

学位論文の要旨

三 重 大 学

所 属	甲 三重大学大学院医学系研究科 生命医科学専攻 病態制御医学講座 造血病態内科学分野	氏 名	伊野 和子
<p>主論文の題名</p> <p>Monocytes Infiltrate the Pancreas via the MCP-1/CCR2 Pathway and Differentiate into Stellate Cells</p> <p>主論文の要旨</p> <p>目的：近年、末梢血単球の多分化能が明らかにされつつある。我々はこれまでに末梢血単球が肝傷害時に重要な役割を果たす肝星細胞へ分化することを報告してきた。膵臓においても膵星細胞の存在は示されているが、その起源は未だ不明である。今回、膵星細胞の起源の解明を目的に、enhanced green fluorescent protein (EGFP)トランスジェニックマウスの造血細胞を移植して骨髄を再構築した C57BL/6J-Ly5.1 マウスに四塩化炭素(CCl₄)を腹腔内投与する実験系を用いて、(1)傷害膵に出現する膵星細胞が造血細胞由来であるのか、(2)造血細胞がどのような機序で膵臓内に侵入するのかについて検討を行った。</p> <p>方法：EGFP マウスの造血幹細胞を含む分画(CD34⁻c-kit⁺Sca-1⁺Lineage⁻細胞)の細胞を、FACS Aria を用いて single cell sorting し、9.5 Gy 放射線照射を行った C57BL/6J-Ly5.1 マウスに移植することで、キメラマウスを作成した。移植 2 ヶ月後に生着を確認し、高い生着率を示したマウスに対し、週 2 回 12 週間 CCl₄ の腹腔内投与を行った。CCl₄ 傷害 C57BL/6J-Ly5.1 マウスに EGFP マウス由来単球を輸注するモデルも作成した。マウスから膵臓を取り出し、4% paraformaldehyde で固定後、凍結標本を作製し、蛍光免疫組織染色を行った。膵臓内での angiotensinogen と monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)の産生を reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)法で、造血細胞における angiotensin II type 1 receptor (AT1R)と C-C chemokine receptor 2 (CCR2)の発現を RT-PCR 法と flow cytometry 法で解析した。AT1R antagonist で CCR2 antagonist でもある irbesartan や CCR2 に特異的な antagonist である RS504393 が、in vitro での単球の MCP-1 への走化性や CCl₄ 傷害マウスにおける膵星細胞の出現を抑制するかについても検討した。</p> <p>結果と考察：傷害膵には EGFP 陽性 CD45 陰性の造血細胞に由来する非造血細胞の存在が確認された。これらの細胞は、膵星細胞で発現が認められる vimentin、desmin、glial fibrillary acidic protein (GFAP)、procollagen-I、α-smooth muscle actin を発現しており、CCl₄による傷害時に</p>			

脾臓内に出現する脾星細胞は造血細胞由来と考えられた。CCl₄ 傷害 C57BL/6J-Ly5.1 マウスに EGFP マウス由来単球を輸注したところ、EGFP 陽性 CD45 陰性 GFAP 陽性の脾星細胞が確認された。しかし、EGFP マウスから分離した単球除去末梢血液細胞を輸注したマウスでは EGFP 陽性脾星細胞は確認されなかった。以上より、末梢血単球が CCl₄ による傷害時に脾星細胞に分化すると考えられた。

次に、末梢血単球の脾臓内への侵入機序に関して検討を行った。傷害脾では、angiotensinogen と MCP-1 の産生が亢進し、末梢血単球は AT1R と CCR2 を発現していた。そこで、これら受容体の阻害剤(irbesartan と RS504393)を用いて、単球の脾臓内侵入および単球由来の脾星細胞の出現が抑制されるかどうかを検討した。In vitro の系で、マウス単球は MCP-1 に対して濃度依存性に走化性を示したが、angiotensin II に対しては走化性を示さなかった。Irbesartan 添加により MCP-1 に対する単球の走化性は濃度依存的に抑制され、RS504393 添加によっても同様の結果が得られた。EGFP マウス由来骨髄細胞を移植したキメラマウスに CCl₄ 傷害を与える系において、一群には通常の餌を、他群には irbesartan を含んだ餌を与えた。両群間で脾臓内に侵入する好中球、B 細胞、T 細胞の数に差はなかったが、F4/80 陽性単球は irbesartan 投与群で減少し、特に CCR2 陽性単球が有意に減少していた。EGFP 陽性 CD45 陰性 GFAP 陽性の脾星細胞も irbesartan 投与群で有意に減少し、RS504393 を用いた実験においても、同様の脾星細胞は有意に減少していた。以上より、末梢血単球が脾臓へ侵入する際には MCP-1/CCR2 経路が重要であると考えられた。

結論：CCl₄ での傷害時には、末梢血単球は MCP-1/CCR2 経路を介して傷害脾へ侵入し、脾星細胞へ分化しうることを示された。