-HRPを各 well に50 µl まき、室温で 30 min おいた。Wash 後、ABTS Liquid Substrate Solution を各 well に 50 µl まき、5-25 min 後に 405 nm (対照波長 650nm) の吸光度を測定した。

MIP-2

前日に 96 well plate に Capture Ab を 50 μ l/well でまき、室温で一晩おいた。翌日、まず Wash Buffer を各 well に 150 μ l 入れて洗い、プレートをペーパーに叩くようにして well の水気をとった。これを 4 回行った(以下、この一連の操作を Wash と記す)。次に Blocking Buffer を各 well に 150 μ l ずつまき、室温で 2 h おいた。Wash 後、sample と standard と Blank を各 well に 50 μ l ずつまき、室温で 2 h おいた。Wash 後、Detection antibody を各 well に 50 μ l でまき、室温で 2 h おいた。Wash 後、Avidin Peroxidase を各 well に 50 μ l まき、室温で 30 min おいた。Wash 後、ABTS Liquid Substrate Solution を各 well に 50 μ l まき、5-25 min 後に 405 nm (対照波長 650 nm) の吸光度を測定した。

KC

前日に 96 well plate に Capture Ab を 50 μ l/well でまき、室温で一晩おいた。翌日、まず Wash Buffer を各 well に 150 μ l 入れて洗い、プレートをペーパーに叩くようにして well の水気をとった。これを 4 回行った(以下、この一連の操作を Wash と記す)。次に Blocking Buffer を各 well に 150 μ l ずつまき、室温で 2 h おいた。Wash 後、sample と standard と Blank を各 well に 50 μ l ずつまき、室温で 2 h おいた。Wash 後、Detection antibody を各 well に 50 μ l でまき、室温で 2 h おいた。Wash 後、Avidin Peroxidase を各 well に 50 μ l まき、室温で 30 min おいた。Wash 後、ABTS Liquid Substrate Solution を各 well に 50 μ l まき、5-25 min 後に 405 nm (対照波長 650nm) の吸光度を測定した。

MCP-1

前日に 96 well plate に Capture Ab を 50 μ l/well でまき、室温で一晩おいた。翌日、まず Wash Buffer を各 well に 150 μ l 入れて洗い、プレートをペーパーに叩くようにして well の水気をとった。これを 4 回行った(以下、この一連の操作を Wash と記す)。次に Blocking Buffer を各 well に 150 μ l ずつまき、室温で 2 h おいた。Wash 後、sample と standard と Blank を各 well に 50 μ l ずつまき、室温で 2 h おいた。Wash 後、Detection antibody を各 well に 50 μ l でまき、室温で 2 h おいた。Wash 後、Avidin Peroxidase を各 well に 50 μ l まき、室温で 30 min おいた。Wash 後、ABTS Liquid Substrate Solution を各 well に 50 μ l まき、5-25 min 後に 405 nm (対照波長 650nm) の吸光度を測定した。

III Results and Discussion

《抗 S100A9 抗体 の 作製》

* ウサギ血清中の抗体価 (Figure 1)

ウサギ抗 S100A9 抗体を作製するために、形質転換した大腸菌を培養して rS100A9 を作製した。得られた rS100A9 をウサギに皮下注射をして免疫した。免疫前、免疫後のウサギの血清を用いて rS100A9 に対する抗体価を ELISA により測定した。結果、二次免疫 2 回目以降のウサギは rS100A9 に対する抗体価が十分に上昇していることが確認できた。

* 抗体の精製状態の確認 (Figure 2)

rS100A9 に対する抗体価が十分に上がりきっていること、2 匹のウサギの体重が共に 3200 g 以上となっていることが確認できたので二次免疫 6 回目を最後の免疫としてその一週間後に全採血を行った。全採血した結果、免疫したウサギ 2 匹分から血清は心臓から直接採取では 50 ml, 腹腔内に流れ出た血清は 35 ml 得ることができた。このとき、腹腔内に流れ出た血清は不純物である脂肪分が多く含まれているので直接得られた血清と分けて精製を行うことにした。n-カプリル酸による上清回収では上清が透明になるまで繰り返し行った。得られたサンプルの精製状態を確認するために SDS-PAGE を行った。

結果、腹腔内に流れ出た血清と心臓から直接採取した血清は同程度精製されていることが確認できたのでこれ以降はこれらを混合して抗体精製を行うこととした。また、吸光度 (OD₂₈₀) で測定したところ心臓から直接採取した血清量は 213 mg, 腹腔内に流れ出た血清量は 138.6 mg であった。

*アフィニティーカラムクロマトグラフィーによる抗体の精製 (Figure 3)

抗体の精製状態の確認で SDS-PAGE を行ったところ図の矢印で示したところに不純物であるバンドが確認できたので Hitrap Protein G HP カラムを用いて不純物を除去することとした。elution buffer で溶出したサンプルの精製状態を確認するために SDS-PAGE を行った (I)。このとき、Hitrap Protein G HP カラムにサンプルを結合後、binding buffer で洗浄した際、最初にカラムから出てきた 1 ml に目的の抗体が流出した可能性があるのも同様に SDS-PAGE を行った。その結果、I では抗体のバンドがみられなかったため、抗体は流出していないということが確認できた。また、比較のため Hitrap Protein G HP カラムにかける前の抗体も同時に流した。カラムをかける前に見られた不純物のバンドはカラム後ではみられなかったため不純物が除去できたことが確認できた。

精製後の抗 S100A9 抗体の最終濃度は吸光度 (OD₂₈₀) で測定したところ 5.5654 mg/ml であった。

Figure 4 精製した抗 S100A9 抗体の抗体価の測定

ウサギに免疫した抗原 (rS100A9) に対するサンプルの最終的な抗体価を ELISA にて測定した。capture に rS100A9 を撒き、今回作製した抗 S100A9 抗体と以前当研究室で作製された抗 S100A9 抗体の抗体価を比較した。また、negative control として capture に BSA を撒いた。その結果、rS100A9 に対する抗 S100A9 抗体は 4000 であり、また、以前作製された抗 S100A9 抗体とほぼ同程度の抗体価であった。negative control である BSA との比較から、精製した抗体が rS100A9 に特異的に反応していることが確認できた。精製したサンプルは孔径 0.22 μm のフィルターに通して無菌化して -30℃ で保存した。

《抗 S100A9 抗体と necTG 誘導好中球投与におけるマウス腹腔内での炎症応答》

*フローサイトメーターによる腹腔滲出細胞の解析方法 (Figure 5,6)

死細胞は PI で染まることがわかっている。PI は FL-3 で検出ができるが、FL-2 にも PI の蛍光が漏れこんでしまうので、FSC と PI で、PI ポジティブの死細胞を除き、R1 の細胞を解析対象とした (Figure 5 A, B)。

CD11b は好中球、単球、好酸球では intermediate (以下 int)に発現し、マクロファージでは high で発現している。また、F4/80 はマクロファージでは high, 単球と好酸球では int で発現している。Gr-1 は単球では int, 好中球では high で発現している。このことから、Gr-1^{high}/CD11b^{int} 細胞を好中球、Gr-1^{int}/CD11b^{int} 細胞を単球、F4/80^{high}/CD11b^{high} 細胞をマクロファージ、F4/80^{int}/CD11b^{int} 細胞を好酸球とした。単球は好酸球と同じ F4/80^{int}/CD11b^{int} 細胞でもあり表面抗原の違いが明確ではないため、さらに FSC, SSC で区別をした (Figure 6)。

*抗 S100A9 抗体と necTG 誘導好中球投与における炎症応答 (腹腔滲出細胞および S100A9 protein 産生) (Figure 7, 8)

CDF1 マウスに抗 S100A9 抗体存在下・非存在下で necTG 誘導好中球を腹腔内投与し、経時的に腹腔内滲出液を回収した。抗 S100A9 抗体は necTG 誘導好中球と同時投与、necTG 誘導好中球投与 6 h 後および同時投与かつ 6 h 後に再び中和抗体投与の 3 通りの方法で行った。また、中和抗体の control として normal rabbit IgG を用いた。この浸出液を遠心分離して得られた細胞を FACSで解析 (Figure 7) し、また上清を ELISA により S100A9 protein (figure 8) 量の定量に用いた。

necTG 誘導好中球と抗 S100A9 抗体をマウス腹腔内に投与したところ S100A9 protein が中和していることが確認できた (Figure 8)。また、necTG 誘導好中球投与のみでは S100A9 protein 産生のピークは投与 9 h 後であっ

た。このことから中和抗体を投与する際、炎症後期まで効果を持続化するために、同時投与だけではなく S100A9 protein 産生のピーク前である 6 h 後にも投与することとした。

投与する necTG 誘導好中球には生存している好中球があり、投与することで好中球の浸潤数に影響があるのではないかと示唆されたので、ディフ・クイック染色及びフローサイトメーターを行った。顕微鏡でディフ・クイック染色を観察すると全て細胞はネクローシスされており、かつ細胞の原形を留めてはいなかった。またフローサイトメーターでも細胞生存率は低く、また好中球などの割合もほぼなかった。このことから精製した necTG 誘導好中球は好中球の浸潤数など細胞の数に直接影響を与えないことが確認できた。

中和抗体を投与することにより浸潤した好中球は 18 h 後まで残存していた。中和抗体同時投与では 12 h 後から他の 2 通りの中和抗体投与と比べて有意に残存していた (Figure 7 A)。このとき、中和抗体未投与では炎症の後期では浸潤好中球がアポトーシスされていることがフローサイトメーターで確認できた。一方、中和抗体投与では炎症後期においても浸潤好中球はアポトーシスされてはいなかった。また、単球の浸潤するピークは 18 h 後から 9 h 後と早まり (Figure 7 B), 好酸球の浸潤は 12 h 後、18 h 後で有意に増加していた (Figure 7 D)。中和抗体を投与することで好中球が残存するという事は、炎症が持続化されていると考えられ、S100A9 protein が抗炎症性物質として作用していることが示唆される。このとき、好中球の持続化について 2 つの可能性が考えられた。1 つ目は好中球が炎症後期にも浸潤してきたということ、2 つ目はマクロファージの貪食除去機能が低下したことにより好中球が炎症後期にも残存していたということである。また好酸球の浸潤が増加したことについて考察すると、好酸球は炎症を抑制させようとする働きがあるという報告があり、この報告から残存する好中球により炎症応答が持続化かつ重篤化したため、それに対応するべく多く好酸球を動員する必要があったと考えられる。また単球は炎症後期に浸潤し、その後マクロファージへと分化して炎症終息の役割を持つが、中和抗体投与で浸潤するピークが未投与と比べて早まった。

nec TG 誘導好中球投与 6 h 後に中和抗体を投与したとき、18 h 後ではマクロファージが有意に増加していた。これは単球のピークが早まったため、単球から分化して炎症の終息に関与するマクロファージのピークが早まったのではないかと示唆した (Figure 7 C)。

***抗 S100A9 抗体と necTG 誘導好中球投与における炎症応答 (ケモカイン 産生) (Figure 9)**

CDF1 マウスに抗 S100A9 抗体存在下・非存在下で necTG 誘導好中球を腹腔内投与し、経時的に腹腔内滲出液を回収した。中和抗体は necTG 誘導好中球と同時投与、necTG 誘導好中球投与 6 h 後および同時投与かつ 6 h 後に再び中和抗体投与の 3 通りの方法で行った。また、中和抗体の control として normal rabbit IgG を用いた。この浸出液を遠心分離して得られた上清を ELISA によりケモカインである MIP-2, KC, MCP-1 (figure 9) 量の定量に用いた。

好中球の走化性因子である MIP-2, KC の産生量を測定した。中和抗体を投与すると MIP-2, KC の産生量は増加した。また、MIP-2 では中和抗体未投与では 1.5 h 後であったピークが 2.5 h 後と遅れていた。以前、necTG 誘導好中球のみを投与した際、好中球のピークは 2 h 後、3 h 後と二峰性がみられた。また、MIP-2, KC の産生量のピークがそれぞれ 1.5 h 後と 2.5 h 後であったため、MIP-2 は投与 2 h 後、KC は投与 3 h 後の浸潤した好中球のピークの由来ではないかと示唆された。今回、中和抗体を投与したとき、MIP-2, KC 産生量のピークの差はなく、また、好中球も二峰性がみられなかったため以前の考察を支持する結果となった (Figure 8 A, B)。また、これらのケモカインが炎症後期に産生されていないということは、残存している好中球は新たに浸潤されたのではなく、炎症初期に浸潤してきた好中球が炎症後期まで残存化していることを示唆している。このことから Figure 8 で示唆した好中球の持続化についての 1 つ目にあげた好中球が炎症後期に新たに浸潤してきたという可能性はなくなると示唆できる。また、抗 S100A9 抗体を腹腔内投与することで好中球が炎症後期まで残存していることから、S100A9 protein はマクロファージの浸潤好中球に対する貪食除去機能に関与していることが示唆できる。単球の走化性因子である MCP-1 は中和抗体を同時投与することで産生量は増加したが、産生される時期に変化はみられなかった (Figure 8 C)。このことから、単球のピークが早まったのは MCP-1 の産生量が増加したからではないかと示唆できる。

今回の実験で、S100A9 protein は炎症促進性物質として知られている

DAMPs のひとつであるが、抗炎症性物質としての可能性が示唆できた。また、単球のピークが中和抗体未投与と比べて早いことから今後は 24 h 以降も調べてマクロファージの浸潤を比較する必要がある。また、詳細が明らかとなっていない好酸球の働きをより詳しく解明していくことで S100A9 protein の役割がより解明できるのではないかと考えられる。

IV Figures

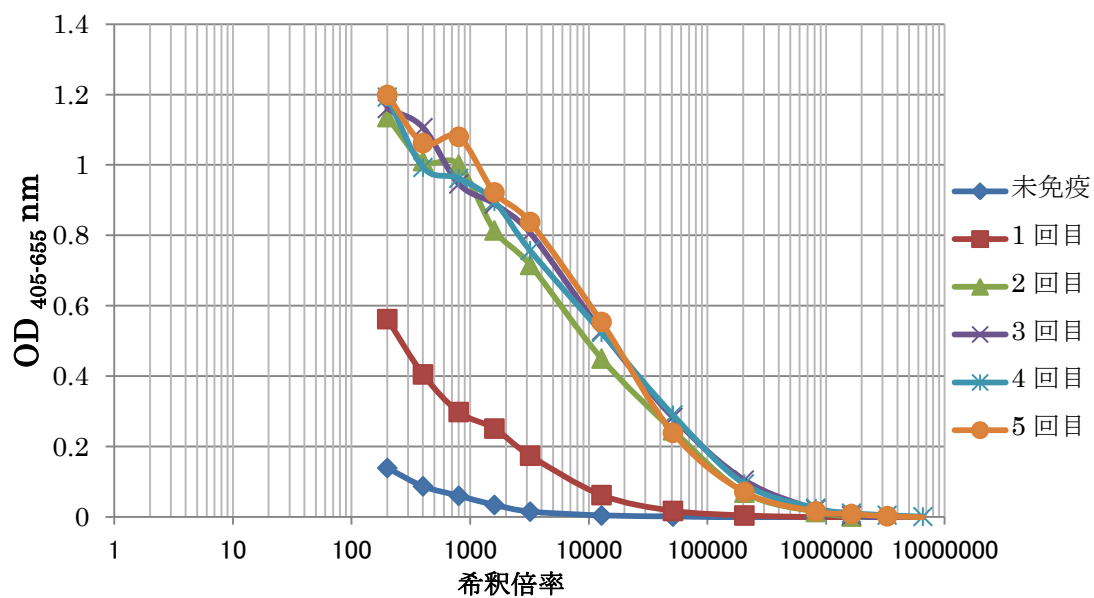


Figure 1 ウサギ血清中の抗体価

rS100A9 を免疫したウサギの抗血清を用いて免疫した rS100A9 に対する抗体価を ELISA により測定した。

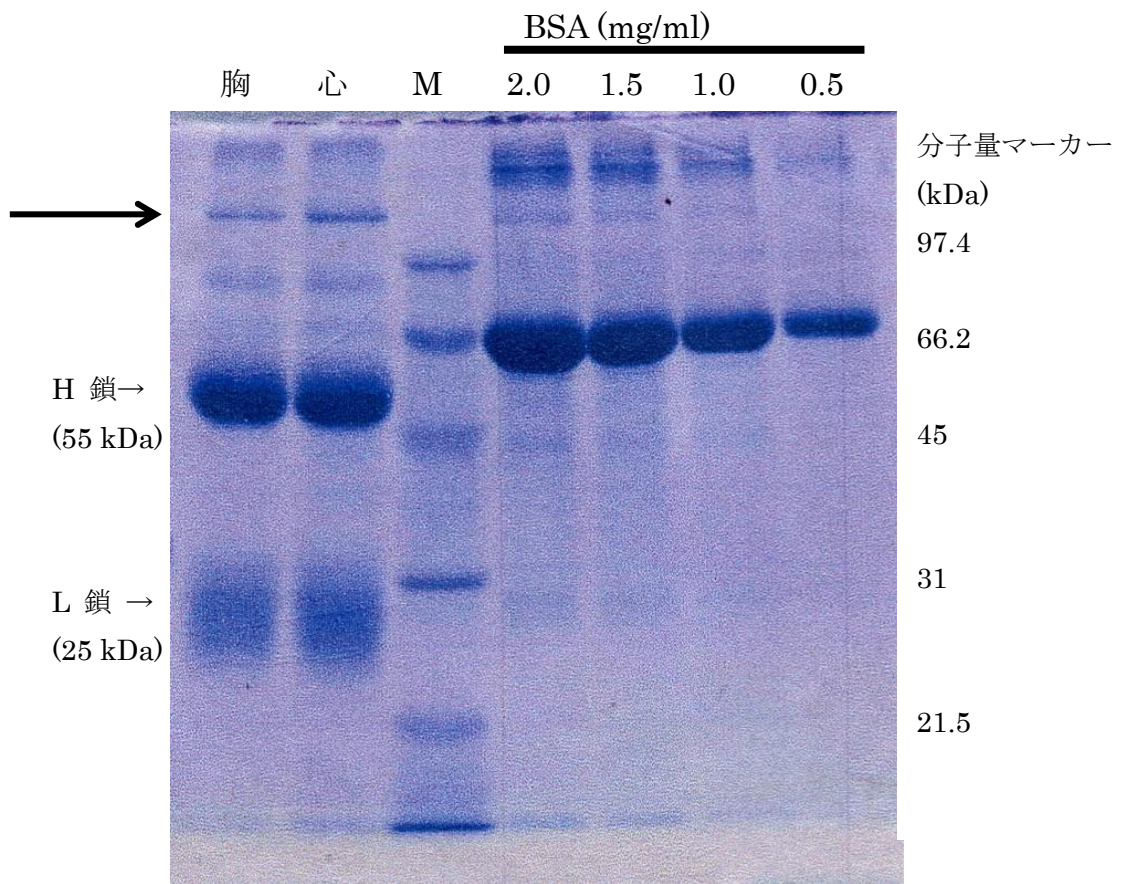


Figure 2 抗体の特製状態の確認

rS100A9 を免疫したウサギから得られた血清に n-カプリル酸、硫酸沈殿を行い、回収したサンプルを SDS-PAGE した。

胸：胸腔から採取したサンプル、心：心臓から直接採取したサンプル

M：marker

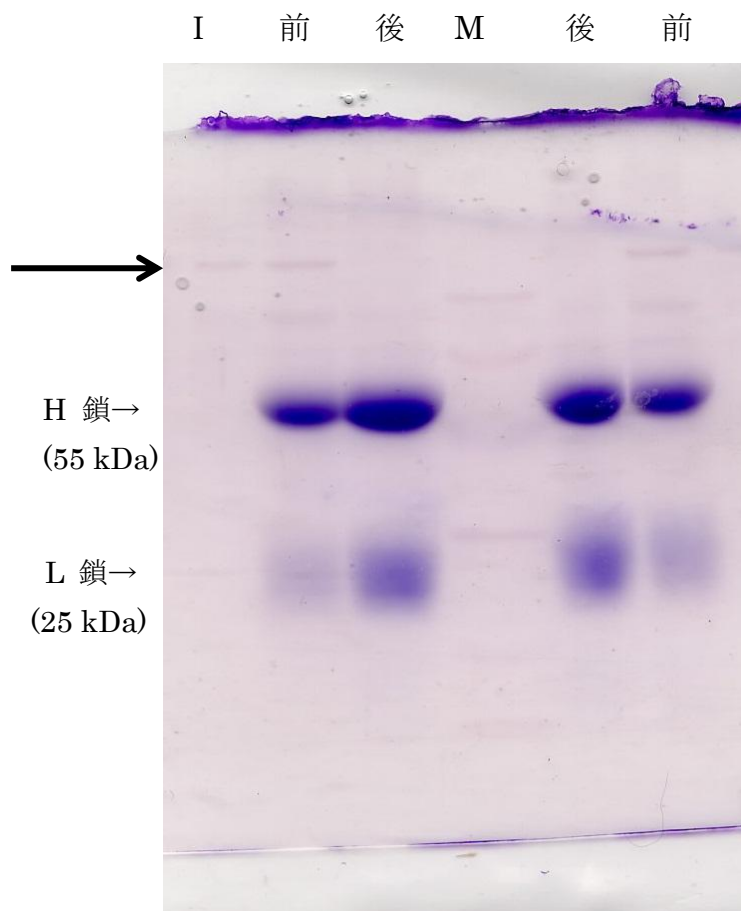


Figure 3 アフィニティーカラムクロマトグラフィーによる抗体の精製
Hitrap Protein G HP カラムに抗 S100A9 抗体を結合させて精製し、溶出したサンプルを SDS-PAGE した。

I : Hitrap Protein G HP カラムにサンプルを結合後、binding buffer で洗淨した際、最初にカラムから出てきた 1 ml 。前 : カラム精製前、後 : カラム精製後、M : marker

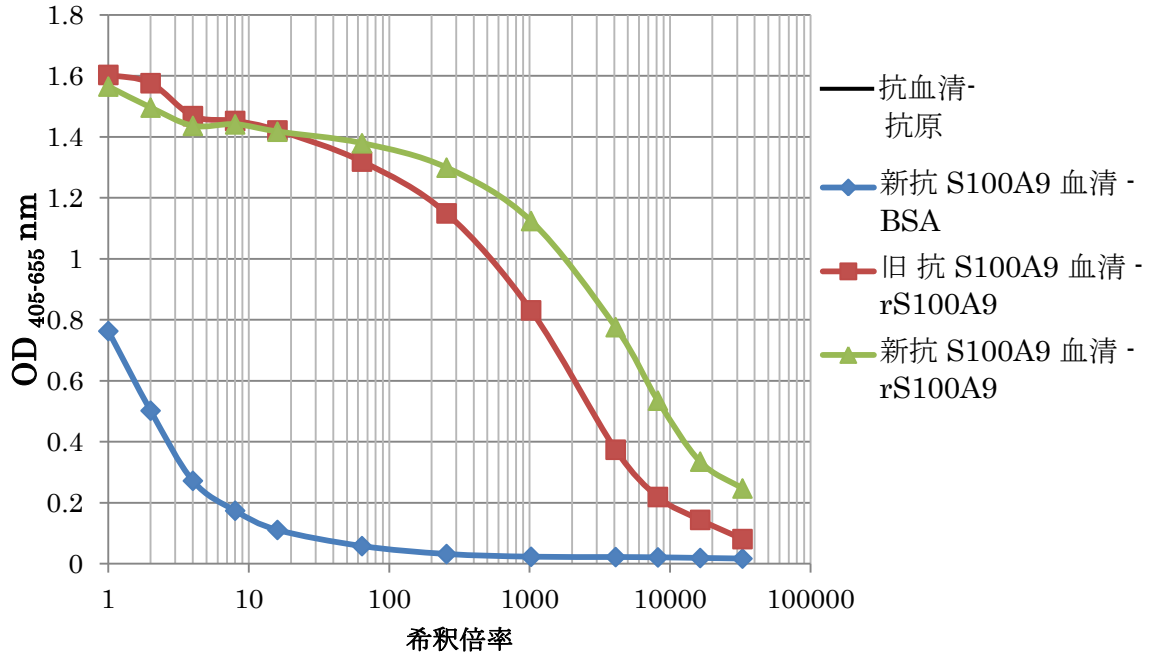


Figure 4 精製した抗 S100A9 抗体の抗体価の測定

ウサギに免疫した抗原 (rS100A9) に対する精製したサンプル (抗 S100A9 抗体)の抗体価を ELISA で測定した。negative control として capture に BSA を使用した。

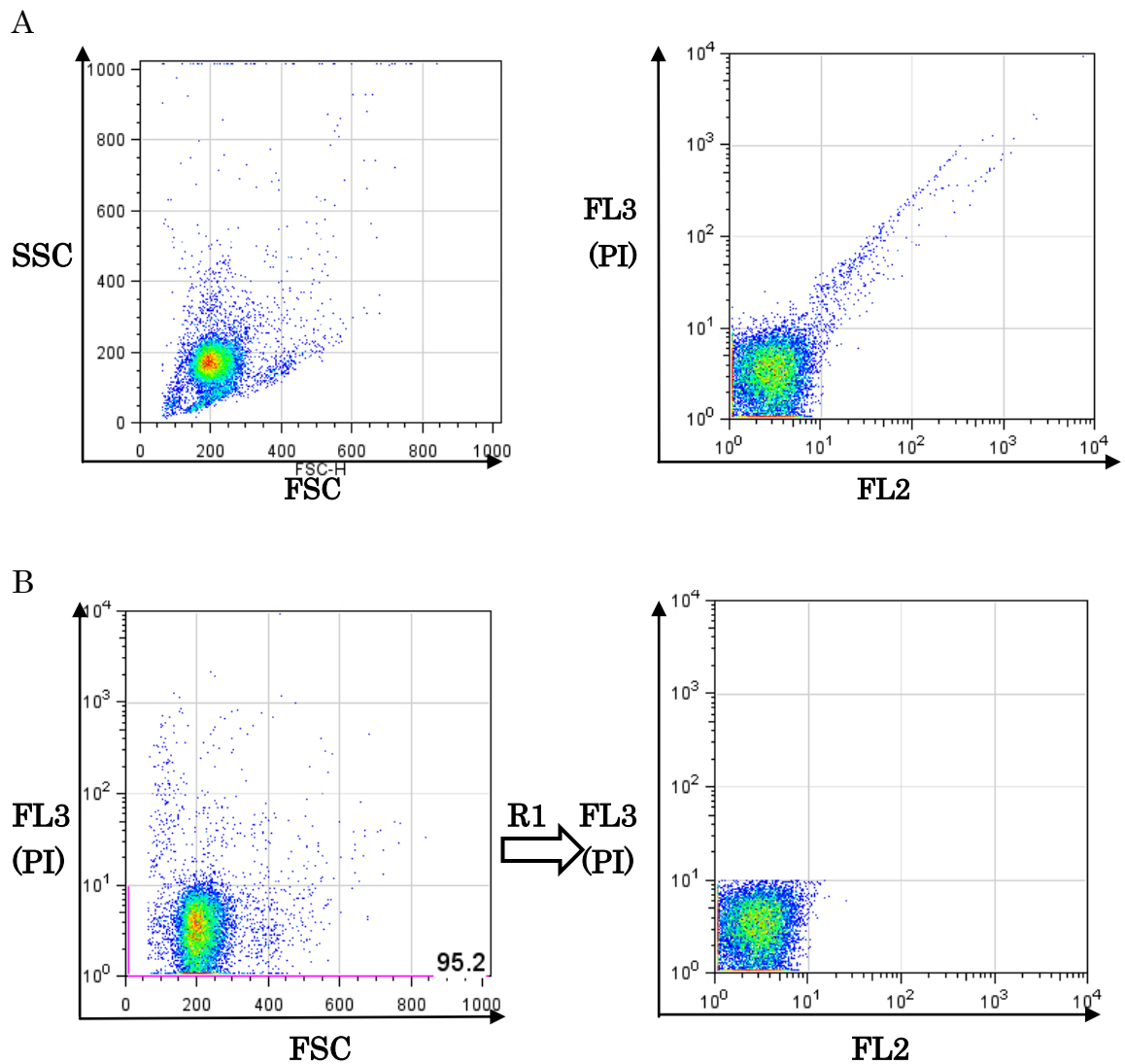


Figure 5 フローサイトメーターによる腹腔滲出細胞の解析方法

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 のゲートをかけて死細胞を除き、その R1 を FL2 と PI で示した(B)。

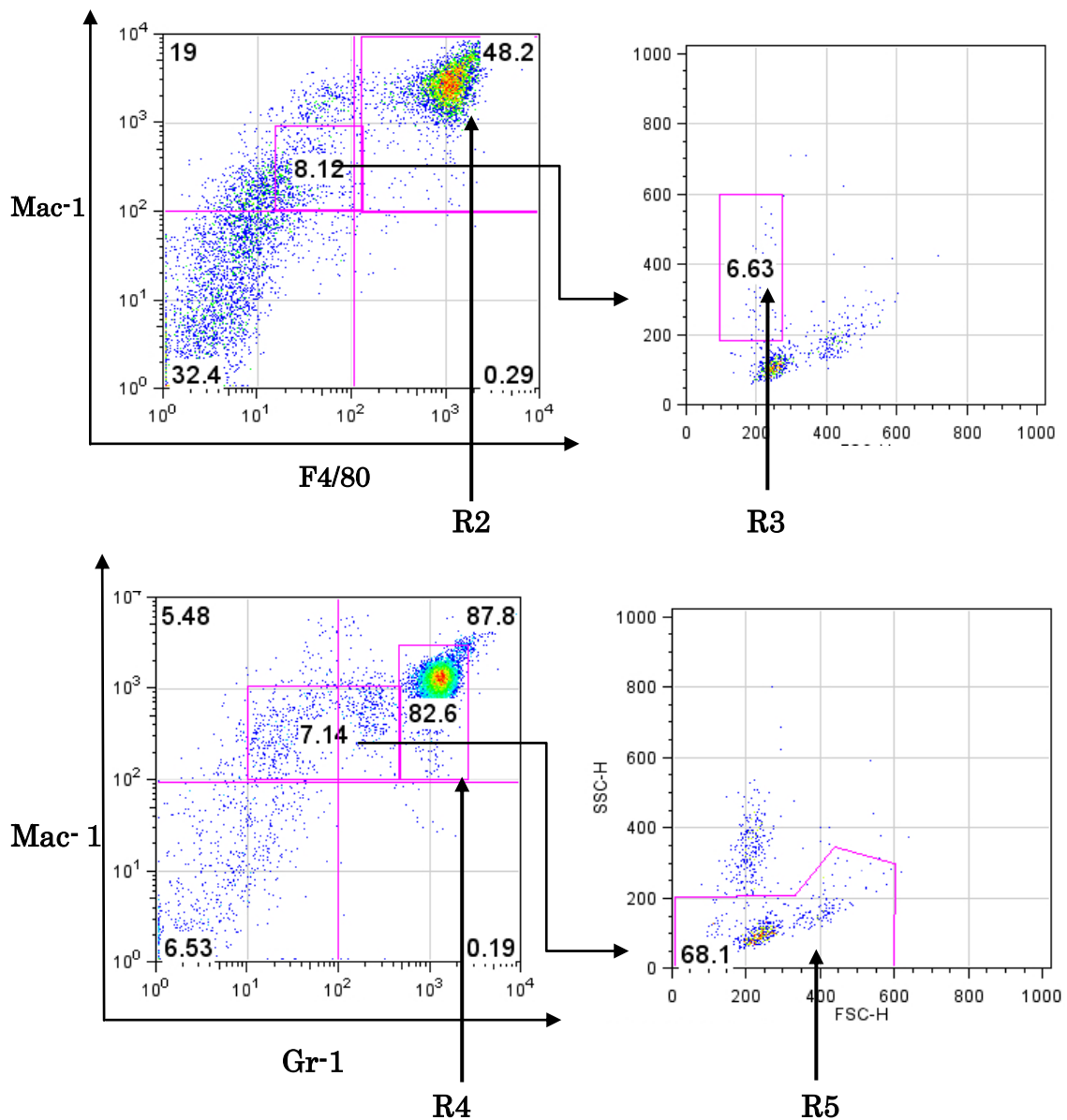
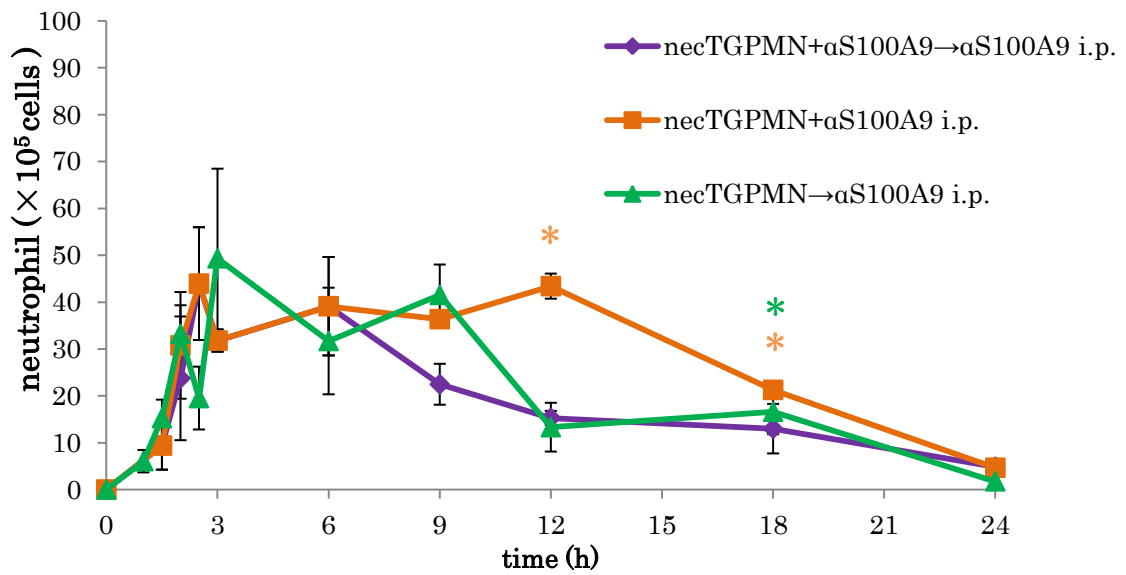
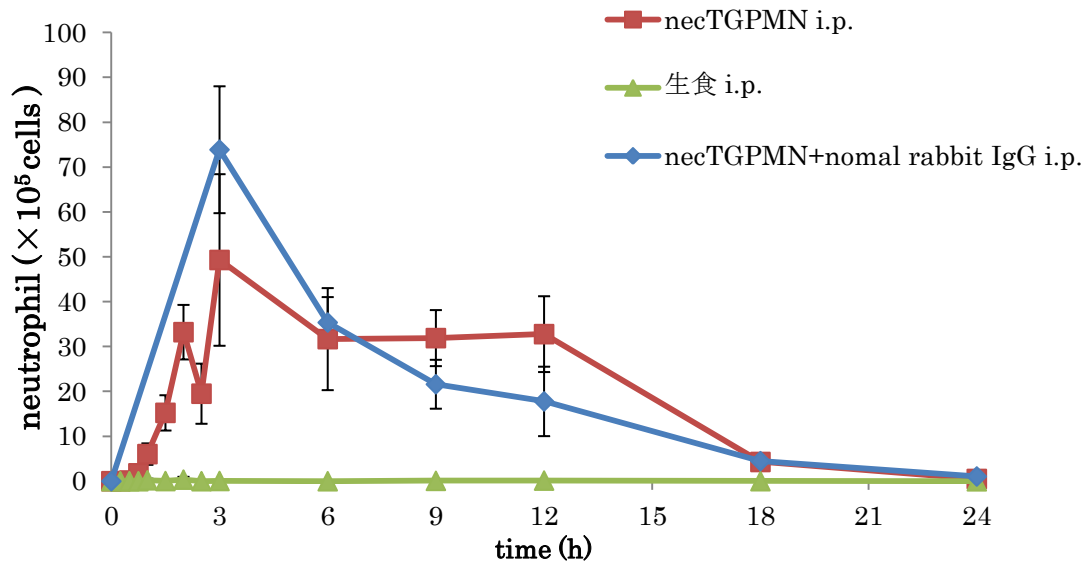


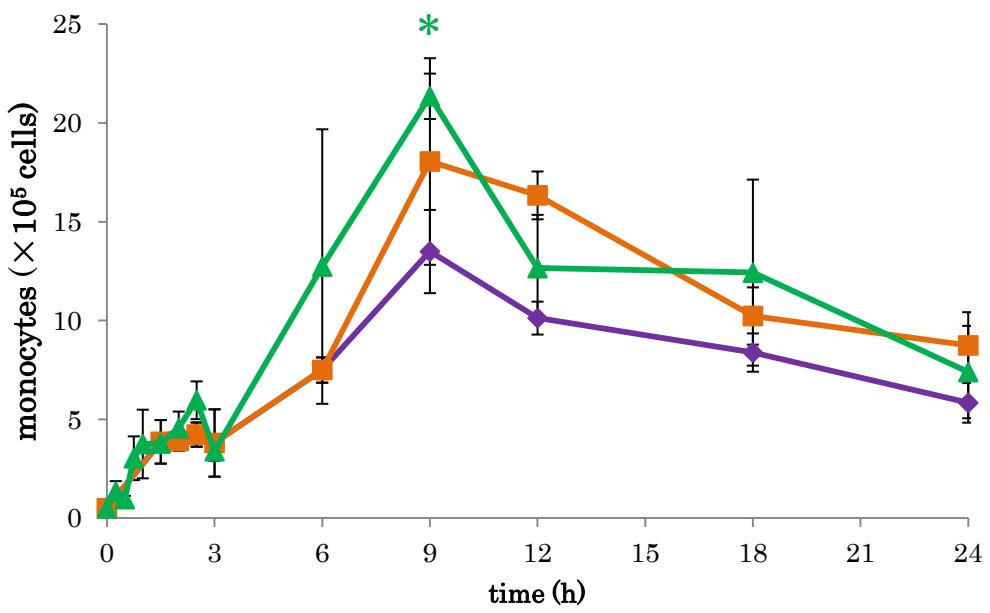
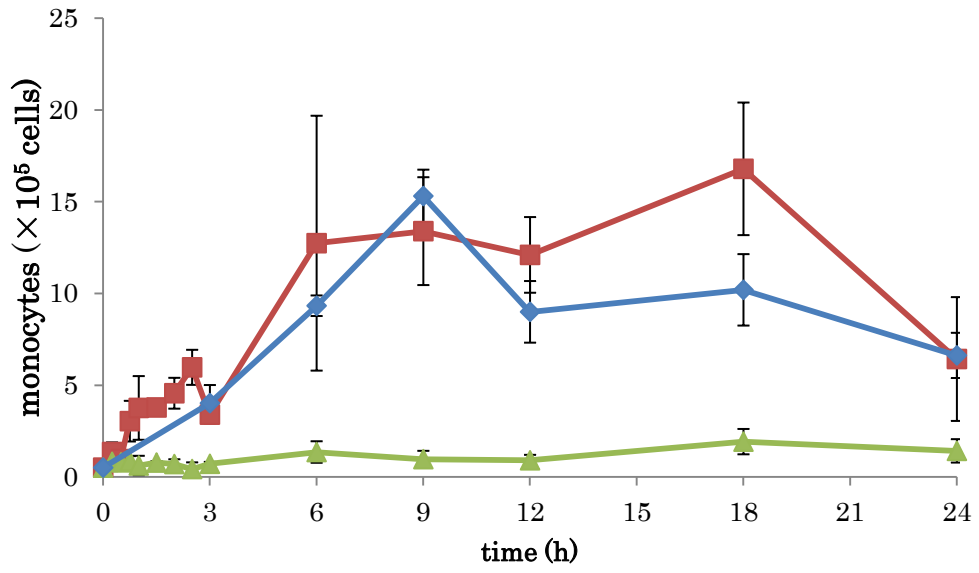
Figure 6 フローサイトメーターによる腹腔滲出細胞の解析方法

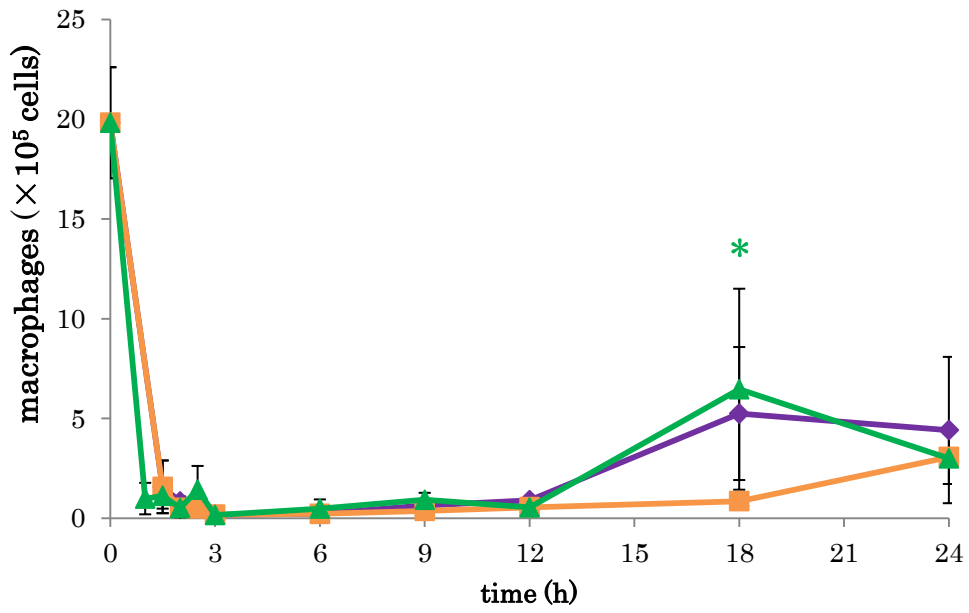
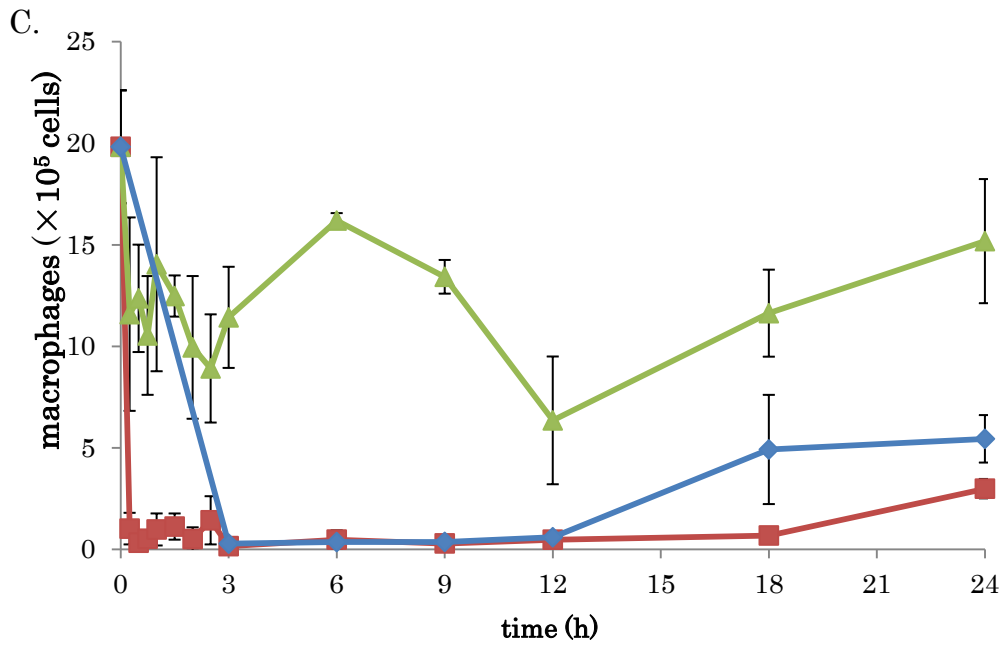
Figure 5 B で死細胞を除いた R1 中の細胞をマクロファージ、好酸球、好中球、単球をそれぞれの表面抗原の違いによりゲートかけた。R2. マクロファージ($F4/80^{high}/Mac-1^{high}$), R3. 好酸球 ($F4/80^{int}/CD11b^{int}$), R4. 好中球 ($Gr-1^{high}/CD11b^{int}$), R5. 単球 ($Gr-1^{int}/CD11b^{int}$) とした。

A.



B.





D.

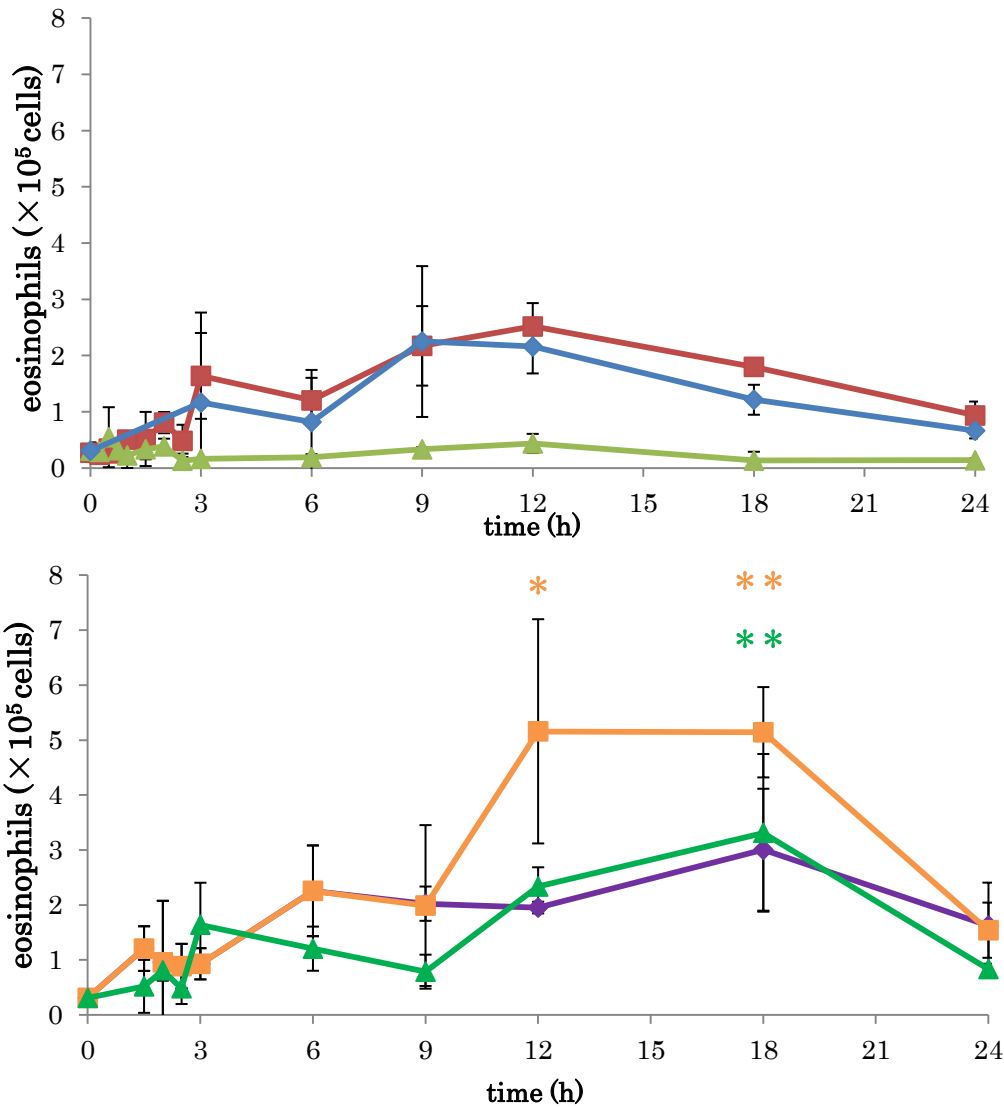


Figure 7 (A-D) 抗 S100A9 抗体と necTG 誘導好中球投与における各々の細胞数の経時的変化

CDF1 マウスに抗 S100A9 抗体存在下・非存在下で necTG 誘導好中球 (450×10^4 cell/ml) を 1 ml 腹腔内投与して PBS 5 ml で経時的に回収した腹腔内滲出細胞を FACS で解析した。このとき、中和抗体は necTG 誘導好中球と同時投与、necTG 誘導好中球投与 6 h 後および同時投与かつ 6 h 後に再び中和抗体投与の 3 通りの方法で行った。A. 好中球、B. 単細胞、C. マクロファージ、D. 好酸球を示した。

*P<0.05, **P<0.01 versus necTGPMN i.p.

n=3-4 (mean ± S.D.)

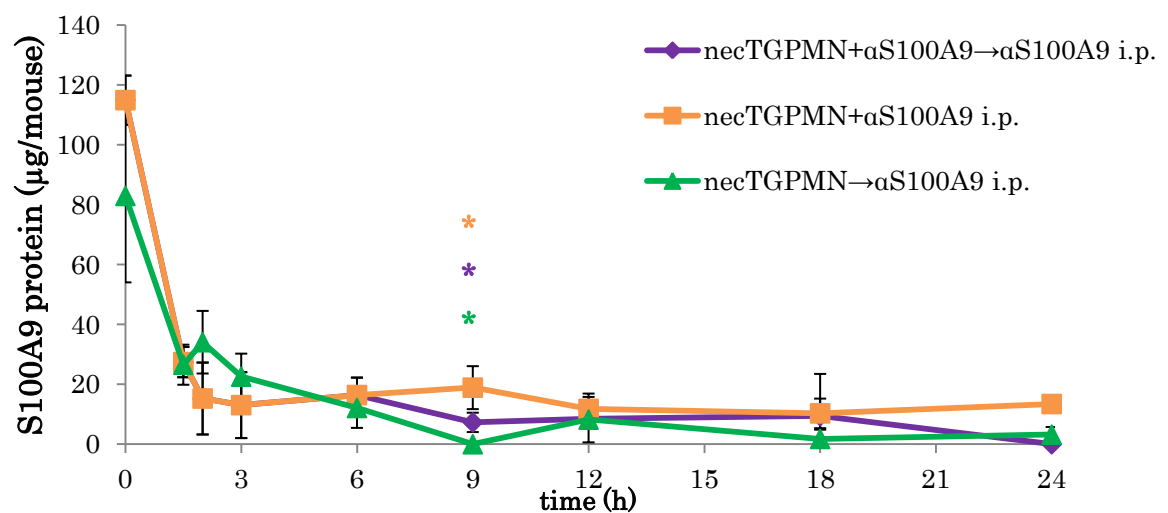
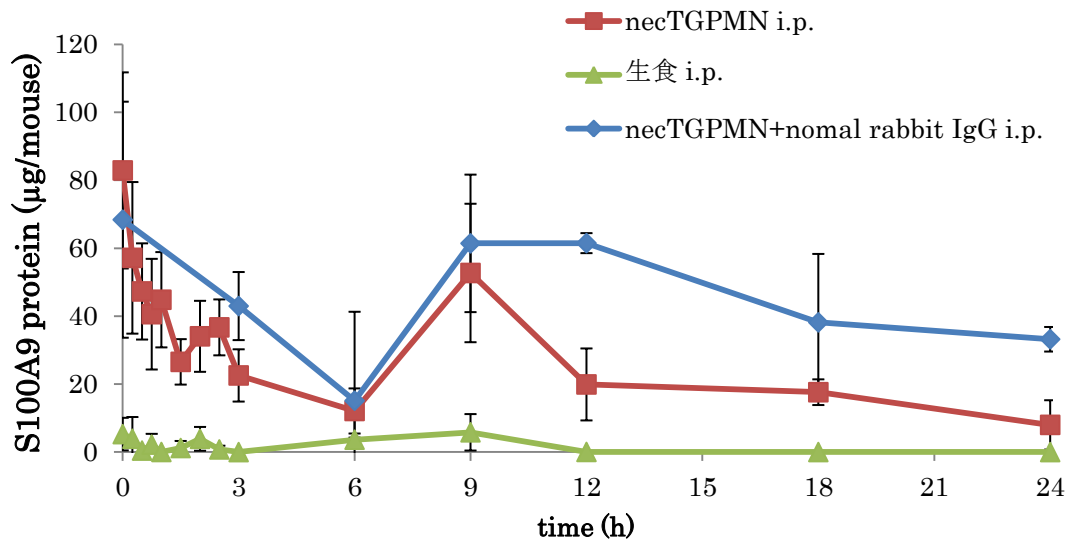


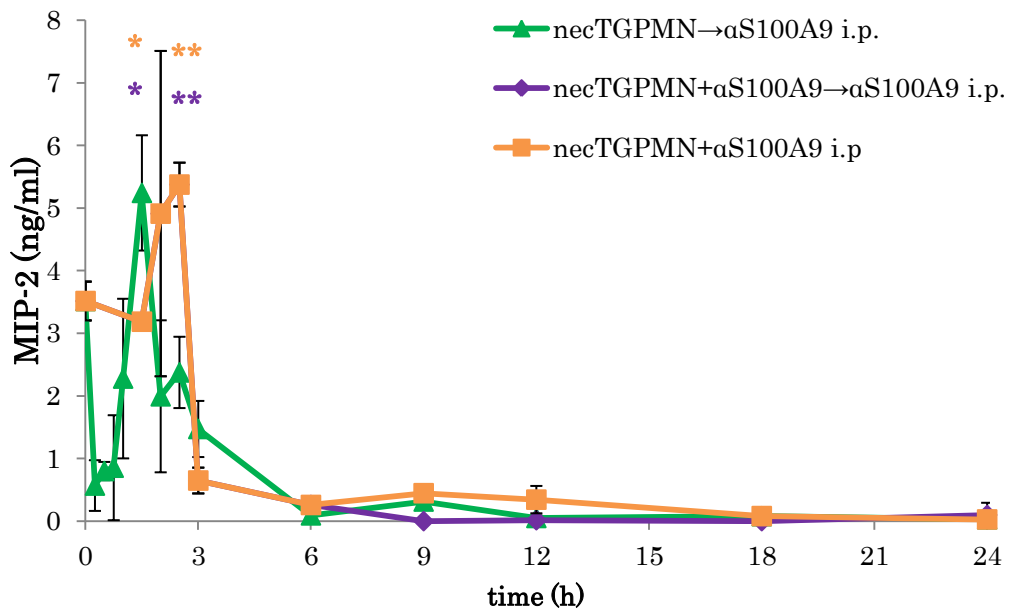
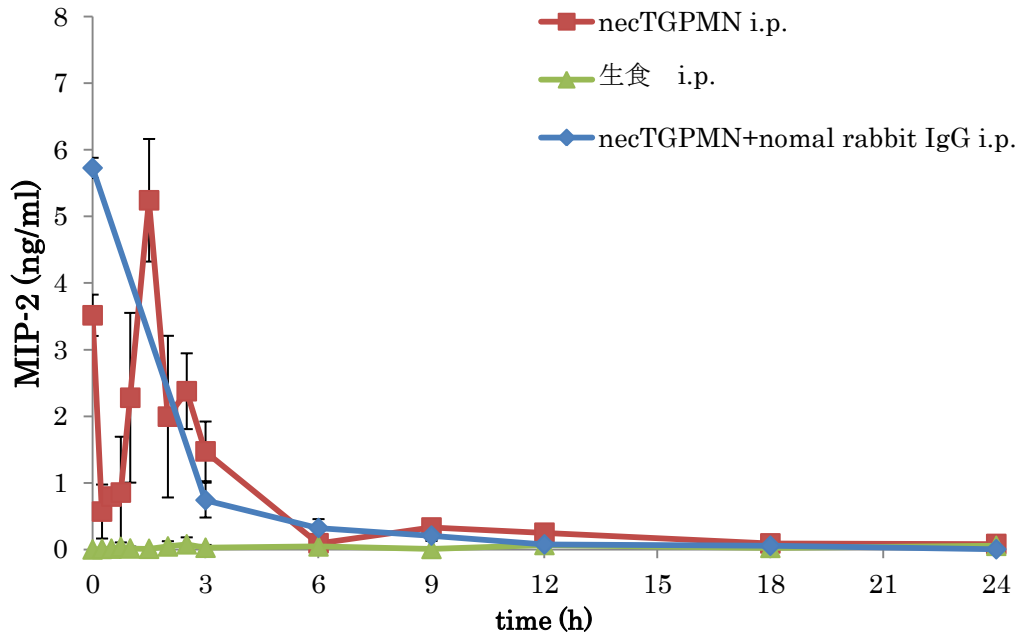
Figure 8 抗 S100A9 抗体と necTG 誘導好中球投与における S100A9 protein 産生

CDF1 マウスに抗 S100A9 抗体存在下・非存在下で necTG 誘導好中球 (450×10^4 cell/ml) を 1 ml ずつ腹腔内投与して PBS 5 ml で腹腔内滲出液を経時的に回収した。遠心 (3000 rpm, 5 min, 4°C) をして上清を回収し、ELISA にて S100A9 protein を定量した。

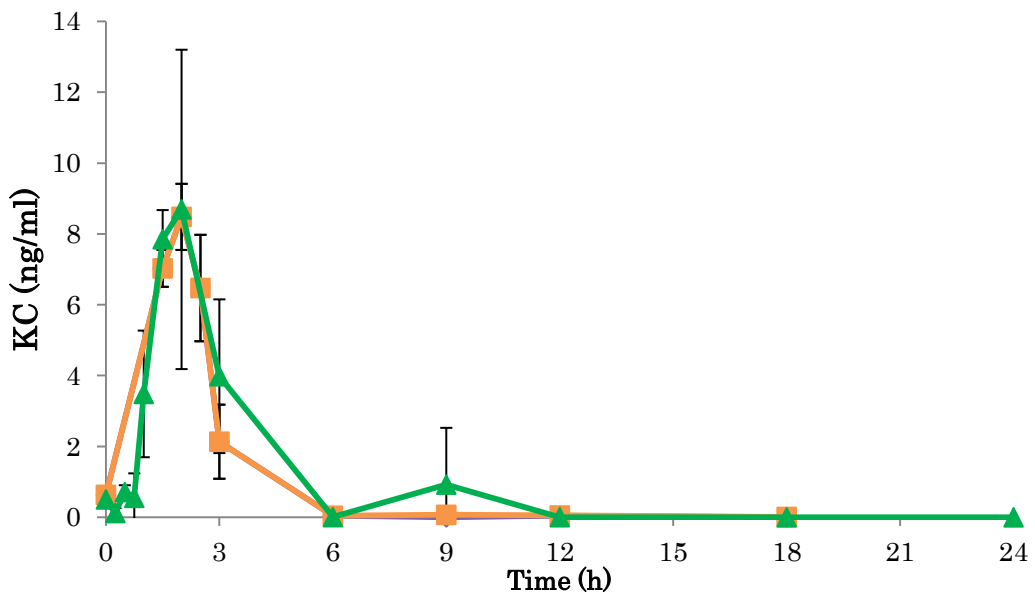
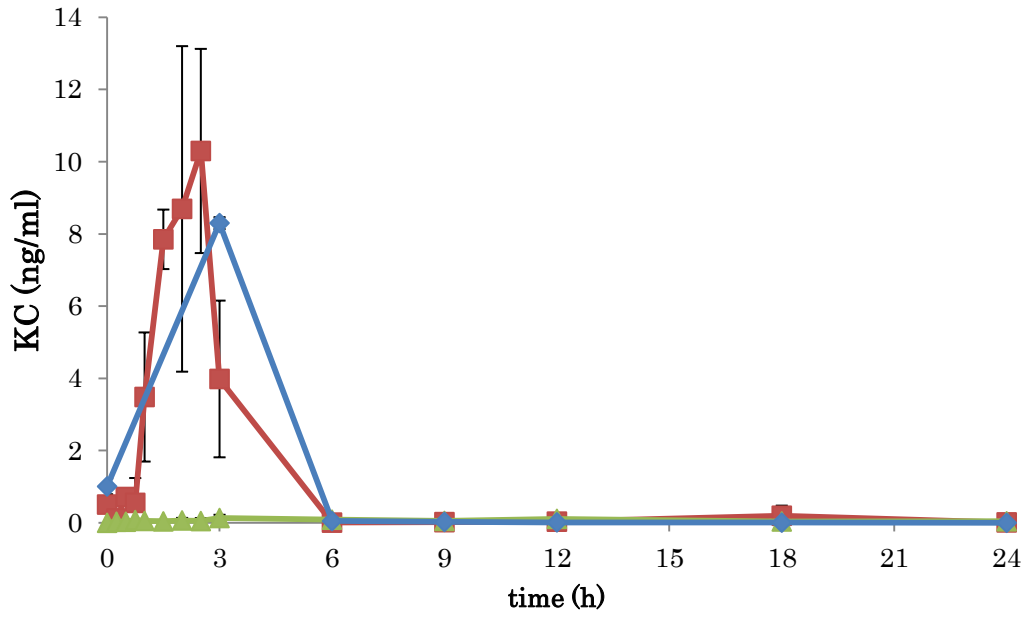
*P<0.05 versus necTGPMN i.p.

n=3-4 (mean ± S.D.)

A.



B.



C.

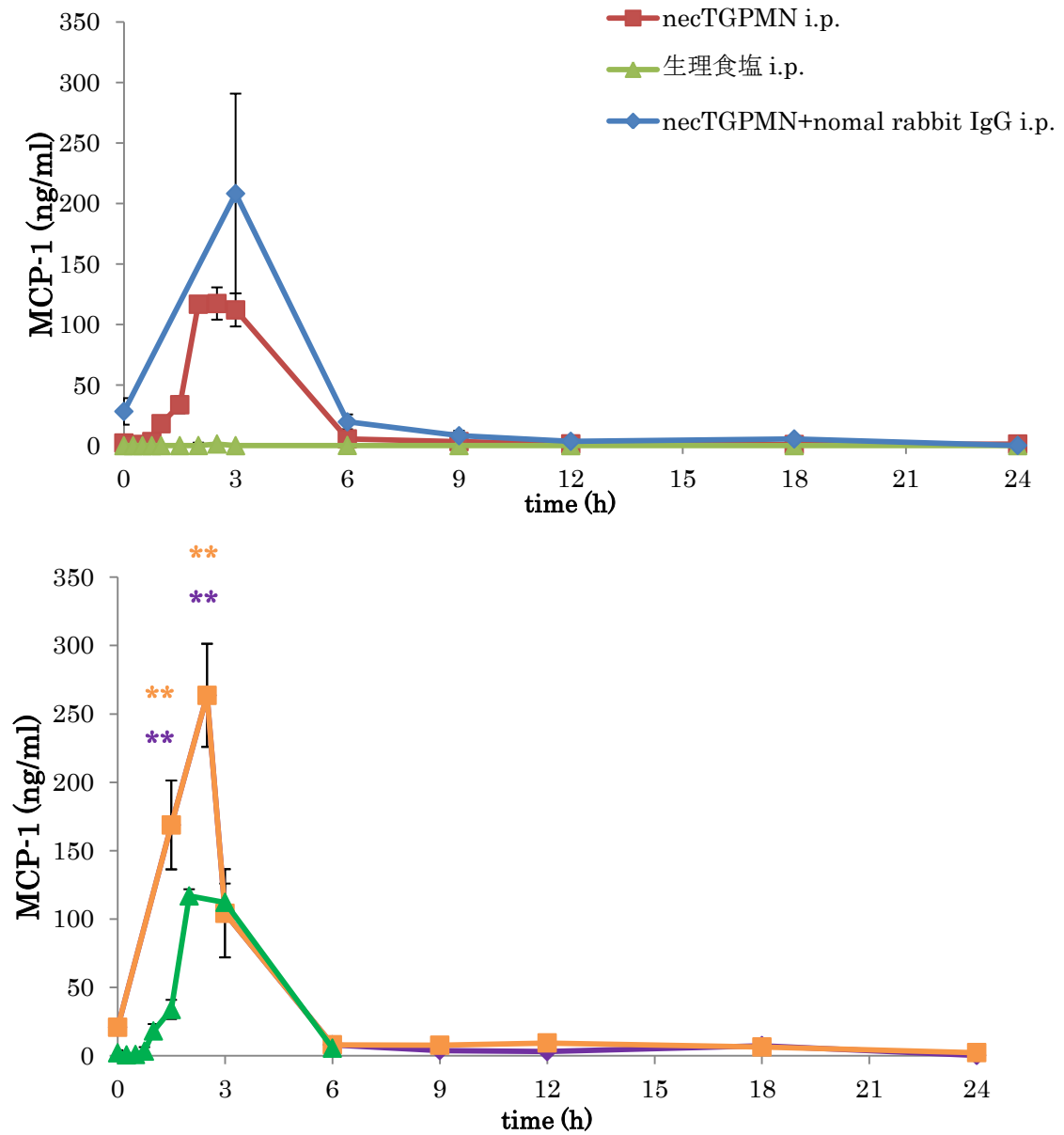


Figure 9 抗 S100A9 抗体と necTG 誘導好中球投与におけるケモカイン産生

CDF1 マウスに抗 S100A9 抗体存在下・非存在下で necTG 誘導好中球 (450×10^4 cell/ml) を 1 ml ずつ腹腔内投与して PBS 5 ml で腹腔内滲出液を経時的に回収した。遠心 (3000 rpm, 5 min, 4°C) をして上清を回収し、ELISA にてケモカイン産生を定量した。A. MIP-2, B. KC, C.MCP-1 産生量を示した。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus necTGPMN i.p.

n=3-4 (mean \pm S.D.)

V References

- 1) Lomas-Neira JL, Chung CS, Grutkoski PS, Miller EJ, Ayala A.
CXCR2 inhibition suppresses hemorrhage-induced priming for acute lung injury in mice.
J Leukoc Biol. 2004 Jul;76(1):58-64.
- 2) Kono H, Rock KL.
How dying cells alert the immune system to danger.
Nat Rev Immunol. 2008 Apr;8(4):279-89. Epub 2008 Mar 14. Review.
- 3) Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessier PA.
Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion.
J Immunol. 2003 Mar 15;170(6):3233-42
- 4) Vandal K, Rouleau A, Ryckman C, Talbot M, Tessier PA.
Blockade of S100A8 and S100A9 suppresses neutrophil migration in response to lipopolysaccharide.
J Immunol. 2003 Sep 1;171(5):2602-9.
- 5) Anceriz N, Vandal K, Tessier PA.
S100A9 mediates neutrophil adhesion to fibronectin through activation of beta2 integrins.
Biochem Biophys Res Commun. 2007 Mar 2;354(1):84-9. Epub 2007 Jan 8.
- 6) Giorgi, R., R. L. Pagano, M. A. Dias, T. Aguiar-passeti, C. Sorg, and M. Mariano. 1998
Antinociceptive effect of the calcium-binding protein MRP-14 and the role played by neutrophils on the control of inflammatory pain.
J. Leukocyte Biol. 64:214

- 7) Rafley M J., Harrison C.A., Alewood P., Jones A., Geczy C.L.
Isolation of the murine S100 protein MRP14 (14 kDa migration-inhibitory-factor related protein) from activated spleen cells : characterization of post-translational modifications and zinc binding.
Biochem. J. (1996) 316 285-293

- 8) Dale CS, Altier C, Cenac N, Giorgi R, Juliano MA, Juliano L, Zamponi GW, Vergnolle N.
Analgesic properties of S100A9 C-terminal domain: a mechanism dependent on calcium channel inhibition.
Fundam Clin Pharmacol. 2009 Aug, 23 (4) :427-38. Epub 2009 Jun 8.

- 9) Hobbs JA, May R, Tanousis K, McNeill E, Mathies M, Gebhardt C, Henderson R, Robinson MJ, Hogg N.
Myeloid cell function in MRP-14 (S100A9) null mice.
Mol Cell Biol. 2003 Apr;23(7):2564-76.

- 10) 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.
Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock.
Nat Med. 2007 Sep;13(9):1042-9. Epub 2007 Sep 2.

- 11) Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J.
S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules.
J Leukoc Biol. 2007 Jan;81(1):28-37. Epub 2006 Aug 30. Review.

- 12) 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.
Expression and role of myeloid-related protein-14 in clinical and experimental sepsis.
Am J Respir Crit Care Med. 2009 Dec 1;180(11):1098-106. Epub 2009 Sep 17.
- 13) Foell D, Frosch M, Sorg C, Roth J.
Phagocyte-specific calcium-binding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammation.
Clin Chim Acta. 2004 Jun;344(1-2):37-51. Review.
- 14) Toshihiko Hibino, Masakiyo Sakaguchi, Shoko Miyamoto, Mami Yamamoto, Akira Motoyama, Junichi Hosoi, Tadashi Shimokata, Tomonobu Ito, Ryoji Tsuboi, and Nam-ho Huh
S100A9 Is a Novel Ligand of EMMPRIN That Promotes Melanoma Metastasis
Published Online First 2012 Nov 7; 73:172-183
- 15) Sun Y, Lu Y, Engeland CG, Gordon SC, Sroussi HY.
The anti-oxidative, anti-inflammatory, and protective effect of S100A8 in endotoxemic mice.
Mol Immunol. 2013 Apr;53(4):443-9.
- 16) Sroussi HY, Lu Y, Villines D, Sun Y.
The down regulation of neutrophil oxidative metabolism by S100A8 and S100A9: implication of the protease-activated receptor-2.
Mol Immunol. 2012 Feb;50(1-2):42-8

- 17) Lee MJ, Lee JK, Choi JW, Lee CS, Sim JH, Cho CH, Lee KH, Cho IH, Chung MH, Kim HR, Ye SK.
Interleukin-6 induces S100A9 expression in colonic epithelial cells through STAT3 activation in experimental ulcerative colitis.
PLoS One. 2012;7(9):e38801.
- 18) Riva M, Källberg E, Björk P, Hancz D, Vogl T, Roth J, Ivars F, Leanderson T.
Induction of nuclear factor- κ B responses by the S100A9 protein is Toll-like receptor-4-dependent.
Immunology. 2012 Oct;137(2):172-82.
- 19) Ikemoto M, Murayama H, Itoh H, Totani M, Fujita M.
Intrinsic function of S100A8/A9 complex as an anti-inflammatory protein in liver injury induced by lipopolysaccharide in rats.
Clin Chim Acta. 2007 Feb;376(1-2):197-204.
- 20)湯浅 瑛介
ネクロシス細胞が誘発する炎症応答における DAMPs:S100A9 の役割、
特別問題研究、2009 年度
- 21)中村 美保
ネクロシスに対する生体の応答
修士論文、2008 年度
- 22)岩佐 卓哉
アポトーシス細胞の貪食におけるAnnexin I, IV の役割
卒業論文、2008 年度

VI Acknowledgement

本研究を行うにあたり、終始御教示、御教鞭賜りました小林芳郎教授ならびに、永田喜三郎准教授に深く感謝し、心より御礼申し上げます。

また、適切な助言や細やかなご指導を頂きました玉城豊先輩、心から感謝致します。そして、色々と支えてくださった研究室の皆さん、本当にありがとうございました。