

氏 名 ・ (本籍)	山内 由美子 (秋田県)
専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	医博甲第 923 号
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	The effect of hepatocyte growth factor on secretory functions in human eosinophils (肝細胞増殖因子(HGF)のヒト好酸球分泌能への影響)
論文審査委員	(主査) 教授 高橋 直人 (副査) 教授 南谷 佳宏 教授 美作 宗太郎

学位論文内容要旨

The effect of hepatocyte growth factor on secretory functions in human eosinophils
(肝細胞増殖因子(HGF)のヒト好酸球分泌能への影響)

申請者氏名 山内 由美子

研究目的

肝細胞増殖因子(HGF)は、もともと成熟した肝細胞の強力な分裂促進因子として発見されたが、近年では炎症性および免疫応答における恒常性メディエーターとして知られている。

これまでの報告から、HGFはアレルギー性気道炎症を抑制し、多くの器官で様々な疾患において線維化およびリモデリングを抑制することがわかっている。しかし、HGFが好酸球による気道リモデリングに関連する成長因子を産生することを阻害するかどうかは検討されていない。

今回 HGF が好酸球からの TGF- β および VEGF の分泌を阻害するかどうか検討し、さらに特定のタイプの好酸球分泌様式 (piecemeal degranulation および cytolysis) に対する HGF の効果を研究した。

研究方法

末梢血から CD16 negative selection 法により高純度分離したヒト好酸球を用いた。Growth Factor の産生は HGF で前処理後、IL-5 で刺激し、TGF- β および VEGF 産生は ELISA 法で測定した。細胞内の顆粒の形態学的変化を確認するため好酸球を HGF で前処理し IL-5 で刺激後、透過型電子顕微鏡で観察し、画像的に空胞化顆粒の割合を定量化した。細胞内からの TGF- β 放出は、抗 TGF- β 抗体を用いて細胞内を染色し、Flow cytometry で測定した。cytolysis の本態である ETosis については固相化 IgG および PMA で刺激後、細胞非透過性 DNA 染色剤の SYTOX で染色し fluorometer で定量し蛍光顕微鏡で観察した。活性酸素産生は APF を使用し、蛍光強度を fluorometer で測定した。結果は統計学的に解析した。

研究成績

ヒト末梢血分離好酸球を比較的高濃度の IL-5 で刺激することによって、喘息の気道リモデリングに関与する増殖因子として重要な TGF- β と VEGF の放出を誘導し、これらの上清中の濃度を検討した。いずれの増殖因子も同様に、細胞外への放出は 20ng / ml ~ 200ng / ml 程度の HGF によってほぼ完全に阻害された。これらの成長因子放出に対する HGF の阻害効果は 6 時間後以降に観察された。

透過型電子顕微鏡で好酸球の顆粒形態変化を観察したところ、IL-5 により顆粒内部の電子密度が減少し空胞化が認められることから、これまでに知られている piecemeal degranulation と呼ばれるタイプの脱顆粒をきたしていることが示唆された。空胞化・電子密度の減少がみられる顆粒の割合を数値化すると、有意な抑制がみられた。また、TGF- β は顆粒に貯蔵されている増殖因子であることが報告されているため、細胞内の TGF- β についても Flow cytometer で定量した。IL-5 は細胞内 TGF- β を減少させるが、HGF はこれを抑制することが分った。以上より、IL-5 は細胞内顆粒にプールされた TGF- β を細胞外に放出し、HGF はその放出を抑制すると考えられた。なお、TGF- β の mRNA 発現に HGF は影響を及ぼさなかった。

cytolysis への影響は、既知の ETosis 誘導因子である固相化 IgG と PMA で 3 時間刺激し、細胞膜非透過性 DNA 染色剤である SYTOX 存在下で好酸球の細胞死を定量化した。固相化 IgG と PMA とともに細胞死を誘導したが、HGF による有意な抑制は認めなかった。細胞死の後、短時間の flow stress を加えることにより、DNA traps の凝集体を可視化し、倒立型蛍光顕微鏡で観察したところ、DNA traps の凝集体は 2ng/ml と 20ng/ml で一部分抑制されたが、高濃度の HGF (200ng/ml) では観察できなかった。ETosis に必要な活性酸素の産生を APF の蛍光強度を指標にして検討したが、HGF による抑制は認めなかった。

結論

今回の検討から、HGF がヒト好酸球からの TGF- β および VEGF の放出を阻害することが明らかになった。阻害効果は、転写・合成に関連せず、むしろ顆粒内容および細胞内 TGF- β の含有量の喪失と関連しており、HGF が piecemeal degranulation のプロセスを阻害することによるものであることを示唆している。cytolysis の原因となる ETosis に対する HGF の効果も検討したが、HGF によってほとんど影響を受けなかった。

これらの研究は、好酸球分泌能の経路によって HGF が異なる効果を有することを明らかにしたものであり、将来的なアレルギー性炎症に対する HGF の効果に関して新たな知見となると考えられる。

学位（博士-甲）論文審査結果の要旨

主 査：高橋 直人

申請者：山内由美子

論文題名：The effect of hepatocyte growth factor on secretory function in human eosinophils（肝細胞増殖因子(HGF)のヒト好酸球分泌能への影響）

要旨

もともと成熟した肝細胞の強力な分裂促進因子として発見された肝細胞増殖因子（HGF）は炎症性及び免疫応答における恒常性メディエーターの一つとしてアレルギー性気道炎症を抑制し気道リモデリングを抑制することが知られている。著者は HGF が好酸球から分泌される成長因子の TGF- β 及び VEGF の放出を阻害することでアレルギー性気道炎症と気道リモデリングを抑制することを明らかにした。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

1) 斬新さ

HGF がアレルギー性気道炎症を抑制し気道リモデリングを抑制することが知られているが、その機序は明らかではなかった。本研究では IL-5 で刺激された好酸球が是喘息の気道リモデリングに関わる増殖因子として重要な TGF- β 及び VEGF の放出が誘導されることを示し、一方、HGF を加えることで濃度時間依存的に好酸球から分泌される TGF- β 及び VEGF の抑制されることを明らかにした。HGF が TGF- β の mRNA 発現に対して影響を及ぼさない一方、IL-5 で誘導される好酸球の picemeal degranulation と呼ばれる脱顆粒が HGF で抑制されることから、TGF- β 及び VEGF の抑制機序は TGF- β 及び VEGF の好酸球からの放出抑制であることを明らかにした。以上のことはこの阻害効果が picemeal degranulation のプロセスの阻害であることを初めて示したものである。

2) 重要性

本研究は HGF と気道リモデリングの抑制の関連を明らかにし、HGF の新たな効果を示したものであり、将来のアレルギー性炎症に対する治療ターゲットとしても重要な知見であると考えられる。

3) 実験の正確性

TGF- β 及び VEGF の定量は ELISA 法で測定し、細胞内顆粒の形態的变化は透過型電子顕微鏡で観察し画像的に空砲化顆粒の割合を定量化している。好酸球顆粒からの TGF- β 放出は免疫染色後フローサイトメトリーで定量化している。Cytolysis の本態である ETosis と活性酸素産生については著者らのグループがすでに報告しているように fluorometer で測定している。いずれも統計学的検討を加えており、客観的な評価方法であり、正確性があると考えられる。

4) 表現の明瞭さ

これまでの問題点の解決、すなわち HGF がアレルギー性気道炎症を抑制し気道リモデリングを抑制する機序を明らかにするための研究目的、方法、実験結果、考察を簡潔、明瞭に記載していると考えられる。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。