

平成 21 年 3 月

松浦治代 学位論文審査要旨

主 査 渡 邊 達 生
副主査 難 波 栄 二
同 福 本 宗 嗣

主論文

Suppression of chemokine gene expression and production in LPS-stimulated macrophages by a 130 kDa glycoprotein from plerocercoids of *Spirometra erinaceieuropaei*

(マンソン裂頭条虫擬充尾虫由来の130 kDa糖タンパクによるLPS活性化マクロファージのケモカイン遺伝子発現および産生の抑制)

(著者：松浦治代、富奥あすみ、廣野聡子、蓼本早百合、福本宗嗣)

平成21年 Yonago Acta medica 掲載予定

学位論文要旨

Suppression of chemokine gene expression and production in LPS-stimulated macrophages by a 130 kDa glycoprotein from plerocercoids of *Spirometra erinaceieuropaei*

(マンソン裂頭条虫擬充尾虫由来の130 kDa糖タンパクによるLPS活性化マクロファージのケモカイン遺伝子発現および産生の抑制)

マンソン裂頭条虫擬充尾虫は孤虫症の原因として知られている。実験的にマウスに感染させた擬充尾虫の周囲に顕著な炎症反応は認められず、擬充尾虫は宿主の組織内で長期間生存可能である。今までの研究により、この寄生虫由来の排泄・分泌 (ES) 物質は、免疫抑制活性を有することが明らかにされている。本研究では、このES物質から精製した130 kDaの糖タンパクが、lipopolysaccharide (LPS) 活性化マウスマクロファージで誘導される regulated on activation normal T cell expressed and secreted (CCL5/RANTES)、macrophage inflammatory protein 2 (CXCL2/MIP-2)、interferon (IFN)-inducible protein 10 kDa (CXCL10/IP-10)の3ケモカインの遺伝子発現および産生に及ぼす影響について検討した。

方法

ゴールデンハムスターの皮下組織からマンソン裂頭条虫擬充尾虫を無菌的に回収し、その培養上清を濃縮したものを未精製ES物質とした。未精製ES物質をイオン交換クロマトグラフィーで分画し、さらに2種類のアガロースレクチンカラムを用いて順次溶出し、LPS活性化マクロファージのNO産生を抑制する130 kDaの糖タンパク (ES130) が得られた。

C57/BL6マウスの腹腔内にチオグリコレートを投与し、3日後に腹腔マクロファージを回収した。腹腔マクロファージとRAW 264.7細胞に未精製ES物質 (0.5-5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) またはES130 (10-200 ng/mL) を添加し24時間培養した後、LPS (100 ng/mL) で刺激し、その3時間後のRNAおよび8時間後と24時間後の培養上清とRNAを回収した。得られたRNAを逆転写 (RT) 後、各遺伝子の定量化に最適なPCRのサイクル数を決定した。ケモカインの遺伝子発現は、RT-PCR法で増幅した産物を電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色、撮影したゲルを解析ソフト image-J を用いて定量化し、 β -actin の発現量で補正した。培養上清中のケモカインの濃度は、ELISA kit を用いて測定した。

結 果

LPS刺激3時間後のRAW 267.4細胞のinterleukin (IL)-1 β 、tumor necrosis factor (TNF)- α 、cyclooxygenase (COX)-2およびRANTES、MIP-2、IP-10遺伝子の発現は、未精製ES物質 (5 μ g/mL) またはES130 (100 ng/mL) によって抑制された。LPS刺激3時間後の腹腔マクロファージでは、RANTESとIP-10の遺伝子発現は、ES130を10-100 ng/mL添加すると濃度依存的に抑制され、MIP-2は微量 (10 ng/mL) のES130添加で約50%抑制された。

LPS刺激8時間後の腹腔マクロファージでは、未精製ES物質 (5 μ g/mL) とES130 (100、200 ng/mL) のいずれの添加においても、MIP-2では約80%、IP-10では約50%の遺伝子発現が抑制され、培養上清中のMIP-2の濃度は、遺伝子発現の抑制と同様にES130によって顕著に抑制され、IP-10も有意に抑制された。LPS刺激8時間後と24時間後のRANTES遺伝子の発現はES130の添加によって抑制されなかったが、RANTESケモカインの産生は有意に抑制され、それぞれのケモカインで抑制のパターンが異なっていた。

考 察

今回検討したケモカインは、白血球の遊走活性を有する因子である。RANTESは、好酸球、好塩基球、単球、リンパ球、NK細胞に作用する。MIP-2は強力な好中球遊走活性をもち、IP-10は活性化T細胞、主にヘルパーT細胞1型の遊走活性に関与する。

未精製ES物質あるいはES130の添加により、LPS活性化マクロファージのMIP-2およびIP-10のmRNA発現とケモカイン産生は抑制された。RANTESの遺伝子発現はLPS刺激3時間後には抑制されたが、8時間後と24時間後の遺伝子発現は抑制されなかった。しかし、RANTESケモカインの産生は抑制されており、ES130はRANTESケモカインの翻訳を阻害する可能性が示唆された。

擬充尾虫のES物質はextracellular signal-regulated kinases (ERK) とp38 mitogen activated protein kinase (MAPK) のリン酸化を阻害することが報告されており、この阻害がMIP-2およびRANTESのmRNA発現を抑制したと考えられた。LPS処理したマクロファージでのIP-10の発現は、アダプター分子であるmyeloid differentiation factor 88 (MyD88) 非依存性経路で産生されるIFN- β により誘導されることが報告されている。LPS活性化マクロファージでのIFN- β の遺伝子発現は、未精製ES物質で抑制されることが確認されており、ES130によるIP-10の遺伝子発現の抑制はこのような機序が考えられる。

擬充尾虫が分泌するES130は3つのケモカインの産生を異なる機序によって抑制し、虫体周囲の炎症反応や免疫応答を抑制していると推察された。

結 論

マンソン裂頭条虫擬充尾虫の分泌する物質から、130 kDaの糖タンパク (ES130) を精製し、ES130はLPS活性化マクロファージのRANTES、MIP-2、IP-10ケモカインの産生を抑制することが明らかになり、虫体周囲の炎症反応や免疫応答を抑制していることが示唆された。