主論文の要約

Receptor role of the annexin A2 in the mesothelial endocytosis of crocidolite fibers

（中皮細胞によるクロシドライト繊維のエンドサイトーシスにおける
アネキシンA2の受容体としての役割）

名古屋大学大学院医学系研究科　機能構築医学専攻
病理病態学講座　生体反応病理学分野
（指導：豊國 伸哉　教授）
山下 享子

【緒言】

悪性中皮腫は、その大半がアスベストの吸入により発生している。アスベストは、天然の繊維性無機珪酸塩鉱物であり、中でもクロシドライト、アモサイト、クリソタイルの 3 種類が広く使用されてきた。特にクロシドライトは、アスベストの中で最も発癌性が高いとされている。

中皮腫の発生機構には、アスベスト繊維が phagocytosis (endocytosis)によって中皮細胞内に取り込まれる現象が関係していると考えられているが、この phagocytosis についてこれまで唯一知られているメカニズムは、血清中の vitronectin がアスベスト繊維を覆うことで、中皮細胞表面の integrin αvβ5 (vitronectin の受容体)を介して取り込まれる、というものである。今回はその他の phagocytosis 機構について、受容体となるタンパク質を中心に解析を行った。

【方法】

我々は、細胞内に取り込まれたクロシドライトの定量的評価において、セルブロック標本による観察と、フローサイトメトリーによる解析の有用性を報告しているが、まずこれらの手法のクリソタイルやアモサイトの取り込み評価における有用性について検討した。次に phagocytosis に対する血清の影響をみるため、medium 中の血清濃度および投与前におけるアスベストの血清処理の有無について、条件を変えて中皮細胞株(MeT5A)をクロシドライト、クリソタイルに曝露し、取り込み量の変化を検討した。さらにこれら 3 種類のアスベストの、中皮細胞株(MeT5A)から抽出した膜タンパク質に対する吸着性を、SDS-PAGE と銀染色で確認し、受容体タンパク質の候補として、クロシドライトおよびクリソタイルに吸着する膜タンパク質を質量分析で同定した。さらに同定されたタンパク質について、遺伝子ノックダウン、抗体によるブロック、免疫染色を行い検討した。

【結果】

セルブロック標本により、アスベストは 3 種類とも中皮細胞(MeT5A)に取り込まれていることが観察できた(Figure 1)。アモサイトは形態上クロシドライトに類似していたが、クリソタイルは細い曲がりくねった繊維で、色も白く、光学顕微鏡での同定はやや困難であった。フローサイトメトリーによる解析では、いずれの繊維を投与した場合でも投与量に応じて SSC は直線的に増加し、取り込み量との相関、すなわち定量評価における有用性が示唆された。

血清の影響についての検討では、クロシドライトでは血清が存在しない状態で、最も取り込まれた量が多かったが、これにはクロシドライトでは血清が全く存在しないと沈殿速度が圧倒的に早いことが影響していると思われた(Figure 2)。クリソタイルでは、取り込み量、沈殿速度とも血清による影響は見られなかった。

また 3 種類のアスベストはいずれも多数の膜タンパク質を吸着し、その銀染色でのパターンはクロシドライトとアモサイトはほぼ同じであったが、クリソタイルはやや

異なっていた(Figure 3)。

In-solution digestion で調整したサンプルから同定された、クロシドライトに吸着したタンパク質(Table 1)のうち、細胞膜表面に存在するタンパク質の中で最も score の高かった annexin A2 (ANXA2)と、receptor mediated endocytosis に関係することが知られている膜貫通タンパク質の transferrin receptor protein 1 (TFRC)について、遺伝子ノックダウンによる中皮細胞(MeT5A)のクロシドライトおよびクリソタイル取り込み量の変化を調べたところ、クロシドライトの取り込み量は ANXA2 のノックダウンにより有意に減少したが、TFRC では有意な変化は見られなかった(Figure 4)。またクリソタイルの取り込み量は、ANXA2 , TFRC のいずれのノックダウンでも有意な変化は見られなかった。

さらに抗 ANXA2 抗体(ab41803)で中皮細胞表面をブロックしたところ、クロシドライトの取り込み量は有意に減少した。免疫染色では、ANXA2 は、細胞膜とくに腹腔側の中皮細胞膜によく発現していた(Figure 5)。

【考察】

今回の実験系では、血清の非存在下でも、クロシドライト、クリソタイルとも十分細胞内に取り込まれていたことから、血清中のタンパク質によるアスベストの被覆を利用しない phagocytosis 機構の存在が示唆された。我々は、タンパク質を吸着しやすい特性を利用して、アスベストが細胞膜上の受容体に直接結合した可能性を考え、クロシドライト・クリソタイルに吸着する膜タンパク質を同定した。細胞内へのシグナル伝達が必要な phagocytosis の受容体としては、細胞膜に存在する膜貫通タンパク質が第一に考えられるが、他の細胞膜表面に存在するタンパク質も、phagocytosis が起こるまでアスベストを膜表面に留めておくための足場という意味の受容体になりうると考え、少なくとも一部が細胞膜の表面に露出するタンパク質を抽出し検討した。それらのタンパク質の中で、ANXA2 の発現量が低下、あるいは細胞表面を抗 ANXA2 抗体でブロックすると、クロシドライトの取り込み量が減少した。また ANXA2 が体腔側（腹腔側）の中皮細胞膜によく発現していることは、アスベストの phagocytosis を補助する受容体としても矛盾しない。

【結語】

アスベストの中皮細胞による phagocytosis には、血清中のタンパク質は必要ではなく、アスベストがタンパク質を吸着しやすい特性を利用して、細胞膜上の受容体に直接結合した可能性が考えられた。細胞表面に露出した膜タンパク質はその候補であり、そのうち ANXA2 は、クロシドライトが細胞膜表面に留まるのを補助する受容体として働いている可能性が示唆された。