

# ヒト好中球のアポトーシスに関する研究

竹下誠一郎、高林ふみ代、吉田直樹

Study for apoptosis of human neutrophils

## 1. はじめに

好中球の寿命は白血球の中で最も短く、健常人の末梢血から分離された好中球を *in vitro* で培養すると、約半数は 24 時間以内にアポトーシスの様式で死滅する<sup>1)</sup>。好中球におけるアポトーシスのシグナル伝達は、細胞表面の death domain である Fas 及び FasL を介する系 (Fas/FasL 系) と、Bcl-2 family や活性酸素 (reactive oxygen species, ROS) が関与するミトコンドリア系を介しており、最終的にカスパーゼが活性化されることによってアポトーシスが実行される<sup>2)</sup>。好中球の Bcl-2 family においては、アポトーシス抑制蛋白として A1、アポトーシス促進蛋白として Bax が存在し、両者の発現のバランスによってアポトーシスが調節されている<sup>3)</sup>。

リポポリサッカライド (lipopolysaccharide, LPS) はグラム陰性菌由来のエンドトキシン (endotoxin) であり、地球上で最も普遍的に存在する細菌由来の内毒素である。ヒトの好中球や単球に CD14 を介して結合し、種々の mediator の産生を促して宿主側の免疫反応や組織傷害を引き起こす。また、LPS は健常人の末梢血好中球を活性化させて自発的アポトーシスを抑制する<sup>4)</sup>。このメカニズムとして、細胞内におけるアポトーシス抑制因子である抗酸化物質の産生を増加させると報告されている<sup>5)</sup>。

今回の研究目的は、LPS が好中球のアポトーシスを抑制する現象を確認することと、そのメカニズムにおいて Bcl-2 family の A1 と Bax の発現バランスが関与するかどうかを検討することである。

## 2. 方法

### 1) アポトーシス細胞の検出

健常人の末梢血から 1 step polymorphs 溶液にて好中球を分離し、10%FBS 加 RPMI1640 に再浮遊した。LPS (*E. coli* O26, 最終濃度 100ng/ml) にて 1 時間の前刺激を行った後に、37°C で 0~48 時間培養した。培養した好中球を FITC 標識 Annexin V を用いて蛍光染色した後に flow cytometry 法で解析した。Annexin V 陽性細胞は、アポトーシス細胞として認識した。

### 2) Flow cytometry 法による細胞表面の Fas 発現の測定

分離した好中球  $1 \times 10^6$  個を 1%BSA 加 PBS によって洗浄後、PE 標識抗 human Fas mAb (clone UB2) にて氷上で 30 分間染色後、300 1 で再浮遊した。isotype control として、PE 標識 mouse IgG<sub>1</sub> を用いた。前方散乱と側方散乱の散布図より好中球にゲートをかけ、 $1 \times 10^4$  個の細胞の蛍光強度を測定した。なお、isotype control の 95 パーセントイル以上の蛍光強度の細胞を陽性細胞とした。

### 3) Flow cytometry 法による A1 及び Bax の細胞内発現の測定

分離した好中球  $1 \times 10^6$  個に 500 1 の 2% paraformaldehyde を加え、4°C で 15 分間の固定処理を行った。PBS で 2 回洗浄した後、500 1 の 0.05% Triton X-100 を加え、4°C で 10 分間の透過性処理を行った。PBS で 2 回洗浄した後、5% BSA にて室温下で 30 分間のブロッキング処理を行った後、再び PBS で 2 回洗浄し 200 1 に再浮遊した。1 次抗体として抗 human A1 mAb 3 1 または抗 human Bax

mAb 1 1 を加えて室温下で30 分間の染色を行った。PBS で2 回洗浄した後、2 次抗体としてそれぞれ FITC 標識抗 goat IgG Ab 1 1 または FITC 標識抗 mouse IgG Ab 1 1 を加えて室温下で30 分間の染色を行い、PBS で2 回洗浄後、300 1 で再浮遊した。negative control として2 次抗体のみで染色した好中球を用いた。FACSCalibur にて $1 \times 10^4$  個の細胞の FL-1 フィルターを介した蛍光強度を測定し、平均蛍光強度(mean fluorescence intensity, MFI) を算出した。解析には CellQuest™ software を使用した。

すべての測定及び解析には CellQuest™ software (Becton Dickinson) を使用した。また2 群間の有意差検定は Mann-Whitney U-test にて行い、 $P < 0.05$  を有意差ありとした。なお、結果は全て平均値±標準誤差(mean±SE) で示した。

### 3. 結果

#### 1) アポトーシス細胞の経時的出現率 (図1)

無刺激群では、培養 6 時間後から Annexin V 陽性(Annexin V<sup>+</sup>)細胞が増加し、培養 12 時間後には半数以上が Annexin V<sup>+</sup>細胞であった。一方、LPS 刺激(添加)群では Annexin V<sup>+</sup>細胞出現率の有意な低下が認められた。従って、LPS は正常好中球のアポトーシスを有意に抑制することが確認された。

#### 2) 好中球細胞表面の Fas 発現 (図2)

好中球細胞表面の Fas の発現は無刺激群と LPS 添加群では有意差を認めなかった。従って、LPS 刺激は、Fas 発現に影響を及ぼさないと判明した。

#### 3) 好中球細胞内における A1 及び Bax の発現 (図3)

好中球細胞内の Bax の発現は無刺激群と LPS 添加群では有意差を認めなかった。しかしながら、無刺激群の A1 の発現は、LPS 添加によって有意に増加した。従って、LPS はアポトーシス抑制蛋白である A1 の発現を抑制することが判明した。

### 4. 考察

今回の研究から、LPS は好中球のアポトーシスを有意に抑制させることが判明した。このメカニズムとして Fas を介する経路ではなく、Bcl-2 family の A1(アポトーシス抑制蛋白)の発現を増加させることが関与していることが示唆された。

好中球は本来アポトーシスに陥りやすい細胞であり、アポトーシス促進蛋白である Bax を豊富に発現していることが知られている。LPS は、アポトーシス抑制蛋白である A1 の発現を増加させ、ミトコンドリア系を介するシグナル伝達を抑制すると考えられる。また、アポトーシスの機序の1つとして、ミトコンドリア内のアポトーシス抑制蛋白とアポトーシス促進蛋白の発現バランスが重要である<sup>5)6)</sup>。つまり、好中球に対する LPS 刺激は、A1 の発現を低下させることによってミトコンドリア系におけるアポトーシスバランスを促進側へシフトさせることが示唆された。

敗血症などの重症感染症は、未だに致死率の高い疾患である。敗血症において、末梢血中の好中球のアポトーシスは延長し、活性酸素やプロテアーゼ等の酵素を過剰に産生することによって自己の組織傷害を引き起こす<sup>7)</sup>。従って、グラム陰性桿菌の敗血症の場合では、内毒素の LPS が好中球のアポトーシスを延長させて、その病態形成に深く関与していると考えられる。その分子メカニズムを解明することは、ヒトの重症感染症の病態解明や新たな治療法開発に寄与すると思われる。

#### 参考文献

1. Payne C M, Glasser L, Tischer ME, et al : Programmed cell death of the normal human neutrophil: an *in vitro* model of senescence. *Microsc Res Tech* 28 : 327-344, 1994
1. Homburg CHE, Roos D : Apoptosis of neutrophils. *Curr Opin Hematol* 3 : 94-99, 1996
2. Chuang PI, Yee E, Karsan A, et al : Al is a constitutive and inducible Bcl-2 homologue in mature human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 249 : 361-365, 1998
3. Hachiya O, Takeda Y, Miyata H, et al : Inhibition by bacterial lipopolysaccharide of spontaneous and TNF- $\alpha$ -induced human neutrophil apoptosis *in vitro*. *Microbiol Immunol* 39 : 715-723, 1995
4. Watson RWG, Rotstein OD, Jimenez M, et al : Augmented intracellular glutathione inhibits Fas-triggered apoptosis of activated human neutrophils. *Blood* 89 : 4175-4181, 1997
5. Dahlgren C, Karlsson A : Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Methods* 232 : 3-14, 1999
6. Kroemer G : The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 3 : 614-620, 1997
7. Owen CA, Campbell EJ :The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. *J Leukoc Biol* 65: 37-50, 1999

図1 アポトーシス細胞の出現率

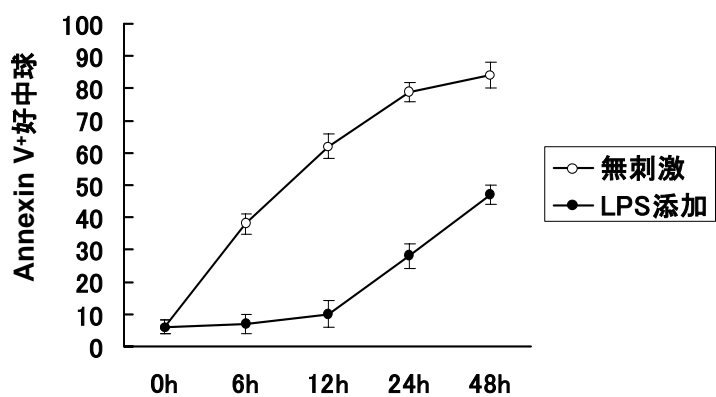


図2 好中球細胞表面のFAS陽性細胞の出現率

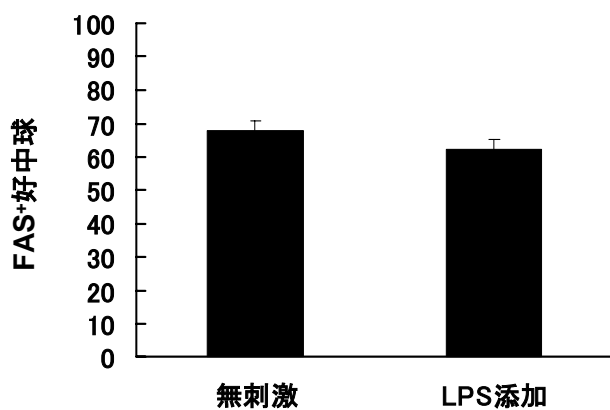


図3 好中球細胞内におけるA1及びBaxの発現

