MRL/l マウスループスにおけるマクロファージのリソソーム 酵素活性ならびに活性酸素の亢進とその病理発生の意義

深沢 泉・能勢真人^{*1)}, 加藤泰三^{*2)}, 京極方久^{*1)}

Pathogenetic aspect of lysosomal enzyme activities and superoxide release of macrophages in MRL/l murine lupus MRL/Mp-*lpr/lpr* (MRL/l) mice which are lymphoproliferation (*lpr*) gene-congenic mice of MRL/Mp-⁺/₊ (MRL/n) spontaneously develop glomerulonephritis, arteritis and arthritis characterized by the accumulation of macrophages. In this study we investigated the role of *lpr* gene expression on the functional activities of resident peritoneal macrophages of MRL strain of mice.

MRL/l mice showed remarkable increase of lysosomal enzyme activities and superoxide release of macrophages compared with those of MRL/n mice. In another *lpr* congenic mice C57BL/6-*lpr/lpr* (B6/l) showed, however, neither lupus lesions nor the activation of macrophages in spite of the remarkable lymphoproliferation. These results may suggest the importance of background genes of MRL/Mp-⁺/₊ strain of mice in addition to *lpr* gene expression for the activation of macrophages and further the development of murine lupus of MRL/l mice.

Izumi Fukazawa・Masato Nose^{*1)}, Taizo Kato^{*2)}, Masahisa Kyogoku^{*1)}

^{*1)}Department of Pathology and ^{*2)}Dermatology, Tohoku University School of Medicine

key words: murine lupus, macrophage, lysosomal enzymes, superoxide, genetic background

難治性炎症性疾患の多くは、その病変局所にいちじるしいマクロファージの集簇をきたし、それに伴って活性酸素やリソソーム酵素の細胞外放出による組織障害、さらには肉芽腫性炎を引き起こすと考えられる。

ループスマウスの1系である MRL/Mp-*lpr/lpr* (MRL/l)マウスは、lymphoproliferation gene (*lpr*) 遺伝子に規定された異常Tリンパ球の過形成に伴い肉芽腫性炎を発症するが、その病変局所にはいちじるしいマクロファージの集簇が認められる^{1,2)}。

筆者らは、このマクロファージ機能が病像の発現、進展に重要な役割を果たしていると考え、月齢別に MRL/l マウスのマクロファージについて、*lpr* 遺伝子を持たない MRL/Mp-⁺/₊ (以下 MRL/n) マウスのそれと、比較検討した。さらに、これらのマクロファージ機能を規定すると思われる遺伝子 *lpr* ならびに MRL マウスの遺伝的背景との関連について、*lpr* 遺伝子の他の congenic マウスである C57BL/6-*lpr/lpr* (以下 B6/l) を用いて検討したのでその成績を報告する。

材料と方法

(1) マウス

MRL/Mp-*lpr/lpr* (MRL/l), MRL/Mp-⁺/₊ (MRL/n) は Jackson Lab. から供与あるいは購入し東北大学医学部実験動物センターで繁殖、維持したコロニーを用い

た。C57BL/6-*lpr/lpr* (B6/l) (Jackson 'Lab. 由来) は早川純一郎博士(金沢大学医学部実験動物施設)より分与されたものを当教室で繁殖させて使用した。

(2) マクロファージ(MΦ)

上記マウスの腹腔常在性マクロファージを用いた。無処理マウス腹腔を heparin 添加(10U/ml) の Hanks 緩衝液で洗いだし、遠心洗浄後、1 匹当たり 2cc の Dulbecco's MEM (含 5% FCS) に浮遊し使用した。マクロファージの機能はマウス 1 匹当たりの相対的活性で検討した。

(3) リソソーム酵素活性の定量

マクロファージ胞体内の acid phosphatase (Acid P-ase), β -N-acetyl-D-glucosaminidase (GlcNAc-ase) 活性をマイクロプレート比色計を用いた微量測定法にて定量した³⁾。

(4) 活性酸素の放出

zymosan を刺激剤とする腹腔マクロファージの chemiluminescence 反応は、Lab. Science 社 kit を用いルミフォトメーター(TD-4000, Lab. Science 社)で測定し、その相対的活性をプロットした。末梢血全血のそれは文献⁴⁾の方法に準じた。

成績

(1) MRL/l マウスのマクロファージ機能

MRL/l マウスのリソソーム酵素活性は、MRL/n マウスにくらべて、Acid P-ase, GlcNAc-ase ともにいち

^{*1)} 東北大学医学部第一病理学教室

^{*2)} 同皮膚科学教室

図1 lysosomal enzyme activities of resident peritoneal macrophages of MRL/Mp-*lpr/lpr* and MRL/Mp-^{+/+} mice (5 months old) Acid P-ase, GlcNAc-ase; lysosomal enzyme activities of acid phosphatase and β -N-acetyl-D-glucosaminidase. Each point represents the mean of enzyme activities ($A_{405}-A_{510}$) from triplicate samples of an individual mouse.

図2 lysosomal enzyme activities of resident peritoneal macrophages of MRL/Mp-*lpr/lpr* mice in various ages. See a legend of Fig. 1.

じるしく亢進していた ($P < 0.01$) (図1)。

MRL/l マウスのマクロファージ機能を月齢別に検索すると、リンパ節腫脹をきたすのは3.5カ月齢をturning point として、両リソソーム酵素活性のいちじるしい上昇を認めた(図2)。

(2) B6/l マウスのマクロファージ機能

このような MRL/l マウスのマクロファージ機能の亢進と主遺伝子 *lpr* との関連を検索するために、*lpr* 遺伝子の他の congenic mouse である B6/l マウスのマクロファージ機能について検討した。

B6/l では3.5カ月齢において、すでにリンパ節腫脹をきたしているが、4.5カ月齢に至っても B6/l マウスのリソソーム酵素活性の亢進は認められない ($P > 0.05$) (図3)。

図3 lysosomal enzyme activities of resident peritoneal macrophages of C57BL/6-*lpr/lpr* mice in various ages. See a legend of Fig. 1.

図4 chemiluminescence response of resident peritoneal macrophages of MRL/Mp-*lpr/lpr* and MRL/Mp-^{+/+} mice (2 or 5 months old)

(3) 活性酸素の放出

つぎに MRL/l マウスと MRL/n マウスの腹腔マクロファージならびに末梢血の chemiluminescence (ChL) を比較検討した。

MRL/l マウス5カ月齢において、MRL/n マウスにくらべ ChL のいちじるしい増加を認めるものが存在した(図4)。

上記の現象は、末梢血全血を試料として測定した場合においても同様に顕著であった(図5)。

考 察

本研究を通じて、MRL/l マウスの腹腔常在性マクロ

図5 chemiluminescence response of whole blood of MRL/Mp-*lpr/lpr* and MRL/Mp-*+/+* mice (2 or 5 months old)

ファージは、加齢とともにその胞体内リソソーム酵素活性のいちじるしい増加のみならず、活性酸素の増加を発現していることが明らかとなった(図1, 2, 4)。また、本実験において、末梢血全血の活性酸素の放出も亢進している MRL/l マウス個体が、加齢とともに増加することも明らかとなった(図5)。これらの事実は、MRL/l マウスに特徴的に認められる肉芽腫性動脈炎や関節炎、糸球体腎炎病巣において集簇して認められるマクロファージが、組織傷害性に作用しているという *in vivo* における病理組織学的所見⁵⁾ を支持するものである。

MRL/l マウスにおけるマクロファージの活性化は、*lpr* 遺伝子の発現によるリンパ節腫脹の顕著化とほぼ時期を同じくしている(図2)。すなわち、3.5カ月齢では、リンパ節腫脹にマウス個体差がめだち、マクロファージのリソソーム酵素活性もばらつきが多いが、5カ月齢に達しリンパ節腫脹が一様に顕著になる月齢では、同月齢の MRL/n マウス、2カ月齢の MRL/l マウスのマクロファージ機能を完全にうわまわると考えられる(図1, 2)。

lpr 遺伝子のコードする増殖性のリンパ球は、Thy1⁺、Ly-1⁺、Ly-5⁺(B220)のマーカーを有する異常T細胞とされ、この細胞増生をきたした脾細胞の培養上清中には、B細胞分化因子(BCDF)や IL-3 活性が検出されている⁶⁾。同時に筆者らは、マクロファージを活性化する物質も存在することを見出しており、MRL/l-MAF とした⁹⁾。これらのサイトカインが、このマウスに発現する多クローン性のB細胞の活性化のみなら

ず、マクロファージを活性化し、さらには、肉芽腫性炎の発現と深く係わっているものと考えられる。それゆえ、本研究における上述の事実は、*lpr* 遺伝子の発現そのものがマクロファージの活性化を促す可能性を示唆しているとも考えられる。

そこで、*lpr* 遺伝子の他の congenic マウスである B₆/l マウスの *lpr* 遺伝子の発現と、マクロファージ機能との関係を知る目的で、B₆/l マウスのマクロファージ機能を月齢別に測定した(図3)。この結果から、*lpr* 遺伝子の発現が顕著であってもマクロファージの活性化は認められず、マクロファージの活性化が *lpr* 遺伝子の発現そのものとは直接関連していないことが明らかとなった。

これらの事実は、MRL/l マウスの肉芽腫性病変に重要であると考えられるマクロファージ機能の亢進は、異常Tリンパ球の増殖をコードする主遺伝子 *lpr* とともに、その MRL 系マウスの有する遺伝的背景がきわめて重要であることを示唆している。

結 語

MRL/Mp-*lpr/lpr*(MRL/l) マウスのループス病変の発現、進展に及ぼす *lpr* 遺伝子の発現とマクロファージの役割についての解析を試み以下の結果を得た。

① *lpr* 遺伝子の congenic マウスである MRL/l マウスの腹腔常在性マクロファージのリソソーム酵素活性(Acid P-ase, GlcNAc-ase)、ならびに活性酸素の放出は、*lpr* 遺伝子を持たない MRL/Mp-*+/+*(MRL/n) マウスのそれにくらべていちじるしく亢進していた。

② MRL/l マウスの末梢血全血の活性酸素の放出も同様に亢進していた。

③ 一方、*lpr* 遺伝子の他の congenic マウスである C57BL/6-*lpr/lpr*(B₆/l) マウスでは、腹腔常在性マクロファージのリソソーム酵素活性は顕著には亢進していなかった。

これらの事実について、マクロファージの活性化と *lpr* 遺伝子の発現ならびに MRL マウスの遺伝的背景との関連において考察した。

文 献

- 1) 立脇 紀, 能勢真人, 佐々木淳子: MRL/l マウスのマクロファージ。炎症 4: 483-484, 1984.
- 2) Nose, M., Tachiwaki, O., Kyogoku, M.: Macrophage functions and their regulation in MRL/l lupus mice. New Horizons in Animal Models for Autoimmune Disease. (ed. Kyogoku, M., Wigzell, H.), Acad. Press, Tokyo, 1987, p 219-231.
- 3) 佐々木淳子, 立脇 紀, 能勢真人・他: マクロファージ胞体内酵素活性の微量定量法—マイクロプレート比色計を用いて—。免疫実験操作法 XIII:

- 4369, 1984.
- 4) Kato, T., Terui, T., Kuramoto, Y., Fujiyama T.: Suppression of zymosan-induced chemiluminescence of whole blood by conjugates composed of drug, guinea pig skin extracts and sera from patients with suspicious drug eruptions. *Tohoku. J. exp. Med.* 141: 433-441, 1983.
 - 5) 能勢真人, 川島正次, 京極方久: 動脈炎中膜傷害機構における membrane modification と cytotoxic mediator—SL/Ni と MRL/l 動脈炎の教えるもの一. *免疫と疾患* 1: 69-77, 1981.
 - 6) Prud'homme, G.J., Park, C.L., Fieser, T.M. et al.: Identification of B cell differentiation factor(s) spontaneously produced by proliferating T cell in murine lupus of the *lpr/lpr* genotype. *J. Exp. Med.* 157: 730-742, 1983.
 - 7) Palacios, R.: Spontaneous production of interleukin 3 by T lymphocytes from autoimmune MRL/MP-*lpr/lpr* mice. *Eur. J. Immunol.* 14: 599-605, 1984.
 - 8) 能勢真人, J. Andersson, H. Wigzell・他: マクロファージ分化・活性化因子とループスマウス MRL/lpr. *Pro. Jap. Soc. Immunol.* 14: 180, 1984.