

博士(医学) 長谷川 浩 嗣

論文題目

Expressions of multidrug resistance protein 1 and multidrug resistance-associated protein 1 in lung dendritic cells

(肺樹状細胞における多剤耐性タンパク質 1 および多剤耐性関連タンパク質 1 の発現)

論文の内容の要旨

[はじめに]

多剤耐性タンパク質 1 (multidrug resistance protein 1:MDR1) および多剤耐性関連タンパク質 1 (multidrug resistance-associated protein 1:MRP1) は ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターファミリーに属する膜タンパク質である。MDR1 と MRP1 は細胞内から、脂質や生体異物などを排出し細胞内濃度を調節することによって、宿主を保護すると考えられている。これらトランスポーターは、当初腫瘍細胞で同定され、抗癌剤を排出し抗癌剤に対する耐性を引き起こすことが知られている。

樹状細胞 (dendritic cell: DC) は、外界の異物を取り込み分解し、出現した抗原を MHC-Class II、共刺激分子、サイトカインを介して T 細胞に提示する。特にナイーブ T 細胞に対して唯一抗原提示できるため、初期の免疫に際して重要な役割を担っていると考えられている。

肺および気道系は、常に外界からの異物、アレルゲン、毒物などに暴露されているため、主に肺胞上皮やマクロファージがこれらを排出し生体防御に働いている。肺 DC (lung DC: LDC) は気道や肺胞上皮に存在し、異物を処理し T 細胞に抗原提示することで生体防御に作用する。LDC における ABC トランスポーターも、防御作用に寄与すると考えられるが、その発現や機能についての知見は乏しい。LDC の分離採取は非常に困難であるが、近年の磁気分離装置等の開発利用により、比較的多数の LDC 採取が可能となってきた。今回、LDC における MDR1 や MRP1 の発現および機能に関して検討を行った。

[材料ならびに方法]

10 週齢 BALB/c 雄マウスを用いた。LDC として、摘出肺から細胞を単離後、磁気細胞分離装置を使用して CD11c 陽性細胞優位の細胞集団を分離、続いてフローサイトメトリー (flow cytometry: FCM) 細胞分取装置を用いて CD11c 陽性 MHC-Class II 陽性細胞を高純度 (98 %以上) で採取した。比較対象として、気管より全肺洗浄を行い肺胞マクロファージ (alveolar macrophage: AM) を回収した。

採取した AM および LDC から cDNA を合成し、Real-Time PCR 法でマウス MDR1 遺伝子である *Abcb1a* 遺伝子ならびに *Abcb1b* 遺伝子、MRP1 遺伝子である *Abcc1* 遺伝子発現量を測定した。MDR1 および MRP1 のタンパク質レベルでの発現は、MDR1 エピトープに対する C219 抗体と MRP1 エピトープに対する MRPr1 抗体を用いて染色し、FCM による平均蛍光

強度として算出した。また共焦点顕微鏡を用いた観察を行った。

MDR1 の排出能は、MDR1 基質としての蛍光色素 Rhodamine123 (R123) と MDR1 の特異的阻害剤ベラパミルを用いて検討を行った。R123 を LDC および AM に添加し細胞に取り込ませた後、ベラパミルを添加し、R123 を排出した細胞 (Rho^{low} 細胞) の割合をベラパミル添加の有無で比較した (ベラパミルは MDR1 の排泄能を阻害するため、Rho^{low} 細胞の割合は MDR1 の機能を反映する)。MRP1 の排出能については蛍光色素 Fluo-3、特異的阻害剤 MK-571 を用いて同様の検討を行った。全ての値は平均値±標準誤差で示し、対応のない t 検定で統計解析した。

[結果]

LDC における *Abcb1a* および *Abcb1b* 遺伝子と *Abcc1* 遺伝子の発現を、AM での遺伝子発現量を 1.0 として相対的定量法で評価した。LDC の *Abcb1a* 遺伝子の発現量は 3.3 ± 0.6 、*Abcb1b* 遺伝子の発現量は 16.0 ± 0.7 、*Abcc1* 遺伝子の発現量は 4.2 ± 0.7 であり、*Abcb1b* および *Abcc1* 遺伝子の発現量は AM での遺伝子発現と比較して有意に亢進していた ($P < 0.05$)。

MDR1 に対する C219 抗体の平均蛍光強度は 246、MRP1 に対する MRPr1 抗体の平均蛍光強度は 2921 であり、isotype-control と比較し亢進していた。共焦点顕微鏡を用いた検討では、細胞膜への局在が確認された。

MDR1 において、ベラパミル添加によって、Rho^{low} 細胞は 31.8 ± 6.3 % から 11.8 ± 2.8 % へ減少し ($P < 0.02$)、同様に MRP1 においても阻害剤 MK-571 添加によって Fluo^{low} 細胞は 53.8 ± 1.7 % から 26.8 ± 6.4 % に減少した ($p < 0.03$)。以上の検討より、LDC に ABC トランスポーターの MDR1 と MRP1 が発現しており、機能として排出能を有していることが確認された。

[考察]

これまでに LDC での MDR1 および MRP1 の発現ならびに活性に関する報告はない。DC はヘテロな集団であるため、これらトランスポーターの機能が由来する臓器に応じて異なる可能性が推察される。皮膚ランゲンハンス細胞や血中単核球由来 DC など他臓器の DC で、MDR1 や MRP1 が所属リンパ節への集積や、信号としての脂質の集積、DC の分化などに一部関わっていることも報告されているが、排出能に関する報告は少ない。今回、LDC に MDR1 と MRP1 が発現し、排出能を有することを確認した。これは、抗原の取り込みや分解といった機能の過程で、毒性の強い異物に対しては、MDR1 や MRP1 が LDC に防御的に作用する可能性を示唆すると考えられた。これら MDR1 や MRP1 が、LDC においても所属リンパ節への集積や分化などの生理活性に関連するのかは、今後の検討課題である。

[結論]

LDC には排出能を有した MDR1 と MRP1 が発現しており、LDC に対して防御的に機能する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究では、多剤耐性タンパク質 1 (MDR1) および多剤耐性関連タンパク質 1 (MRP1) は ATP-binding cassette トランスポーターファミリーに属する膜タンパク質である。MDR1 と MRP1 は、当初腫瘍細胞で同定され、抗癌剤を排出し抗癌剤に対する耐性を引き起こすことが知られている。一方、肺樹状細胞 (LDC) は気道や肺胞上皮に存在し、異物を処理し T 細胞に抗原提示することで生体防御に作用するが、これらトランスポーターの発現の有無やその機能については報告がない。そこで申請者は、LDC に MDR1 や MRP1 が発現し、機能しているかどうかを検討した。10 週齢 BALB/c 雄マウスの肺から、新規の単離方法を用いて LDC を採取した。単離方法としては、磁気細胞分離装置を使用して CD11c 陽性細胞優位の細胞集団を分離、続いてフローサイトメトリー細胞分取装置を用いて CD11c 陽性 MHC-ClassII 陽性細胞を高純度で採取した。採取した LDC から cDNA を合成し、Real-Time PCR 法でマウス MDR1 遺伝子や MRP1 遺伝子発現量を測定した。また、MDR1 および MRP1 のタンパク質レベルでの発現も測定した。さらに、MDR1 の排出能は、MDR1 基質としての蛍光色素 Rhodamine123 と MDR1 の特異的阻害剤ベラパミルを用い、MRP1 の排出能については、蛍光色素 Fluo-3 と特異的阻害剤 MK-571 を用いて検討を行った。結果は、LDC に MDR1 と MRP1 の遺伝子の発現および細胞膜にタンパク質の発現を確認し、基質の排出機能も確認した。以上の結果から、申請者は LDC には排出能を有した MDR1 と MRP1 が発現していることを証明した。

審査委員会では、肺樹状細胞の新規単離方法の確立と肺樹状細胞における MDR1 と MRP1 の発現と排出機能を初めて証明したことを高く評価した。

以上により、本論文は博士 (医学) の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 梅村 和夫
副査 川上 純一 副査 小川 法良