

## 学位請求論文の内容の要旨

|   |                                 |
|---|---------------------------------|
| 論文提出者氏名   | 病態制御科学領域 病態検査学教育研究分野<br>氏名 山本絢子 |
| <p>(論文題目)</p> <p>Intracellular storage of Duffy antigen-binding chemokines by Duffy-positive red blood cells<br/>(Duffy 親和性ケモカインは Duffy 陽性赤血球内に蓄積する)</p>  |                                 |
| <p>(内容の要旨)</p> <p><b>【背景・目的】</b><br/>赤血球に発現する Duffy 抗原は <i>Plasmodium vivax</i> などの侵入門戸となることが知られている。さらに Duffy 抗原は様々な炎症性ケモカインと結合する受容体(DARC:Duffy antigen receptor for chemokines)の機能も有している。しかしながら DARC はケモカインと結合しても、細胞内でのシグナル伝達は見られない。赤血球表面に発現している DARC は血中ケモカインを取り除く機能を果たすのではないかと考えられているが、詳細は不明である。本研究では、赤血球によるケモカイン吸着のメカニズムを探る目的で、以下の 3 点に焦点をあてて検討を行った。①赤血球内にケモカインが蓄積されているのか、②赤血球内に蓄積されているケモカインがあるのであれば、Duffy 親和性のものが選択的に取り込まれているのか、③DARC は赤血球内に internalize するのか。</p> <p><b>【方法】</b></p> <p>1) 材料：血液型が Duffy 抗原陽性の健康な成人から採取した EDTA 血を PBS で希釈し、400 g で 5 分間遠心した。血漿を含む上清を除いた後、さらに PBS で 2 回洗浄した赤血球を 1.100g/ml に調整した Percol 層の上にのせ、800 g で 5 分間遠心し、高純度の赤血球を得た。非溶血検体の上清は、赤血球を 3 倍の容量の PBS に浮遊し、遠心した上清を用いた。また、同様の割合で赤血球に蒸留水を加えて溶血させた上清を溶血検体とした。</p> <p>2) サイトカイン及びケモカインの測定<br/>Duffy 親和性のもものでは IL-8, RANTES, eotaxin-1, TARC, MCP-1 を、Duffy 親和性ではないものから IL-1<math>\beta</math>、TNF<math>\alpha</math>、VEGF、IP-10、MIP-1<math>\alpha</math> を測定した。<br/>① Bio-Plex による測定：IL-1<math>\beta</math>、TNF<math>\alpha</math>、IL-8、eotaxin-1、VEGF を測定した。<br/>② ELISA による測定：MCP-1、RANTES、MIP-1<math>\alpha</math>、TARC、IP-10 は Quantikine ELISA キットで測定した。</p> <p>3) 赤血球内ケモカイン染色および DARC の発現の測定<br/>フローサイトメトリーを用いた。血液型によって Duffy 発現の影響を受けないように、すべての血液型を Fya(+)Fyb(-)で統一した。</p> <p>① 細胞外染色<br/>蛍光標識した RANTES、MCP-1、eotaxin-1、IL-8、DARC に対する抗体で染色し、フローサイトメトリーで分析した。</p> <p>② 細胞内染色<br/>赤血球を 0.05%グルタルアルデヒドで室温にて 10 分固定後、PBS で 3 回洗浄し、0.15%トリトン X にて透過処理を行った。蛍光標識した RANTES、MCP-1、eotaxin-1、IL-8、DARC に対する抗体で染色し、フローサイトメトリーで分析した。</p> |                                 |

## 【結果】

Duffy 親和性ケモカイン 5 種類のうち eotaxin-1、RANTES、MCP-1 は溶血後上清濃度が著明に上昇した。TARC、IL-8 は Duffy 親和性ケモカインであるが、溶血前後で上清濃度に変化は見られなかった。Duffy 抗原と結合しないケモカインおよびサイトカインは溶血前後で上清濃度に変化は見られなかった。赤血球表面および内部の RANTES、IL-8、MCP-1、eotaxin-1 を測定したところ、細胞内部に RANTES、MCP-1、eotaxin-1 を検出した。IL-8 は細胞内部に認められなかった。また、この 4 種のケモカインのうち赤血球表面で検出されたものはなかった。即ち、Duffy 抗原親和性ケモカインのうち、RANTES、MCP-1、eotaxin-1 は、表面に捕捉された状態で存在するよりも、むしろ赤血球内に取り込まれていることが確認された。

赤血球内に RANTES が取り込まれるか確認する為に、6ng/mL (6,000pg/mL) の RANTES 溶液に赤血球を加え、室温下で静置すると、10 分後には溶液中の RANTES 濃度が著明に減少した ( $330 \pm 27 \text{pg/mL}$ ,  $P < 0.05$ )。また、赤血球内の RANTES 濃度を測定したところ 10 分後には赤血球内の RANTES 濃度は著明に上昇した ( $12,230 \pm 1,372 \text{pg/mL}$ ,  $P < 0.05$ )。生理的濃度幅を考慮し、溶液中 RANTES 濃度を 1ng/mL、10ng/mL でも検討したが、同様の結果であった。RANTES は赤血球内に取り込まれることが確認された。Duffy 親和性が強い IL-8 が、フローサイトメトリーでは健常人赤血球では細胞内外いずれもからも検出されなかったため、高濃度の IL-8 溶液中で赤血球を培養したが、24 時間後にもフローサイトメトリーでは赤血球内部から IL-8 は検出されなかった。

赤血球の表面のみの染色と透過処理後の赤血球 DARC 発現の比較では、透過処理後が明瞭に発現量が多かった。このことから、赤血球表面のみならず赤血球内部にも DARC が存在することが示唆された。

## 【考察】

赤血球は Duffy 親和性 CC ケモカインである RANTES、MCP-1、eotaxin-1 を細胞内に蓄積していることがフローサイトメトリーで初めて確認された。CXC ケモカインである IL-8 の細胞内蓄積が見られない要因として、健常人の血漿中濃度の低さが考えられていたが、本研究では高濃度の IL-8 存在下でも赤血球内への取り込みは見られず、他の要因が関与している可能性が示唆された。また、赤血球では internalize しないとされていた DARC が赤血球内部にも存在することが示唆されたことから、赤血球内への Duffy 親和性ケモカインの吸収の際には DARC の internalization が起こっている可能性が示された。