

アログラフト炎症因子 (AIF)-1の炎症反応における機能の解明

綿野 敬子 [北海道大学大学院医学研究科/博士課程]

背景・目的

慢性期に移植臓器に局限して生じる動脈硬化症は、ドナー臓器とレシピエントの炎症細胞の間で誘導される複雑な炎症反応の結果形成され、再移植の重要な規定因子である。アログラフト炎症因子-1 (AIF-1) はラット異所性心移植モデルにおいて同定された分子で慢性拒絶心で発現が亢進する。アロ移植心冠動脈周囲浸潤マクロファージ (Mφ) に発現され、IFN- γ によって制御される。実験的自己免疫性脳脊髄炎・神経炎などの病巣に浸潤するMφ系細胞にも発現が亢進している。従って移植免疫に限らず広範な病態の形成に関与する分子であると考えられた。本研究の目的はAIF-1の機能を明らかにすることである。

内容・方法

現在までAIF-1は、主にラットを用いて解析されてきたが、免疫系に関与する分子の解明は、遺伝的背景がより明確なマウスを用いる方が有利である。マウスAIF-1 cDNAの塩基配列は、ラットAIF-1の配列をもとにBALB/cマウスの脾臓cDNAライブラリーから、5'-RACE・3'-RACE法で同定した。得られた塩基配列からリコンビナント蛋白を作成し、フロインド完全アジュバントとともにラットを免疫し、2週後、腸骨リンパ節を用いて、常法に従い抗AIF-1単クローン抗体を産生するハイブリドーマを樹立した。得られた単クローン抗体を用いて正常マウス臓器におけるAIF-1の発現を解析した。次に単球/Mφ系細胞におけるAIF-1の機能を検討する目的で、AIF-1 cDNAをサイトメガロウイルスプロモーターをもつベクターに挿入して、マウスMφ系細胞株、RAW 264.7に導入し、恒常的にAIF-1を強発現する安定形質細胞株 (#182 < #24 = #203) を樹立した。コントロールにはベクターのみを導入したmockとwild-type (wt) をおいた。これら5種類の細胞株を大腸菌由来のリポポリサッカライド (LPS) 1 μ g/ml で24時間刺激し、各種サイトカインの転写・発現をRT-PCRと培養上清のELISA法で比較した。

結果・成果

マウスAIF-1 cDNAは、全長598bp、コード領域は444bp、147アミノ酸長で、推定分子量は16,910であった (DDBJ accession No. AB013745)。PKA, PKC, カゼインキナーゼIIのリン酸化コンセンサス配列や、Ca²⁺結合蛋白に共通する

EF hand様のドメインを1個保有していた。データベース検索から、マウスAIF-1は主要組織適合抗原複合体 (MHC) class III領域に座位することが判明した。現在まで報告されている様々な生物のAIF-1を比較すると、AIF-1の塩基配列は種の境界を超えて高度に保存されていた。AIF-1の発現は、正常マウスにおいては精巣に高度、脾臓・リンパ節・肝臓・胸腺などのリンパ系臓器に軽度から中等度、認められた。精巣においてはgerm cellが、脾臓では赤脾髄のMφ系細胞がAIF-1を発現していた。AIF-1過剰発現細胞株は、コントロール細胞と比較して、未刺激の状態でも扁平で接着性に富む性格を示し、LPS刺激後この傾向はより顕著となった。次に、AIF-1過剰発現細胞株を一種選択し (#24)、mockとともに各種サイトカインの発現をRT-PCRで検索した。LPS活性化後、#24のみでIL-6, IL-10, IL-12p40の転写が亢進していた。一方、IL-1 α , TNF- α , TNF- β , TGF- β 1, Mac-1, tissue factorの発現は、活性化の有無にかかわらず、#24, mock両細胞間で差は認められなかった。サイトカイン産生が蛋白レベルでも上昇していることを確認するために、3種のAIF-1過剰発現細胞株とコントロール (mock, wt) を同様に刺激し、ELISA法で定量した。コントロールと比しAIF-1過剰発現細胞株では、3種いずれもIL-6, IL-10, IL-12p40の産生量が有意に上昇していた。一方、活性型IL-12p70の発現は、いずれの細胞でも見られなかった。

今後の展望

今回の結果から、AIF-1は種の境界を超えて高度に保存され、マウスにおいてはMHC class III領域に座位していることが明らかになった。この事はAIF-1が免疫系に関与する重要な分子である可能性を示唆する。正常マウスにおいても、AIF-1は精巣とリンパ系臓器において発現されていたことから、AIF-1は生体の恒常性維持にも機能している可能性が考えられた。AIF-1は、単球/Mφ系細胞のサイトカイン産生能を修飾することにより、慢性拒絶移植片の動脈硬化やその他の炎症性疾患の進展を規定する可能性が示された。今後AIF-1発現の制御に基づく、これらの疾患の新しい治療法が開発されることが期待される。