

09670056  
基盤研究(C)(2)

単球のマクロファージへの分化誘導  
に関する初期カルシウム信号の解析

# 単球のマクロファージへの分化誘導 に関する初期カルシウム信号の解析

(課題番号 09670056)

平成9年度～平成10年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))

研究成果報告書

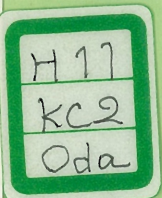


平成11年12月

研究代表者 尾田正二  
(東京女子医科大学医学部助手)

東京女子医科大学医学部助手  
尾田正二

平成11年12月



単球のマクロファージへの分化誘導  
に関わる初期カルシウム信号の解析

(課題番号 09670056)

平成9年度～平成10年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))

研究成果報告書

平成11年12月

研究代表者 尾田正二

(東京女子医科大学医学部助手)

## はしがき

我々の研究室では、長年に亘って、ヒトナチュラルキラー (natural killer; NK) 細胞がその標的細胞である腫瘍細胞を攻撃し細胞傷害を与える機構を解析してきた。その基本的技法は、1) ヒト末梢血からNK細胞を多量に純化すること、2) 蛍光顕微鏡とカルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 画像解析装置を用いて、個々の細胞で細胞死の過程を形態的および細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) 変化を指標として経時的にとらえること、3) 細胞死を誘導するシグナルを伝達する細胞表面分子の検出・強制発現・抗体による機能阻害実験などである。結果として、NK細胞は Fas 抗原の発現が高い標的腫瘍細胞株には圧倒的にアポトーシス (DNAの断片化、細胞の断片化) を誘導し、低 Fas 発現細胞には即時的な細胞膜傷害によるネクロシスを誘導すること、NK細胞はFasリガンド (FasL) を発現しており、アポトーシス誘導に FasL-Fas が重要な役割を果たしていることを証明した (Journal of Immunology, 1995, 1996, Journal of Physiology, 1996)。次には死んだ細胞のマクロファージによる貪食・処理機構が課題となる。上記の実験の過程で、死に至るいずれの細胞でも細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) の上昇とともに  $\text{Ca}^{2+}$  指示蛍光色素 (fura-2) の漏出が見られたが、面白いことに、マクロファージに分化誘導できる細胞株 (U937, HL-60) に限ってNK細胞に攻撃された細胞の近傍の (攻撃されない) 細胞が一過性の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇を示すことを見いだした。即ち、死細胞から漏出する物質が刺激となって  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  が上昇することが示唆された。そこで我々は、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇が単球の遊走・浸潤やマクロファージへ

の初期分化誘導の引き金になるのではないかと考えた。

単球 (monocyte) /マクロファージ (macrophage) 系は多機能性ファゴサイト (食細胞) であり, 炎症刺激を受容体で感受して遊走, 接着, 食作用, 免疫細胞活性化, 細胞傷害性を発揮する。単球は循環血から組織・器官に浸潤しマクロファージに分化する。この機能を遂行するため, 単球/マクロファージは細胞表面に種々の受容体 (レセプター: R) を発現している。それらのレセプターには, IgG や IgE などの抗体に対する  $Fc\gamma$  レセプター, 抗原提示細胞を認識する MHC class I および II, 補体に対する C3 レセプター, マンノース/フラクトースレセプター, 糖蛋白質に対する CD14, IFN- $\gamma$  や TNF- $\beta$  などのサイトカインに対するレセプター, ATP や UTP に対するレセプターなどがある。 $Ca^{2+}$  は種々の細胞系で受容体刺激-反応間を仲介する細胞内信号であることがよく知られているが, 単/マクロファージ系においても, 上記の  $Fc\gamma$  レセプターや ATPレセプターを介する刺激に際して  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が起こることが報告されている。

本研究は, これまでの我々の実験の技法を基盤として,

- 1) 単球/マクロファージに対する種々の刺激因子や, 死細胞から漏出する物質を投与した際に  $[Ca^{2+}]_i$  増加反応が起こるか否かを記録・確認すること,
- 2)  $[Ca^{2+}]_i$  上昇を指標として関連受容体分子を生理学的に同定すること,
- 3)  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇と単球/マクロファージの活性化, 分化誘導との関連を調べること,

を目的として計画された。実際には以下の実験・研究を行った。

1) 培養皿中でヒトNK細胞によって傷害される腫瘍細胞の周辺にヒト単球を散布し、腫瘍細胞が傷害されつつあるときに単球の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇がおこることを見だし、このとき傷害細胞から漏出する物質のうちATPがメッセンジャーとなってATPレセプターを介して単球に $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を誘発することを証明し、論文として発表した(Immunology, 1999)。

2) 上記の単球/マクロファージ受容体の中で、CD14は細菌内毒素の成分であるリポポリサッカライド(LPS)を認識する極めて重要なレセプターである。本研究ではCD14レセプターに焦点を合わせ、ヒト単球のCD14を抗CD14抗体で刺激したときに $[Ca^{2+}]_i$ 上昇がおこること、LPSのみの投与では $[Ca^{2+}]_i$ 上昇がおこらないことを明らかにした。さらに、単球をマクロファージコロニー刺激因子(Macrophage Colony Stimulating Factor: M-CSF)存在下で培養し、マクロファージに分化していく過程で、抗CD14抗体による $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応が増強し、LPSに対しても $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応を示す細胞が出現することを見いだした。即ち、単球からマクロファージへの分化に従ってCD14の発現が増強するとともに、そのシグナル伝達効率あるいは伝達様式が変化することことを示唆する結果を得た。

本研究は今後の研究の発展に繋がる有用な実験データを提供したことで、成果をあげたと考える。

## 研究組織，研究経費

### 研究組織

研究代表者：尾田正二（東京女子医科大学医学部助手）

### 研究経費

平成9年度	1,800	千円
平成10年度	1,000	千円
計	2,800	千円

### 研究協力者

宮崎俊一（東京女子医科大学医学部第二生理学教授）

押味蓉子（元東京女子医科大学第二生理学助手）

注）本研究の前段階の研究は，宮崎俊一教授の指導のもとに押味蓉子助手，尾田正二助手らが行い，当該研究費の申請は押味が行ったが，押味が退職したため，本研究は尾田が研究代表者になって実施された。

# 研究発表

## I. 発表論文

### 1. 学会誌等

#### 1) Oshimi, Y., Miyazaki, S. and Oda, S.:

ATP-induced  $\text{Ca}^{2+}$  response mediated by  $\text{P}_{2\text{U}}$  and  $\text{P}_{2\text{Y}}$  purinoceptors in human macrophages: signaling from dying cells to macrophages. *Immunology*, 98: 220-227, 1999.

#### 2) Oshimi, Y. and Miyazaki, S. :

Human monocytes and macrophages show  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  rises in response to ATP and antibody against the CD14 receptor. *Jpn. J. Physiol.* 48: Suppl., S43, 1998.

## II. 口頭発表

### 1. 学会発表

#### 1) 押味蓉子, 宮崎俊一:

ヒト末梢血中の単球, マクロファージはATP, 抗CD14抗体で著明な細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 増加を示す  
第75回日本生理学会大会 金沢市, 金沢大, 1998, 3月

### 2. シンポジウム発表

#### 1) Miyazaki, S., Oshimi, Y., Honda, Y. and Oda, S. :

$\text{Ca}^{2+}$  responses in Fas-mediated apoptosis and human natural killer cell cytotoxicity.

Symposium on "*Pathophysiology of  $\text{Ca}^{2+}$  Signaling*".

3rd Internatl. Congr. Pathophysiol. Abstr. P133 1998. 6.28-7.3

Lahti, Finland

# 研 究 成 果

## 1. ヒトマクロファージにおけるATPによって誘発される

$P_{2U}$ ,  $P_{2Y}$ レセプターを介する $Ca^{2+}$ 増加反応:

死につつある細胞からのマクロファージへのシグナル伝達  
マクロファージはバクテリアや死んだ細胞を貪食(phagocytosis)して処理する機能を果たすが, 死んでいく細胞をどのように認識して遊走・接着・貪食に至るかは興味深い問題である. 我々は, 溶解していく細胞から漏出してマクロファージを刺激する物質として, ATP を考え, それを示唆する以下のような結果を得た.

### 1) 細胞の分離

健常人の末梢血からFicoll-Conray遠心分離法で単核球細胞を得, これを培養皿に散布して皿の底面に付着する細胞を集めた. このうち抗CD3抗体でコーティングしたビーズに付着した細胞が Tリンパ球であり, 付着しなかった細胞の85%が単球であることが確認された. 単球を1~2日培養し, この間にマクロファージに分化した細胞を用いた. ヒトナチュラルキラー (natural killer; NK) 細胞は単核球細胞をParcoll 密度勾配遠心分離法で分離して得た<sup>1,2)</sup>. NK細胞の標的細胞として, Fasレセプターを発現していない腫瘍細胞株 K562 (慢性骨髄性白血病由来) を用いた. 個々のマクロファージでの細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) は, 細胞に予め $Ca^{2+}$ 指示蛍光色素Fura-2-AMをとりこませ, 波長340nmの紫外線で励起された緑色蛍光の強度上昇を高感度カメラで捉え, イメージプロセッサに導いて $Ca^{2+}$ 画像解析を行って測定した<sup>1-3)</sup>.



## 2) NK細胞に攻撃された細胞からマクロファージへの信号伝達

Fura-2-AMをとりこませたマクロファージとK562細胞を同一培養皿に散布し、これにNK細胞を加えた。1個のNK細胞は1個のK562細胞に接着・攻撃した。攻撃された細胞は、NK細胞から分泌されるパーフォリンが細胞膜に小孔を形成するので、細胞外からの $\text{Ca}^{2+}$ 流入により $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が一過性に著明に増加し、ついでFura-2が細胞内から漏出して蛍光強度が減少した。K562はこのように細胞膜の傷害によりネクロシスに陥る<sup>1,2)</sup>。この死んでいく途中のK562細胞に隣接した10数個のマクロファージで $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が一過性に上昇し(持続3~4分)、マクロファージが刺激を受けることが示された。

## 3) ATP誘発性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加反応

マクロファージにATPを投与したときの $\text{Ca}^{2+}$ 増加反応を記録し、反応する細胞の割合と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加のピーク値で効果を判定した。マクロファージは、ATP 0.1~100 $\mu\text{M}$ の範囲で用量依存性に $\text{Ca}^{2+}$ 増加反応を示した。反応は一過性で持続約5分であった。ATP誘発性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加反応は、 $\text{Ca}^{2+}$ を除いた細胞外液中では著明に小さいことから、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加は主に細胞外からの $\text{Ca}^{2+}$ 流入によることが示された。一過性のATP誘発性 $\text{Ca}^{2+}$ 増加反応が起こった後、より高濃度のATPを再び投与しても、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加は著明に小さく、脱感作用(desensitization)があることが分かった。

## 4) ATPアゴニスト、アンタゴニストの作用

ATPのレセプターには $\text{P}_{2X}$ 、 $\text{P}_{2Y}$ 、 $\text{P}_{2U}$ 、 $\text{P}_{2Z}$ のタイプがある<sup>4,5)</sup>。レセプタータイプを同定するために、各タイプのアゴニスト、

アンタゴニストの作用<sup>4,5)</sup>を調べた。P<sub>2U</sub>レセプターのアゴニストである UTP は ATP よりもより効果的にCa<sup>2+</sup>増加反応を示した。P<sub>2Y</sub>レセプターのアゴニストである2-chloro-ATP は、ATPより弱いCa<sup>2+</sup>増加反応を誘発した。P<sub>2Z</sub>レセプターのアゴニストである BzATP もCa<sup>2+</sup>増加反応を誘発したが、反応のタイプはばらついており、持続性の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>増加も起こった。P<sub>2Y</sub>およびP<sub>2U</sub>レセプターの阻害剤である Reactive Blue 2 は ATP 誘発性Ca<sup>2+</sup>増加反応を有意に抑制し、一方P<sub>2X</sub>レセプターアンタゴニスト PPADS および P<sub>2Z</sub>レセプターアンタゴニスト oxidized ATP は抑制を示さなかった。

#### 5) 細胞漏出物質による[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>増加反応

腫瘍細胞株MOLT-4を低浸透圧液中で溶解してその上澄をマクロファージに投与すると、ATP誘発性[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>増加反応と類似の反応が誘発された。この反応は、Reactive Blue 2 によって ATP誘発性[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>増加反応と同程度に抑制され、PPADS では抑制されなかった。また ATP と溶解細胞上澄液を同一標本に間をおいて二回投与すると二回目の反応が小さくなり、desensitization が起こることから、両者の刺激が干渉することが示された。

上記より、死にかけた細胞から漏出した ATP がマクロファージに拡散して作用し、それが刺激となって、P<sub>2U</sub>、P<sub>2Y</sub>レセプターを介してマクロファージの[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>増加反応を誘発し、遊走・貧食を促すという考えを支持する結果が得られた。

(参考文献)

- 1) Oshimi, Y., Oshimi, K. & Miyazaki, S. (1996) Necrosis and apoptosis associated with distinct  $\text{Ca}^{2+}$  response patterns in target cells attacked by human natural killer cells. *J. Physiol.*, **495.2**: 319-329.
- 2) Honda, Y. & Miyazaki, S. (1996) Distinct  $\text{Ca}^{2+}$  response patterns in human natural killer cells during induction of necrosis or apoptosis of target cells. *Cell Calcium* **19**: 297-306.
- 3) Oshimi, Y., Oda, S., Honda, Y., Nagata, S. & Miyazaki, S. (1996) Involvement of Fas ligand and Fas-mediated pathway in the cytotoxicity of human natural killer cells. *J. Immunol.* **157**: 2909-2915.
- 4) Ralevic, V. & Burnstock, G. (1996) Relative contribution of  $\text{P}_{2\text{U}}$ - and  $\text{P}_{2\text{Y}}$ -purinoceptors to endothelium-dependent vasodilatation in the hamster isolated mesenteric arterial bed. *Br. J. Pharmacol.* **117** : 1797-1804.
- 5) Falzoni, S., Munerati, M., Ferrari, D., Spisani, S., Moretti, S. & Di Virgilio, F. (1995) The purinergic  $\text{P}_{2\text{Z}}$  receptor of human macrophage cells. Characterization and possible physiological role. *J. Clin. Invest.* **95** : 1207-1216.

## 2. ヒトマクロファージの CD14 レセプターを介する $\text{Ca}^{2+}$

### 増加反応と LPS 誘発性 $\text{Ca}^{2+}$ 増加反応：マクロファージ の *in vitro* 分化過程における変化

単球/マクロファージに発現している CD14 レセプターは、グラム陰性バクテリアの外毒素である lipopolysaccharide (LPS) を認識する膜蛋白質であり、LPS と CD14 との結合により、サイトカインの産生<sup>1,2)</sup>、NOの産生<sup>3)</sup>、食作用・飲作用など<sup>4,5)</sup>の炎症反応を誘導する。CD14 は膜貫通ドメインを有さず、細胞膜中で glycosylphosphatidylinositol でアンカーされた糖蛋白質であり<sup>6)</sup>、それが経膜的なシグナル伝達を行うか否かが注目される。しかし、ヒト単球において抗CD14 抗体プラス二次抗体で CD14 を刺激した際に  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇が起こるという報告が 1 つあるのみで<sup>7)</sup>、その報告でも細胞懸濁液を用いて細胞集団として  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  を測定しているに過ぎない。また LPS 投与についても、 $\text{Ca}^{2+}$  増加が起こるという報告と起こらないという報告がある。本研究では、ヒトマクロファージを抗CD14 抗体で刺激した場合、LPS で刺激した場合の  $\text{Ca}^{2+}$  増加反応の有無を個々の細胞で調べた。またマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) 存在下で単球からマクロファージを分化させ、7～10 日間培養する間に起こる  $\text{Ca}^{2+}$  増加反応の変化を調べた。この実験により以下の結果を得た。

#### 1) 抗 CD14 抗体による刺激に対する $\text{Ca}^{2+}$ 増加反応

前述の方法でヒト単球を分離し、M-CSF 非存在下で 1～2 日培養中の単球/マクロファージを抗CD14 抗体 (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) で刺激した。多くの細胞では、持続約 5 分の一過性の  $\text{Ca}^{2+}$  増加反応が記録された。反応した約半分の細胞では、振幅は小さいが

反復するCa<sup>2+</sup>増加が見られた。このCa<sup>2+</sup>増加反応は、Ca<sup>2+</sup>除去液中では振幅が約1/5に減少することから、主に細胞外からのCa<sup>2+</sup>流入によって起こることが示された。次にLPSを種々の濃度（0.1 ng/ml～100 μg/ml）で投与したが、有意の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇は観察されなかった。LPSとCD14の結合は、血漿中の蛋白質LPS-binding protein（LBP）が仲介して起こると考えられており<sup>1,2)</sup>、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇に至るシグナル伝達にはLPSの関与が必要なのかも知れない。

## 2) マクロファージ分化過程におけるCa<sup>2+</sup>増加反応の増強

分離して得た単球にM-CSFを作用させると、一部の細胞でCa<sup>2+</sup>増加反応が記録された。[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇は単球からマクロファージへの分化開始のシグナルになっている可能性がある。

M-CSF存在下で細胞を7～10日間培養し、適時細胞を取りだして抗CD14抗体およびLPSに対するCa<sup>2+</sup>増加反応を記録した。抗CD14に対するCa<sup>2+</sup>増加反応は、日を追ってより多くの細胞で起こるようになり、反応の振幅が増大した。また、反復性の大きなCa<sup>2+</sup>増加反応（Ca<sup>2+</sup>オシレーション）が記録された。培養によりCD14の発現が増強するか、シグナル伝達の効率が高まる可能性が示唆される。また培養により、LPSに対してCa<sup>2+</sup>増加反応を示す細胞が観察され、その反応はやはり比較的大きく、Ca<sup>2+</sup>オシレーションを示す細胞もあった。マクロファージの分化により、LPS/CD14のシグナル伝達機構が発達する可能性が示唆される。

本実験により、CD14を介して[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇がおこること、マクロファージの分化過程でその反応が増強すること、LPSのみではCa<sup>2+</sup>増加

反応はおこらないが，分化によりシグナル伝達が起こりうることが明らかにされた．今後の研究に有用な示唆を与えるものと考えられる．なお論文は投稿準備中である．

(参考文献)

- 1) Ziegler-Heitbrock, H.W.L. & Ulevitch, R.J. (1993) CD14: Cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol. Today*, **14** : 121-125.
- 2) Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, O.S., Ulevitch, R.J. & Moathisn, J.C. (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **249** : 1431-1433.
- 3) Schroeder, R.A., dela Torre, A. & Kuo, P.C. (1997) CD14-dependent mechanism for endotoxin-mediated nitric oxide synthesis in murine macrophages. *Am. J. Physiol.* **273** : C1030-1039.
- 4) Devitt, A., Moffatt, O.D., Raykundalia, C., Capra, J.D., Simmons, D.L. & Gregory, C.D. (1998) Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* **392** : 505-509.
- 5) Peppelenbosch, M.P., DeSmedt, M., ten Hove, T., van Deventer, S.J. & Grooten, J. 1999. Lipopolysaccharide regulates macrophage fluid phase pinocytosis via CD14-dependent and CD-14-independent pathways. *Blood* **93** : 4011-4018.
- 6) Simmons, D.L., Tan, S., Teren, D.G., Nicholson, A. & Seed, B. (1989) Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein. *Blood* **73** : 284-289.
- 7) Lund-Johansen, F., Olweus, J., Aarli, A. & Bjerknes, R. (1990) Signal transduction in human monocytes and granulocytes through the PI-linked antigen CD14. *FEBS Lett.* **273** : 55-58.