

## 成人好中球細胞膜におけるフィブロネクチンエピトープ発現の多様性

岡田 真理子\*, 川崎 麻美\*\*, 中城 敏\*\*\*, 櫃本 泰雄\*\*\*\*

### Variations in the Expression of Neutrophil Surface Fibronectin-epitope which is Recognized by a Unique Monoclonal Anti-fibronectin Antibody MO

Mariko OKADA\*, Asami KAWASAKI\*\*, Satoshi NAKASHIRO\*\*\*, Yasuo HITSUMOTO\*\*\*\*

#### Abstract

Flow cytometric analysis of neutrophil surface fibronectin-epitope from 40 persons using a unique anti-fibronectin monoclonal antibody MO was performed to examine phenotypic variability among age and sex. Each person was categorized into one of the four groups, young male, young female, old male or old female. In both sexes, the average expression of fibronectin epitope is slightly higher in the old group than in the young group but the difference between the two groups is not statistically significant. In the other hand, the average expression of the epitope is more than two times higher in females than in males of both age groups and the difference between the male and the female is statistically significant. These observations suggest that the sexual hormone may be one of the factors which make the expression of surface fibronectin-epitope variable among donors.

**Key words:** neutrophil, fibronectin-epitope, flow cytometry, sex, age

#### 序 文

フィブロネクチンは線維芽細胞, 上皮細胞, 肝細胞などの様々な細胞により産生される多機能糖タンパク質のひとつで, 細胞により異なったアイソタイプとして産生される<sup>1-5)</sup>。このタンパク質は細胞外マトリックスを形成して細胞遊走, 細胞接着, 細胞シクナリング, 細胞分裂のコントロールなどに関わるとともに<sup>6)</sup>, 血液などの体液中では可溶性タンパク質として非特異的オプソニン活性を担い, マクロファージや好中球による被食体の貪食を高めていると考えられている<sup>7,8)</sup>。最近, 好中球自身の細胞内や細胞膜上にフィブロネクチンが存在することが報告されたが<sup>9-11)</sup>, 好中球がもつこの分子の構造や機能については不明な点が多い。

私たちはフィブロネクチンの生物活性を研究する過程<sup>12)</sup>でいくつかの抗ヒトフィブロネクチンモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを樹立した。その中の1つMOが産生するモノクローナル抗体MabMOは, 健常人の好中球を細胞膜上フィブロネクチンエピトープ(FN)陽性好中球分画とFN陰性好中球分画の2つのサブポピュレーションに分別し, MabMO結合性であるFN陽性好中球の割合

(FN陽性率)については大きな個体差が観察された<sup>13)</sup>。MabMOは他の血液細胞には一切結合せず, MabMOと同時に調べた10種類の市販の抗フィブロネクチンモノクローナル抗体は好中球とは結合しなかったことから, MabMOは好中球に特異的に結合するユニークな抗フィブロネクチンモノクローナル抗体であることが明らかとなった<sup>13)</sup>。

本研究では, MabMOにより認識される好中球のフィブロネクチンエピトープ(FN)発現について, 異なった年齢層, 異なった性について比較し, その多様性の実態について検討した。若年者層の男性10人・女性10人, 高齢者層の男性9人・女性11人の好中球について, MabMOと蛍光標識2次抗体を用いたフローサイトメトリーにより解析し, FN陽性好中球分画の割合(FN陽性率)と, その分画の細胞がもつエピトープの多少を表す指標として平均蛍光強度(Mean X)を測定した。

#### 方 法

抗体: MabMOは既報のとおり, ハイブリドーマ培養上清から抗マウスIgM-Sepharoseを用いたアフィニティークロマトにより精製した<sup>13)</sup>。対象: 感染症や自己免疫疾患な

\*愛媛県立医療技術大学保健科学部臨床検査学科 \*\*愛媛県立医療技術大学保健科学部臨床検査学科4年生, 現所属: 石橋クリニック  
\*\*\*医療法人誠志会砥部病院 \*\*\*\*岡山理科大学理学部

どの炎症性疾患をもたない若年層（20人：平均年齢 $21 \pm 0.9$ 歳）〔内訳男性10人：平均年齢 $21.4 \pm 1.0$ 歳（20–23歳）、女性10人：平均年齢 $21.6 \pm 0.5$ 歳（21–22歳）：本学学生〕と高齢層（20人：平均年齢 $72.1 \pm 10.7$ 歳）〔内訳男性9人：平均年齢 $66.7 \pm 9.9$ 歳（58–90歳）、女性11人：平均年齢 $76.5 \pm 9.5$ 歳（58–86歳）、T病院外来通院者〕の合計40人の男女を対象とした。男性全体（19人）および女性全体（21人）の平均年齢はそれぞれ $42.8 \pm 24.2$ 歳と $50.3 \pm 28.9$ 歳であった。対象者には口頭および文書で研究内容の説明を行い、実験参加の同意を得た。血液検体は実験当日、実験終了後に廃棄した。フローサイトメトリー：EDTA加末梢血全血100 $\mu$ lに1次抗体としてMabMO（1mg/ml）を1 $\mu$ lを加え4 $^{\circ}$ Cで45分間反応させた。アイソタイプコントロールとしてTEPC-183（Sigma）（1mg/ml）1 $\mu$ lを同様に反応させた。反応終了後、リン酸緩衝生理食塩水–0.5%NaN<sub>3</sub>（PBS）で洗浄し、2次抗体として最適に希釈したFITC標識rat anti-mouse IgM（ROCKLAND）100 $\mu$ lを加えて4 $^{\circ}$ Cで30分間反応させた。これ以降は暗所で操作した。検体にOptiLyseC（Coulter）500 $\mu$ lを加え室温で10分間静置し、同量のPBSを加えてさらに15分間静置した。その後ただちEPICS XL system2（Beckman-Coulter）により、顆粒球にゲートをかけFN陽性率を測定した。FN陰性のカットオフポイントはアイソタイプコントロール抗体と反応する顆粒球の割合が0.5%以下となるように設定し、検体のFN陽性率はアイソタイプコントロール値を差し引いた値とした。同時にFlow-Count粒子（Beckman-Coulter）を用いて各種血液細胞の絶対数を測定した。

解析：測定結果を若年男性、若年女性、高齢男性、高齢女性の4小集団、および男性全体、女性全体もしくは若年全体、高齢全体の2大集団に分類し、各集団の好中球のFN陽性率についてThe Graph Ver.5を用いて箱ひげ四分位値グラフとして作図するとともに、Mann-Whitney法により有意差検定を行った。FN陽性好中球分画について、膜表面上のエピトープの多寡の指標として平均蛍光強度（Mean X）の値を各集団で比較し、t検定により有意差検定を行った。FN陽性率と年齢との相関、FN陽性率と顆粒球数等との相関はSpearmanの順位相関係数とそれに対応するp値により検証した。統計解析はすべてフリーソフトウェアJSTATを用いた。

## 結 果

### MabMOを用いた好中球のフローサイトメーターによる解析

FN陽性好中球分画の割合は個体差が大きく、全体としてみると、今回測定した被験者40人中、最大値は54.7%、最小値は0.28%、全体の平均値は $14.7 \pm 13.8$ %（mean  $\pm$  SD）であった。図1はFN陽性好中球分画がほとんど

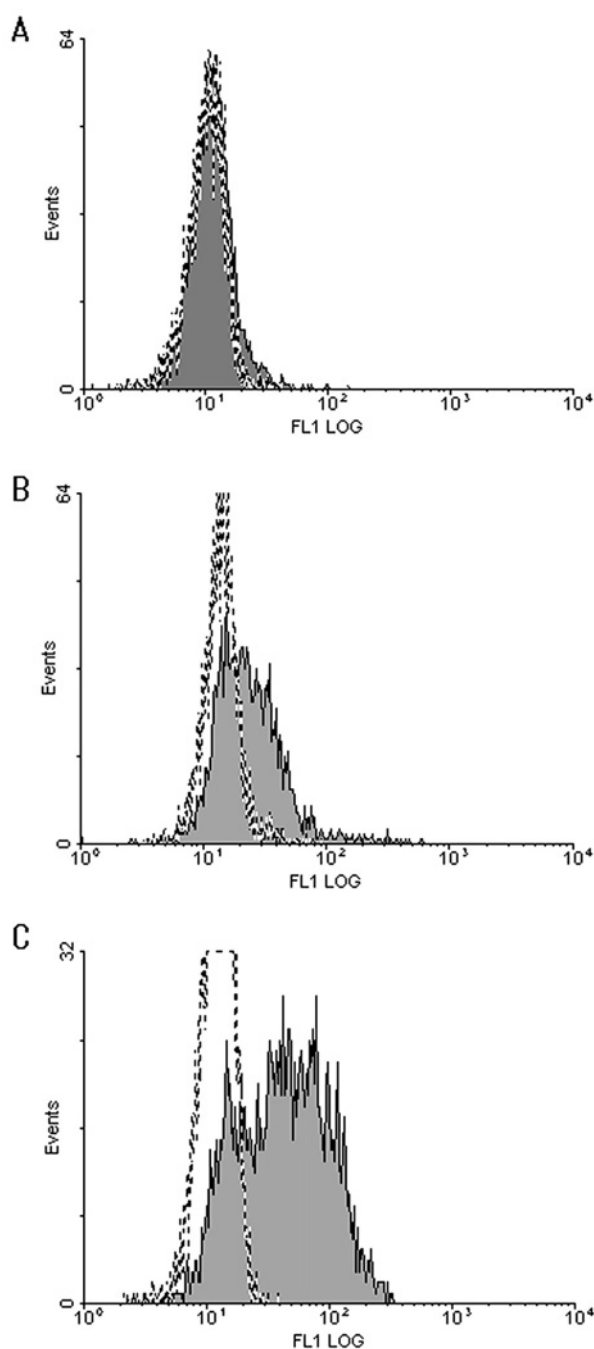


図1. フローサイトメータによるフィブロネクチンエピトープ（FN）陽性好中球の解析

A) FN陽性好中球をほとんど持たない検体例。

B) FN陽性率がほぼ平均値を示す検体例。

C) FN陽性率が50%を越えた検体例。

実線：抗フィブロネクチンモノクローナル抗体MOの反応。  
点線：アイソタイプコントロールの反応。

ない検体例（図1A）、FN陽性率が平均的値を示す検体例（図1B）、陽性率が50%を超える検体例（図1C）のフローサイトメトリーによるヒストグラムを示している。全検

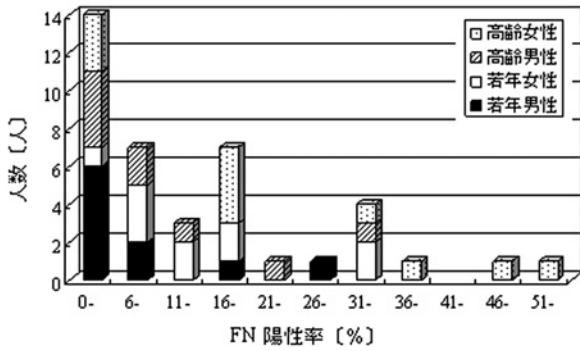


図2. 被験者のFN陽性率分布

体についてFN陽性率を5%単位で区切ってグループ化し、各グループへの4小集団に分類された被検者数の分布を調べたものが図2である。どの4小集団についても分布は広がっていたが、若年男性がもっとも分布範囲が狭く(0-30%)、高齢女性がもっとも分布範囲が広がった(0-55%)。FN陽性率が5%以下のグループの被験者数が最も多く(35%:14人/40人中)、若年男性の半数以上(6人/10人中)、高齢男性のほぼ半数(4人/9人)はこの範疇に含まれた。FN陽性率の高い(≥36%)被験者はすべて高齢女性であった。

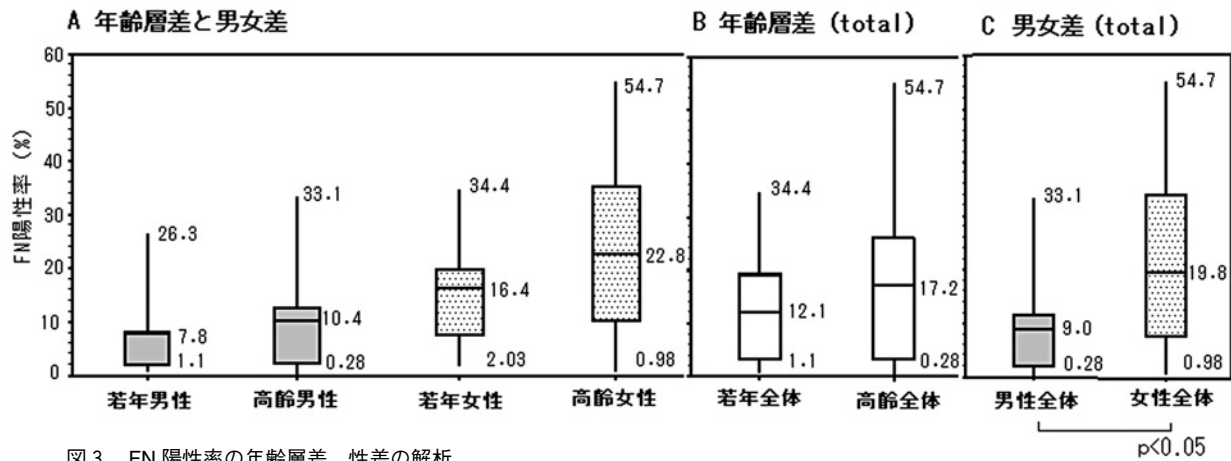
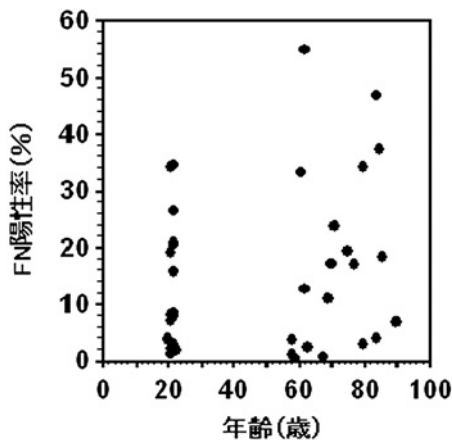


図3. FN陽性率の年齢層差、性差の解析  
各グラフの3つの数値は、上から、最高値、平均値、最低値を示す。

表1. 年齢と性別により分類した各集団間におけるFN陽性好中球の平均蛍光強度 (Mean X) の比較

分類	若年男性	高齢男性	若年女性	高齢女性	若年全体	高齢全体	男性全体	女性全体
人数	10	9	10	11	20	20	19	21
Fluorescence intensity MeanX: average ±SD (arbitrary unit)	5.41 ± 0.34	5.54 ± 0.58	6.11 ± 1.07	6.18 ± 1.13	5.76 ± 0.86	5.89 ± 0.96	5.47 ± 0.46	6.15 ± 1.08

p<0.05



Spearmanの順位相関係数  
 $r_s=0.233$  ( $p=0.146$ )

図4. FN陽性率と年齢との相関

### FN陽性率に対する年齢、性の影響

図3Aは男性、女性について年齢層間でFN陽性率を比較し、箱ひげ4分位値グラフで示したものである。どちらの性においても、若干高齢者の方が平均値が高かったが若年者との間に統計学的有意差はなく、またFN陽性分画の平均蛍光強度 (MeanX) の値についてもどちらの性においても年齢層間の差はなかった(表1)。若年者全体と高齢者全体で比較しても、FN陽性率および平均蛍光強度 (Mean X) に両者の間に統計学的有意差は認められなかった(図3B, 表1)。全検体について年齢とFN陽性率との相関を Spearman の順位相関係数で検証したが、 $r_s=0.233$ ,  $p=0.146$ で有意な相関があるとは認められなかった(図4)。一方、同一年代層における男性と女性のFN陽性率を比較すると、若年者においても高齢者におい

でも女性の平均値が男性に比べ2倍以上高く、小集団における例数では統計学的に有意差は認められなかったが、2大集団、すなわち女性全体と男性全体を比較すると統計学的にも有意差が認められた(図3C)。また、FN陽性分画の平均蛍光強度(Mean X)についても男性全体と女性全体の比較において女性の方が男性より有意に高く、女性的好中球の方が平均的にFNを多く表出していることがわかった(表1)。

### FN陽性率と白血球数および顆粒球数との相関

白血球数や顆粒球数にも個体差は認められたが、全員基準値の範囲で、FN陽性率と白血球数、顆粒球数との間にはいずれも相関は認められなかった(data not shown)。

## 考 察

MabMOにより認識されるフィブロネクチンエピトープ(FN)を発現する好中球(FN陽性好中球)の割合(FN陽性率)には大きな個体差があると報告されている<sup>13)</sup>。本研究により、個体差は性別、年齢層別にかかわらずどの集団にも認められることが明らかとなった。年齢層間で比較すると、若干、高齢者の方がFN陽性率の平均値が高かったものの、統計学的な有意差はなく、特に男性に限ると両年齢層間の差はほとんど観察されなかった。また、年齢とFN陽性率との間に有意な相関が認められず、加齢とともにFN陽性率が大きくなるという傾向はなかった。血清中のフィブロネクチン濃度については加齢により増大することとが知られているが<sup>14)</sup>、好中球膜上のFNの発現に関しては、加齢がFN陽性率を高める主な要因である可能性は低いと考えられた。細胞膜上のFN保有分子の機能については現在のところ不明であるが、*in vitro*における実験から温度や走化性因子による活性化によりFN陰性好中球がFN陽性に変化することがわかっている(未発表データ)。一般に、高齢になると感染症に感受性が高くなるとされているが、今回の被験者は白血球を含む種々の血液細胞数はすべて正常範囲内の値を示しており(data not shown)、FN陽性率と白血球数や顆粒球数とのあいだに相関が認められなかった。これは被験者を選ぶ際、感染症などの炎症性疾患をもたないことを条件にしているため、どの年齢層の被験者においても炎症によって好中球の活性化がおこっていた可能性が低かったことを示していると推測できる。一方、今回のデータから、年齢層にかかわらず女性の方が男性よりFN陽性好中球の割合の平均値が高く、しかも好中球1細胞あたりのFN保有分子数も女性の方が多いたことがクローズアップされた。女性全体と男性全体を比べると統計学的にみても有意差が認められた。今回の被験者については女性の方が男性より平均年齢が7.5歳高かったが、さきに述べたように、年齢

がFN陽性率に与える影響はあまりないことを考慮すると、男性全体と女性全体の有意差は性差によるものと考えられる。この結果についての最も単純な説明は、好中球細胞膜FN保有分子の発現に女性ホルモンが関与している可能性があるということだが、しかし、もしそうであれば、高齢女性の方が若年女性よりも平均値が低下するはずであるので、女性ホルモン単独が関与しているとは考えがたい。FN陽性率の高い検体がすべて高齢者女性であったこと、年齢はFN陽性率に大きな影響は与えないことを考慮すると、今回の高齢女性被験者においてはホルモン以外の要因(例えば炎症性疾患以外の疾患)も*in vivo*における好中球膜FN発現にかかわっていたと考えるのが妥当である。私たちは一連の研究の中で、自律神経系がFN発現を調節しており、交感神経優位になるとFN陽性率が増大し、副交感神経優位になるとFN陽性率が減少するという予備的実験結果を得ている(未発表データ)。これらのことと、今回のデータを総合すると、生体内での好中球膜FNの発現については複数の因子が関与しており、女性ホルモンはその発現の多寡を制御する因子の一つではないかと考えられた。

現在のところ、好中球膜FN保有分子が、血清中のフィブロネクチンと同一構造をしているのか、あるいは特異的なアイソタイプ構造をしているのか<sup>1-5)</sup>、生物活性については従来知られているフィブロネクチンの活性と重複しているのか<sup>6)</sup>、あるいは独自の生物活性をもつのか、すべて不明である。FN陽性好中球の個体差、性差の意味は、これらの問題が解明されればおのずから明らかとなっていくと考えられる。

## 引用文献

- 1) Schwarzbauer, J. E., Patel, R. S., Fonda, D., and Hynes, R. O. (1987): Multiple sites of alternative splicing of the rat fibronectin gene transcript. *EMBO J.*, 6: 2573-2580
- 2) Kornblihtt, A. R., Umezawa, K., Vibe-Peterson, K., and Baralle, F. E. (1985): Primary structure of human fibronectin: differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene. *EMBO J.*, 4: 1755-1759
- 3) French-Constant, C., van der Water, L., Dvrak, H.F., and Hynes, R. O. (1989): Reappearance of an embryonic pattern of fibronectin splicing during wound healing in the adult rat. *J. Cell Biol.*, 109: 903-914
- 4) Carnemolla, B., Balza, E., Siri, A., Zardi, L., Nicotra, M.R., Bigotti, A., and Natali, P. G. (1989): A tumor-associated fibronectin isoform generated by alternative

splicing of messenger RNA precursors. *J. Cell Biol.*, 108: 1139-1148

- 5) Magnuson, V. L., Young, M., Schattenberg, D., Mancini, M., Chen, D., Steffensen, B., and Klebe, R. J. (1991): The alternative splicing of fibronectin pre-mRNA is altered during aging and response to growth factor. *J. Biol. Chem.*, 266: 14654-14662
- 6) Hynes, R.O.(1990): Wound healing, inflammation, and fibrosis, *Fibronectins*, ed. Rich, A., pp.347-364 Springer-Verlag
- 7) Bohnsack, J. F., Takahashi, T., and Brown, E. (1986): Interaction of culture-derived macrophages with the fibroblast-binding domain of fibronectin is a necessary but inefficient signal for fibronectin enhancement of CR 1-mediated phagocytosis. *J. Immunol.*, 136: 3793-3798
- 8) Pankov, R. and Yamada, K. M. (2002): Fibronectin at a glance. *J. Cell. Sci.*, 115: 3861-3863.
- 9) Salcedo, R., Segura, C., Szekely, L., de Mesquita, R., Biberfeld, P., and Patarroyo, M. (1997): Endogenous fibronectin of blood polymorphonuclear leukocytes: Immunochemical characterization and subcellular localization. *Exp. Cell Res.*, 233: 25-32
- 10) Salcedo, R., Wassermann, K. and Patarroyo, M.: Endogenous fibronectin of blood polymorphonuclear leukocytes (1997): Stimulus-induced secretion and proteolysis by cell surface-bound elastase. *Exp. Cell Res.*, 233: 33-40
- 11) Wagner, C., Pioch, M., Meyer, C., Iking-Konert, C., Andrassy, K., and Hänsch, G. M. (2000): Differentiation of polymorphonuclear neutrophils in patients with systemic infections and chronic inflammatory diseases: evidence of prolonged life span and de novo synthesis of fibronectin. *J. Mol. Med.*, 78: 337-345
- 12) Hitsumoto, Y., Okada, M., and Makino, H. (1999): Inhibition of human and mouse complement-dependent hemolytic activity by mouse fibronectin. *Immunopharmacology*, 42: 203-208,
- 13) Okada, M and Hitsumoto, Y. (2006): A unique monoclonal antibody against human plasma fibronectin, which recognizes an epitope on the surface of a subpopulation of polymorphonuclear neutrophils. *Hybridoma*, 25: 202-208.
- 14) Menzel, J. E, Dunky, A. (1989) : Inhibition of complement activation in aged individuals due to increased plasma fibronectin concentration. *Experimental Gerontology*, 24, 189-200

## 要 旨

抗フィブロネクチンモノクローナル抗体 MO により認識されるフィブロネクチンエピトープ (FN) 陽性好中球の割合 (FN 陽性率) の個体差の実態を調べるために、被験者 FN 陽性率をフローサイトメトリーを用いて測定し、年齢層差、及び性差について比較し解析した。どの年齢層、性においても大きな個体差が観察された。平均値を比べると男女とも高齢者層の方が若年者層より若干 FN 陽性率が高かったが統計学的有意差は認められなかった。どちらの年齢層においても女性の方が男性より FN 陽性率が平均で 2 倍程度高く、細胞 1 個あたりの FN 数も女性の方が多かった。男性全体と女性全体を比較すると FN 陽性率にも細胞 1 個あたりの FN 数にも統計学的有意差が認められた。これらの結果から、好中球膜上の FN 表出が女性ホルモンにより制御されている可能性が考えられたが、高齢女性の方が若年女性より FN 陽性率が低いという結果は示されなかったこと、およびどの年齢層、性においても大きな個体差が観察されたことから、好中球膜 FN 表出の程度の決定には他の因子も関与しており、女性ホルモンはその因子の一つであることが推測された。

## 謝 辞

本研究は本学の平成19年度教育・研究助成費の助成を受けて行われた「加齢の臨床検査学的研究」の一部であることを付記し、謝意を表します。