



DcR3 protects THP-1 macrophages from apoptosis by increasing integrin a4

立石, 耕司

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2010-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4805

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004805>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名 立石 耕司
博士の専攻分野の名称 博士（医学）
学 位 記 番 号 博い第 4805 号
学位授与の 要 件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付 平成 22 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

DcR3 protects THP-1 macrophages from apoptosis by increasing integrin a4 (DcR3 はインテグリ
ン a4 を増加させることにより THP1 細胞にアポトーシス抵抗性をもたらす)

審 査 委 員

主 査 教 授 熊谷 俊一
教 授 錦織 千佳子
教 授 南 博信

(講義博士関係)

学位論文の内容要旨

DcR3 protects THP-1 macrophages from apoptosis by increasing integrin $\alpha 4$

DcR3はインテグリン $\alpha 4$ を増加させることにより THP-1細胞にアポトーシス抵抗性をもたらす

神戸大学大学院医学系研究科医学専攻

整形外科学

(指導教員：黒坂 昌弘教授)

立 石 耕 司

目的：RAは、滑膜の増殖やパンヌスの形成などにより骨・軟骨破壊をもたらす関節の炎症疾患である。これまでに、我々は、TNF α がRA疾患特異的にDecoy receptor3(DcR3)の発現を促進させ、RA滑膜線維芽細胞に抗アポトーシス作用を及ぼすことを報告している。滑膜線維芽細胞とともにRA滑膜を構成するマクロファージ様細胞は、TNF α などの炎症性サイトカインを産生することにより、RAの病態を悪化させるが、近年、DcR3が、マクロファージの接着に関与することが報告されている。そこで、今回、THP-1細胞を用いて、単球・マクロファージ系細胞におけるDcR3の発現と、RAの病態に重要な影響をもたらす接着分子であるintegrin、およびコロニー形成能との関連について検討する。

方法：IL-6、TNF α 、TNF α +IL-6、LPS、PMAの各刺激によりTHP-1細胞を単球からマクロファージへ分化させ、その過程でのDcR3の発現をRT-PCRで検討し、同時に細胞形態を観察する。次に、上記刺激ドのマクロファージにおけるintegrin $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 αV 、 $\beta 1$ の発現をreal-time PCRで検討する。また、未分化のTHP-1 cellsと分化させたマクロファージにDcR3-FcあるいはPMAにより刺激を加え細胞形態を観察する。次に分化させたマクロファージのcycloheximide誘導アポトーシスに対するDcR3-FcおよびPMA刺激の影響をTUNEL染色、Western Blot法により検討する。さらに、DcR3-FcおよびPMAによるcycloheximide誘導アポトーシスの抑制効果と細胞形態に対するanti-VLA4抗体前処置の作用をTUNEL染色、Western Blot法により検討する。

結果：IL-6、TNF α 、TNF α +IL-6、LPS、PMAの各刺激によりTHP-1細胞は分化するが、DcR3の発現はPMA刺激でのみ確認された。またPMA刺激時の細胞の集合体が観察された。real-time PCRではDcR3-Fc刺激によりintegrin $\alpha 4$ の発現のみがコントロールと比較して優位に増加していた。未分化のTHP-1細胞及び分化したマクロファージの双方でDcR3-Fc及びPMA刺激により細胞の集合体が形成された。IL-6、TNF α 、TNF α +IL-6、PMA、DcR3-Fc刺激によりコントロールと比較してアポトーシス誘導に優位に抵抗性を示した。anti-VLA4抗体で前処置を加えるとPMA、DcR3-Fc刺激を行っても細胞の集合体は形成されなかった。anti-VLA4抗体の前処置はDcR3-Fc刺激によるアポトーシス抑制作用と低下させた。

考察：DcR3はさまざまな腫瘍細胞で過剰発現することにより、Fas誘導性アポトーシスを抑制して異常増殖を誘導すると考えられている。また腫瘍細胞と同様にRA滑膜において接着分子は増殖や炎症に深く関わっていると考えられている。接着分子の内VLA4やVLA5は、Fas誘導性アポトーシスの抑制に関与しておりRA滑膜にも発現していることからアポトーシスに深く関与していると考えられる。今回我々はTHP-1細胞からDcR3が発現し、DcR3-Fc刺激によりintegrin $\alpha 4$ が優位に増加していることを確認した。また分化の状態に関わらずTHP-1細胞にDcR3は細胞集合体形成を誘導し cycloheximide誘導アポトーシスに抵抗性をもたらすと考えられる。

今回の我々の実験から、DcR3は、デコイレセプターとしてFas誘導性アポトーシスを抑制しているとともに、細胞接着分子、特にVLA4の発現を促すことにより抗アポトーシス作用をもたらすと考えられる。

らすと考えられた。DcR3 はおとりレセプターとしてだけではなく VLA4 発現の誘導により細胞間接着に関与することにより、RA の病態に関与していることが示唆される。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2065号	氏名	立石 耕司
論文題目 Title of Dissertation	<p>DcR3 protects THP-1 macrophages from apoptosis by increasing integrin $\alpha 4$</p> <p>DcR3 はインテグリン $\alpha 4$ を増加させることにより THP1 細胞にアポトーシス抵抗性をもたらす</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner</p> <p>副査 Vice-examiner</p> <p>副査 Vice-examiner</p>		
	熊谷 俊一 錦城 413子 南 浩信		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) は、滑膜の増殖により関節の軟骨と骨の破壊をもたらす炎症性疾患である。研究者らはこれまでに、TNF α が RA 病患特異的にデコイレセプター3 (Decoy receptor3: DcR3) の発現を促進させ、RA 滑膜線維芽細胞に抗アポトーシス作用を及ぼすことを報告している。滑膜線維芽細胞とともに RA 滑膜を構成するマクロファージ様細胞は、TNF α などの炎症性サイトカインを産生することにより、RA の病態を悪化させるが、近年、DcR3 が、マクロファージの接着に関与することが報告されている。本研究者は THP-1 細胞を用いて、単球・マクロファージ系細胞における DcR3 の発現と、RA の病態に重要な影響をもたらす接着分子であるインテグリン (integrin) の発現、およびコロニー形成能との関連について検討した。

まず THP-1 細胞を IL-6、TNF α 、TNF α +IL-6、LPS、PMA により刺激しするとマクロファージへ分化したが、DcR3 の発現は PMA 刺激でのみ認められた。また PMA 刺激によってのみ細胞集塊が形成され、integrin $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 αV 、 $\beta 1$ の発現を real-time PCR で検討したところ、DcR3-Fc 刺激により integrin $\alpha 4$ の発現のみがコントロールと比較して有意に増加していた。未分化の THP-1 細胞及び分化したマクロファージの双方で、DcR3-Fc あるいは PMA 刺激により細胞集塊が形成された。そこで IL-6、TNF α 、TNF α +IL-6、PMA、DcR3-Fc 刺激により分化させたマクロファージのシクロヘキシミドによるアポトーシス誘導について TUNEL 染色と Western Blot 法により検討したところ、コントロールと比較して有意に抵抗性を示した。このシクロヘキシミド誘導アポトーシスの抑制効果と細胞形態に対する anti-VLA4 抗体の影響を調べたところ、anti-VLA4 抗体の前処置は、集合体形成とアポトーシス抑制作用を低下させた。

DcR3 はさまざまな腫瘍細胞で過剰発現することにより、Fas 誘導性アポトーシスを抑制して異常増殖を誘導すると考えられている。一方、腫瘍細胞と同様

に RA 滑膜細胞において接着分子は増殖や炎症に深く関わっているが、接着分子の内 VLA4 や VLA5 は、Fas 誘導性アポトーシスの抑制に関与しており RA 滑膜に過剰発現していることからアポトーシスに深く関与していると考えられる。今回研究者らは THP-1 細胞から DcR3 が発現し、DcR3-Fc 刺激により integrin a4 が優位に増加していることを確認した。また分化の状態に関わらず THP-1 細胞に、DcR3 は細胞集合体形成を誘導しアポトーシスに抵抗性をもたらした。本研究から、DcR3 は、デコイレセプターとして Fas 誘導性アポトーシスを抑制しているとともに、細胞接着分子、特に VLA4 の発現を促すことにより抗アポトーシス作用をもたらすと考えられた。DcR3 はおとりレセプターとしてだけではなく VLA4 発現の誘導により細胞間接着に関与することによっても、RA の病態に関与していることが示唆される。

本研究は、DcR3 について、単球・マクロファージ系細胞における発現とその機能について研究したものであるが、従来ほとんど行われていない単球・マクロファージ系細胞における DcR3 と VLA4 発現との関連について重要な知見を得たと同時に、DcR3 の制御を通じた今後の RA の治療法開発の研究の新たな材料となりうる点において価値ある集積であると認める。よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があるものと認める。