

活性化好中球が放出する Heparin-binding protein と

輸血関連急性肺障害 (TRALI) との関連性の検討

保井 一太 古田 里佳 松山 宣樹 福森 泰雄 木村 貴文
谷 慶彦 柴田 弘俊 平山 文也

【目的】 TRALI の多くは輸血後短時間のうちに発症することが特徴である。また、その発症に抗体分子（白血球抗体、血小板抗体、免疫複合体など）が関与するという報告もあるが、詳細な機序については不明である。我々は、非溶血性輸血副作用に関わる因子の同定を目的とし、健康人血液を抗白血球抗体もしくは免疫複合体で刺激し、放出される種々の液性因子の量を経時的に測定した。さらに、その刺激を伝える受容体についても調べた。

【方法】 健康人全血に HLA class I 抗体もしくは擬似免疫複合体（熱重合させたヒト IgG）を加え、好中球上の CD11b 分子の発現量をフローサイトメーターで測定した（CD11b の発現量の増加は好中球活性化の指標の 1 つとされている）。また、反応上清中の種々の液性因子量（Perforin, IL-6, TNF- α , HBP : Heparin-Binding Protein）を経時的に ELISA 法で測定した。さらに、Fc γ レセプター IIIb, Fc γ レセプター IIa をモノクローナル抗体でブロックした場合の液性因子量も調べた。

【結果】 白血球抗体や擬似免疫複合体によって好中球が活性化された。活性化された好中球から血管透過性を高める HBP が刺激後 30 分以内という短時間で放出されが、他の液性因子（Perforin, IL-6, TNF- α ）は 30 分以内に放出されなかった。また、この HBP 放出は Fc γ レセプターを介する反応であった。

【考察】 HBP は抗体の関与する TRALI などの非溶血性輸血副作用発症に関与する重要な因子の 1 つと考えられた。

キーワード：TRALI, 免疫複合体, Heparin-Binding Protein, 好中球

本論文内容は、Blackwell Publishing 社の許可のもと Transfusion 誌（第 48 巻 第 5 号 978—987 2008 年）に最初に掲載された論文に基づき作成したものである。（Yasui, K., Furuta, R.A., Matsuyama, N., Fukumori Y., Kimura T., Tani, Y., Shibata, H., Hirayama, F.: Possible involvement of heparin-binding protein in transfusion-related acute lung injury. Transfusion. 48(5): 978—987, 2008）

第 55 回日本輸血・細胞治療学会総会推薦論文

はじめに

好中球は感染症の初期に働き、活性化し、感染部位に遊走することで生体を防御している¹⁾。末梢血中の好中球は、血管内皮細胞に粘着せずに循環しているが、いったん、感染、炎症などの刺激によって活性化されると、血管内皮細胞に接着し、その透過性を上昇させ、血漿とともに血管内皮細胞をすり抜け、速やかに目的組織に移動する¹⁾²⁾。このステップは、好中球が生体防御細胞として働く際の重要な第一歩である³⁾。

一方、好中球の生体防御機能（免疫機能）が自己組織の傷害に働く場合もある。その例として非溶血性輸血副作用などあげられるが^{4)~7)}、その詳細なメカニズムについては不明な部分が多い。非溶血性輸血副作用のうち最も重篤なものの一つとして輸血関連急性肺障害

(TRALI)があげられ、その症状として呼吸困難、低血圧、発熱などがあげられる。TRALI の発症頻度は輸血患者のうちの約 0.02% で、死亡率は発症者の 5~10% と報告されている^{8)~11)}。また、全血、血小板、凍結血漿など血漿を多く含む血液製剤ばかりでなく⁸⁾⁹⁾、血漿を少量しか含まない赤血球製剤でも TRALI の発症が確認されている⁸⁾⁹⁾¹¹⁾¹²⁾。ほとんどの TRALI 症例において、好中球に結合する抗体もしくは好中球の活性化に関与する抗原が原因製剤中に存在し、それによって肺障害が発生すると考えられている¹¹⁾。製剤中の HLA Class I, HLA Class II 抗体の存在は、1985 年の TRALI に関する初めての報告にはじまり数多く報告されている⁴⁾¹¹⁾。実際、HLA Class I 抗体は TRALI 重篤症例において高頻度に確認されている¹³⁾。また、Nishimura らは免疫複

合体による好中球の活性化も TRALI 発症の原因の一つと報告している¹⁴⁾。さらに、血液製剤中に含まれるある種の Lipid¹²⁾¹⁵⁾や CD40 ligand¹⁶⁾によっても好中球が活性化されると報告もある。

TRALI の発症には、活性化した白血球から放出される生理活性物質も大きく関与している。Nishimura らは、GM-CSF で処理した好中球に HLA Class II 抗体を反応させると、TNF- α 、IL-18 が産生されること¹⁷⁾、前処理をしない好中球でも免疫複合体を反応させると TNF- α 、Fas ligand が産生されること¹⁴⁾を報告している。また、Kopko らも同様に、lipopolysaccharide 処理した白血球に HLA Class I, HLA Class II 抗体を反応させると、細胞質での IL-1 β 、TNF- α の産生が上昇することを報告している¹⁸⁾。しかし、上記の monokine や cytokine は、抗体反応後 6 時間目にその産生が観察されはじめるが、輸血後 2 時間以内にその殆どが発症する TRALI の臨床症状とは少し異なる。これらの結果は、上記の monokine や cytokine は TRALI 発症に直接関与するものではなく、直接の TRALI 発症因子として他の生理活性物質が存在することを示唆する。

非活性型 serine protease の一つである Heparin-binding protein (HBP) は、azurocidin や CAP37 などの名前でも知られており、好中球の azurophilic 顆粒、secretory 小胞に存在する¹⁹⁾²⁰⁾。また、HBP は 2 つの機能を併せ持つタンパク質である。すなわち、広範囲とりわけグラム陰性菌に対する抗菌作用²¹⁾²²⁾と単球²³⁾、fibroblast²⁴⁾、T-リンパ球²⁵⁾および好中球²⁶⁾に対する化学遊走作用である。それに加えて HBP は、 β 2 インテグリンを介した刺激によって活性化された好中球による血管透過性の上昇にも関与する³⁾²⁷⁾²⁸⁾。 β 2 インテグリンは好中球の内皮細胞への化学遊走において主要なインテグリン分子で、内皮細胞との接着の際に接着分子として機能している²⁹⁾。この β 2 インテグリンを介する接着を模擬的に CD18 抗体によるクロスリンクで再現でき、上記論文ではこのクロスリンクによる好中球からの HBP の放出を観察している。さらに近年 Herwald らは、streptococcal toxic shock syndrome における血管外への血漿の漏れ、多臓器障害は β 2 インテグリンを介した活性化により好中球から放出された HBP が原因であることを示した²⁸⁾。そこで本研究では、抗体や免疫複合体の刺激によって好中球から HBP が放出されるか否かを検討した。また併せて、TRALI 発症における HBP の役割について論じることとする。

材料および方法

1. 血液および血清試料

用いた全血試料は、大阪府赤十字血液センター職員由来のものを使用し、その採血時には抗凝固剤として

ヘパリンを用いた。また、健常者血清および血漿も大阪府赤十字血液センター職員由来のものを使用した。白血球抗体を含む血清および血漿は血小板輸血不応症 (PTR) 患者由来のものを使用した。また、本実験は大阪府赤十字血液センターの倫理委員会の了承を得て行ったものである。

2. 試薬

モノクローナル抗体 (MoAb) : anti-CD16b (clone 3G8, Becton Dickinson 社), anti-CD32(clone 7.3, Ancell 社), anti-CD16b Fab(clone 3G8, Ancell 社), anti-CD32 Fab (clone 7.3, Ancell 社), anti-CD64 (clone 32.2, Abcam 社), anti-HLA Class I(clone W6/32, Cedarlane 社), FITC-anti-human IgG(Jackson ImmunoResearch 社), PE-anti-Mac-1(Becton Dickinson 社)を用い、陰性コントロールにはそれぞれFITC-mouse IgG1, PE-mouse IgG1(Becton Dickinson 社)を用いた。また、human IgG, mouse IgG は Jackson ImmunoResearch 社のものを用い、N-Formyl-L-methionyl-L-phenylalanine (fMLP) は Sigma 社のものを用いた。

3. 免疫複合体の作製

免疫複合体として、human IgG (10mg/ml) を 63°C で 20 分間インキュベートし、沈殿部分を遠心分離(10,000 g, 2 分間)で除去したものを用いた。この反応生成物を Native PAGE で分離し、全タンパク質量に対しゲルのウエルに入らない高分子重合体の比は 40~50%であった。以降の実験ではこの免疫複合体を PBS で目的濃度に希釈し、全血に添加した。

4. 全血を用いた活性化実験

全血 200 μ l に種々の刺激剤 (健常人血清 [血漿], 患者血清 [血漿], HLA Class I MoAb, mouse IgG, 熱重合ヒト IgG, ヒト IgG) 10 μ l を添加し、37°C で 30, 120, 360 分間インキュベートし、遠心分離(1,000g, 3 分間)にて血球と上清をそれぞれ分取した。血球はフローサイトメーター (FCM) で細胞表面抗原の発現を、上清は ELISA で放出された液性因子の濃度を、それぞれ測定した (詳細は下記)。また、抗体 (免疫複合体) の Fc レセプターへの結合阻害実験は、予め anti-CD16b MoAb (50 μ g/ml), anti-CD32 MoAb (50 μ g/ml) で処理した全血 (氷上で 15 分間インキュベート) を用いて行った。

5. FCM 測定

刺激後の全血より白血球を分画し、PBS-BSA (10 mM EDTA, 0.5% BSA) で洗浄し、同細胞を FITC-anti-human IgG MoAb もしくは PE-anti-Mac-1 MoAb で 4°C, 15 分間染色した。PBS-BSA (10 mM EDTA, 0.5% BSA) にて洗浄後、BD FACS Lysing Solution (Becton Dickinson 社) で溶血させ、好中球分画 (FSC, SSC および Mac-1 抗原の発現で同定) を FACSCalibur (Becton Dickinson 社) で測定した。

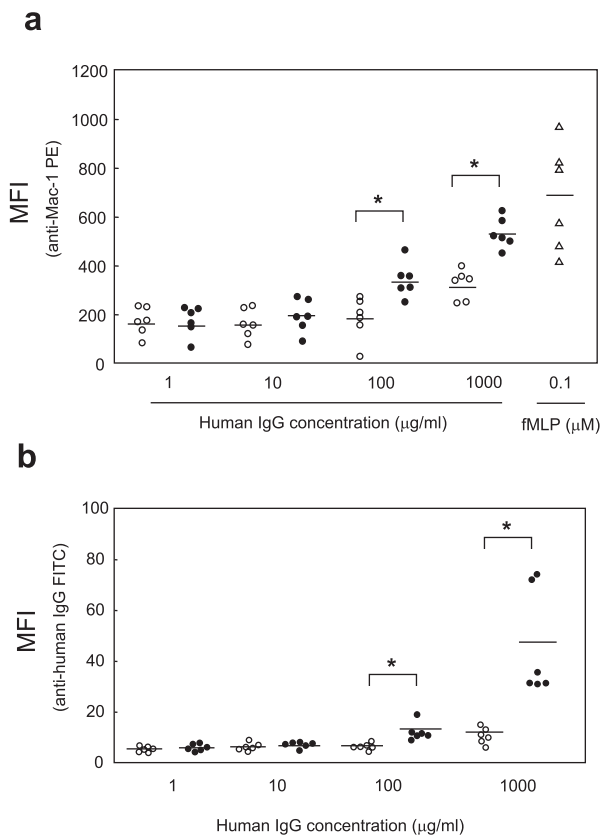


Fig. 1 Effects of IgG aggregates on neutrophils.

Whole blood cells were incubated with either human IgG (1, 10, 100, or 1,000 µg/ml, open circles), heat-aggregated human IgG (1, 10, 100, or 1,000 µg/ml, closed circles), or 0.1 µM fMLP (open triangles) as a positive control at 37 °C for 30 min. The stimulated blood cells were incubated on ice for 15 min with PE-conjugated anti-Mac-1 MoAb and FITC-conjugated anti-human IgG Ab. After removing red blood cells and washing, the mean fluorescence intensity (MFI) of the Mac-1 expression (a) and attachment of human IgG (b) on neutrophils were measured by FCM. Horizontal lines in each category indicate the mean value. * $p < 0.05$.

6. ELISA

上記4の活性化実験で得られた上清中のHBP濃度は、TapperらのELISA法を用いて測定した¹⁹⁾。ELISA用マイクロプレート(Nunc社, C8 Maxisorp)にanti-HBP MoAb(R&D社, 50µg/ml)を50µl添加し, 4°Cで一晩インキュベートし, 抗体を吸着させた。同プレートをT-PBS-BSA(PBS溶液に0.5% Tween20, 1% BSAを添加)でブロックした後(タンパク質の非特異結合障害), 1/6に希釈した上清(上記4)もしくは種々の濃度に希釈した組換えヒトHBP(R&D社)を加え, 37°Cで60分間インキュベートした。なお, 検体の希釈はCan Get Signal I溶液(Toyobo社)を用いた。T-PBS(PBS溶液に0.5% Tween20を添加)で洗浄後, anti-HBP polyclonal抗体(R&D社, 50µg/ml, 50µl/well)を37°Cで45分間反応させ, 洗浄後さらに結合した同

polyclonal抗体をhorseradish peroxidase-anti-goat IgG抗体(Promega社, 1/5,000希釈, 50µl/well)で検出した。発色はTMB発色溶液(Kirkegaard&Perry社)を用い, マイクロプレートリーダー(Corona社, MTP-120)で450nmの吸光度を測定した。また, IL-6, TNF-α, perforinの濃度測定は市販のELISA kit(IL-6: Biosource社, TNF-α: Pierce Biotechnology社, perforin: Mabtech社)を用いて行った。

7. 統計処理

統計学的検討はpaired *t* testを用いて行い, $p < 0.05$ である場合に有意差があるとした。

結 果

1. 免疫複合体(ヒトIgG複合体)による好中球の活性化

我々は, TRALI発症の引き金となる事象を解明するため, 全血を用いた活性化試験を行った。具体的には, 熱重合させたヒトIgG(疑似免疫複合体)もしくは熱重合させていないヒトIgGをそれぞれへパリン採血した全血に加えてインキュベートし, 好中球活性化マーカーの一つであるMac-1の発現上昇をFCMで測定した。Mac-1はβ-acetyl-γ-o-alkyl-α-phosphatidylcholine, phorbol 12-myristate 13-acetate, fMLPで活性化させた好中球表面でその発現上昇が確認されている³¹⁾³²⁾。我々も, 熱重合させたヒトIgGを添加した場合, 熱重合させていないヒトIgGに比べ, 有意に高いMac-1の発現上昇を観察しおり(Fig. 1a), この差は両者の好中球表面のFcγレセプターへの結合能の差とよく一致している³³⁾。実際, 両者の結合能をFITC-anti-human IgG MoAbを用いてFCMで測定したところ, 100µg/ml以上の濃度で熱重合させたヒトIgGが熱重合させなかったヒトIgGに比べ強く好中球に結合していた(Fig. 1b)。また, Mac-1の発現上昇は0.1µM以上のfMLP添加でプラトーとなり, 熱重合ヒトIgGでは1,000µg/mlに相当した(data not shown)。

2. FcγレセプターIIa, FcγレセプターIIIbを介した熱重合ヒトIgG刺激

熱重合ヒトIgGによる好中球の活性化が, 好中球表面のFcγレセプターIIa(CD32), FcγレセプターIIIb(CD16)を介したものかどうかを調べるため, それぞれのレセプターへのヒトIgG複合体の結合を特異的に阻害する抗体(anti-CD16 [clone 3G8], anti-CD32 [clone 7.3])³⁴⁾³⁵⁾を用い, 同抗体で前処理した全血について活性化試験を行った。前処理を行わなかった全血と比較して, anti-CD16抗体もしくはanti-CD32抗体のどちらか一方だけの前処理では有意なMac-1の発現上昇の抑制はみられなかった。しかし, 両方の抗体で前処理した全血では有意なMac-1の発現上昇の抑制がみられ(Fig.

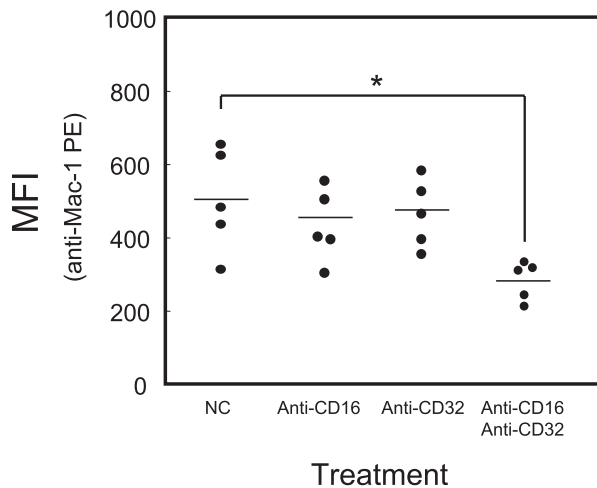


Fig. 2 Involvement of CD16 and CD32 molecules on neutrophil activation

Whole blood cells pre-incubated with 500 ng/ml mouse IgG as a negative control (NC), anti-CD16, anti-CD32, or both MoAbs were stimulated with 1 mg/ml heat-aggregated IgG. After removing red blood cells and washing, the MFI of the Mac-1 expression on neutrophils was measured by FCM. Horizontal lines in each category indicate the mean value. * $p < 0.05$

2), またヒト IgG 複合体の好中球への結合も有意に阻害されていた (data not shown). さらに, 他の好中球 Fc レセプターである CD64 について同様の実験を行ったが, CD64 単独の前処理では有意な Mac-1 の発現上昇の抑制はみられなかった (data not shown).

3. 熱重合ヒト IgG 刺激によって HBP が放出される

血液細胞では好中球のみが炎症性血管作動性因子である HBP を産生する¹⁹⁾. そこで, 全血を用いた反応系で活性化された好中球が HBP を放出するか否かを調べるため, 種々の濃度の fMLP と反応させた全血の上清中に含まれる HBP 濃度を測定した. fMLP 濃度 0.5~100 nmol/ml の範囲で, 濃度依存的な HBP の放出が確認され (data not shown), 全血を用いた反応系でも放出された HBP の定量が可能である. そこで, 同反応系で熱重合ヒト IgG 刺激後に好中球から HBP が放出されるか否かを検討した (Fig. 3a). 熱重合させていないヒト IgG 刺激では 100 μ g/ml 以上で HBP が放出されたが, 熱重合ヒト IgG 刺激ではわずか 1 μ g/ml で HBP が放出された. また, いずれの IgG 濃度においても IgG を熱重合することで 2 倍以上の HBP の放出が観察された. 以上より, 熱重合ヒト IgG は熱重合させていないヒト IgG と比較して, 有意に強く Mac-1 の発現上昇と HBP の放出を誘導すると考えられた.

次に, 熱重合ヒト IgG 刺激による HBP の放出が CD32, CD16 を介したものを調べるため, 上記 2 と同様の前処理を行った後, 放出された HBP を定量した. anti-

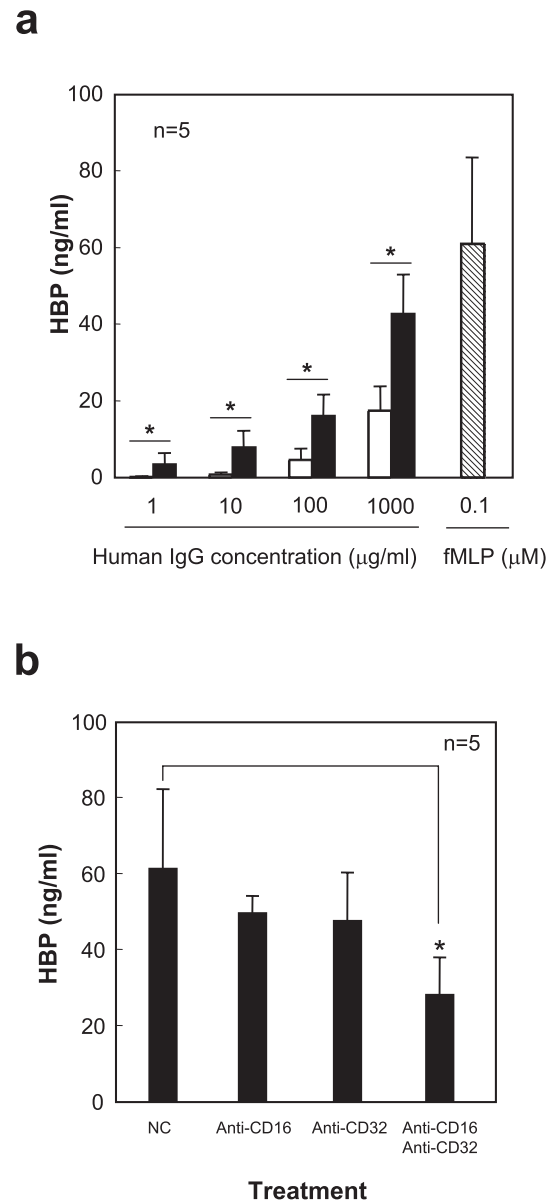


Fig. 3 Release of HBP from activated whole blood

(a) Whole blood cells were incubated with either human IgG (1, 10, 100, or 1,000 μ g/ml, open bars), heat-aggregated human IgG (1, 10, 100, or 1,000 μ g/ml, closed bars), or 0.1 μ M fMLP (diagonal bars) at 37 $^{\circ}$ C for 30 min. After removing cells by centrifugation, concentrations of HBP in the supernatants were measured by ELISA. (b) Whole blood cells pre-incubated with either 500 ng/ml mouse IgG (NC), anti-CD16, anti-CD32, or both MoAbs for 15 min on ice were stimulated with 1 mg/ml heat-aggregated human IgG at 37 $^{\circ}$ C for 30 min. Concentrations of HBP in the supernatants were measured by ELISA. The mean values \pm SD calculated from the results of five independent experiments are shown. * $p < 0.05$

CD16 抗体もしくは anti-CD32 抗体の一方だけの前処理では有意な HBP の放出の抑制はみられなかったが, 両者で前処理した場合は有意な抑制がみられ, その放出量は前処理しなかった場合の約 50% であった (Fig. 3

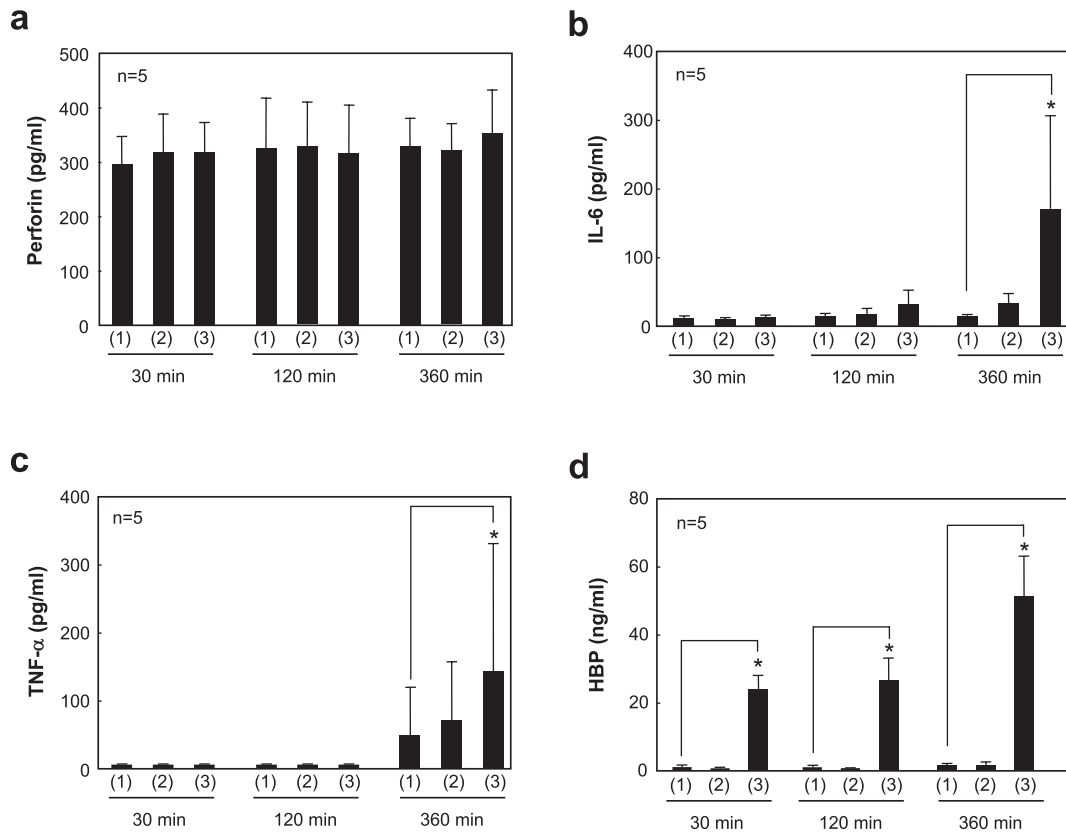


Fig. 4 Kinetics in the release of soluble mediators

Whole blood cells were incubated with PBS as negative control (1), 1,000 μg/ml human IgG (2), or 1,000 μg/ml heat-aggregated human IgG (3) at 37 °C. The supernatants were collected by centrifugation at for 30, 120, 360 min and the concentration of perforin (a), TNF-α (b), IL-6 (c), and HBP (d) in the supernatants were measured by ELISA. The mean values ±SD calculated from the results of five independent experiments are shown. * $p < 0.05$

b). また, anti-CD16 Fab 抗体および anti-CD32 Fab 抗体による前処理でも同様の結果が得られたが, anti-CD64 抗体単独の前処理では HBP 放出抑制はみられなかった (data not shown). これらの結果は, CD32 および CD16 を介した熱重合ヒト IgG 刺激によって好中球が活性化され (他の活性化経路の存在も考慮しなければならないが), 同細胞が HBP を放出することを示唆する.

4. 熱重合ヒト IgG 刺激に反応する HBP 以外の液性因子

これまでに, 免疫複合体 (IgG 複合体) 刺激によって白血球からの種々の液性因子 (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF-α, Fas ligand, perforin) の放出が報告されている¹⁴⁾³⁰⁾. これらは TRALI 発症に関わる候補因子と考えられている. 通常, TRALI の症状は輸血中あるいは輸血後 2 時間以内に現れるので, 我々はこれらのうち IL-6, TNF-α, perforin と前述の HBP について, その放出までの時間経過を測定した.

全血に 3 種類の刺激剤 (熱重合ヒト IgG, 熱重合させていないヒト IgG もしくは陰性コントロールとして PBS)

をそれぞれ添加し, 37°C で 30, 120, 360 分間インキュベート後, 上清中の種々の液性因子の濃度を ELISA 法で測定した. Perforin の放出はいずれの刺激でも有意な差はみられなかった (Fig. 4a). IL-6 の 30 分以内放出はいずれの刺激でも認められず, 120 分以内の熱重合ヒト IgG 刺激による放出がごく微量あった (Fig. 4b). 刺激後 360 分てようやく IgG 刺激による有意な IL-6 の放出がみられた (Fig. 4b) TNF-α の放出は 120 分以内ではいずれの刺激でも認められず, 360 分の熱重合ヒト IgG 刺激で有意な差がみられた (Fig. 4c). 一方, HBP の放出量はわずか 30 分の熱重合ヒト IgG 刺激で有意な増加がみられた (Fig. 4d). これらの結果と実際の TRALI 発症時間 (ほとんどは輸血後 2 時間以内) を対比した場合, HBP の放出反応のみが TRALI 発症の時間経過に一致していた.

5. HLA Class I 抗体刺激による HBP の放出

TRALI の発症には HLA 抗体, HNA 抗体, その他白血球抗体が関与する報告がされている^{4)~11)13)}. そこで, これらの抗体が熱重合ヒト IgG と同様に好中球を刺激するかどうかを確かめるため, 我々はまず, anti-HLA

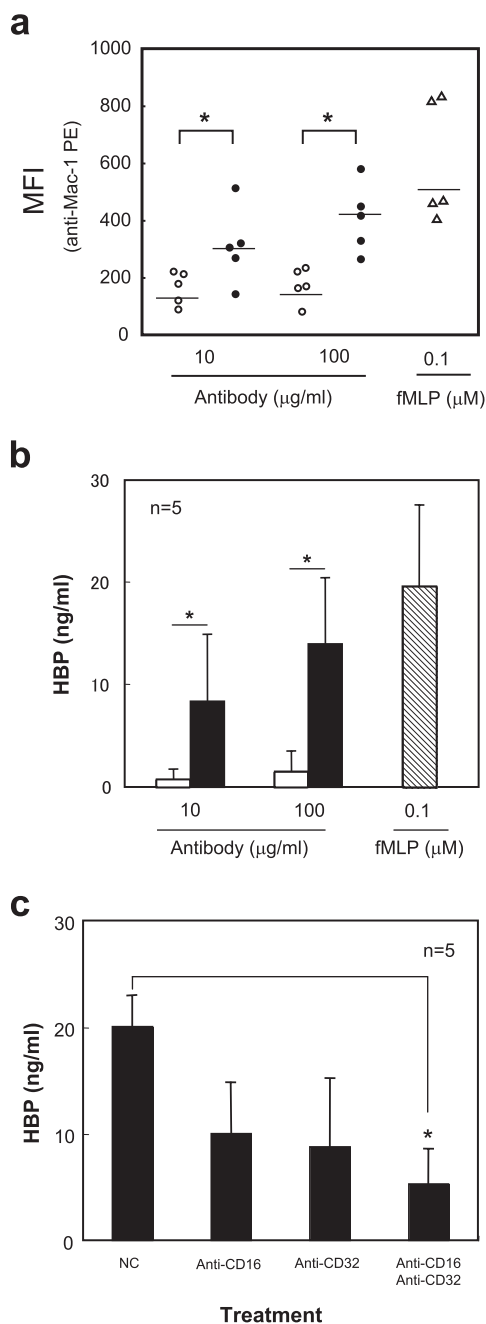


Fig. 5 Effects of an anti-HLA class I mAb on human neutrophil activation

Whole blood cells were incubated with either mouse IgG (10 or 100 μg/ml, open circles in (a) and open bars in (b)), anti-HLA class I MoAb (10 and 100 μg/ml, closed circles in (a) and closed bars in (b)), or 0.1 μM fMLP (open triangles in (a) and diagonal bar in (b)) at 37 °C for 30 min. The supernatants and leukocytes were separated by centrifugation. Mac-1 expression on neutrophils was examined by FCM (a), and concentrations of HBP in the cell supernatants were measured by ELISA (b). (c) Whole blood cells pretreated with either mouse IgG (NC), anti-CD16, anti-CD32, or both MoAbs were stimulated with 100 μg/ml anti-HLA MoAb and then concentrations of HBP in the supernatants were measured by ELISA. The mean values ±SD calculated from the results of five independent experiments are shown. *p < 0.05

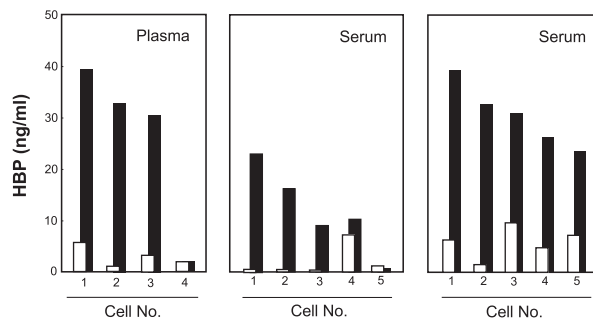


Fig. 6 HBP-releasing activity of sera or plasma containing anti-leukocyte antibodies

Whole blood cells from different healthy volunteers (cells No.1 to No.5) were incubated with plasma or serum samples from PTR patients (closed bar) or control healthy subjects (open bar) at 37 °C for 30 min. Then, the supernatants were collected by centrifugation and the concentration of HBP was measured by ELISA. The test sample 1 (plasma) and test sample 2 (serum) contained antibodies against HLA class I and the sample 3 (serum) contained antibodies against HLA class I and HNA-1a.

Class I (clone W6/32) MoAb で刺激による Mac-1 の発現と HBP の放出を測定した。全血を anti-HLA Class I MoAb で刺激すると、添加した抗体の量依存的に Mac-1 の発現上昇 (Fig. 5a) と HBP の放出量の増加 (Fig. 5b) が観察された。さらに、anti-HLA Class I MoAb 刺激による HBP の放出が CD32, CD16 を介したものを調べるため、ブロック抗体による前処理を行った後、放出された HBP を定量した。anti-CD16 抗体もしくは anti-CD32 抗体の一方だけの前処理でも HBP の放出が約 50% に抑制されたが、両方で前処理した場合はさらなる抑制がみられ、その放出量は前処理しなかった場合の約 25% であった (Fig. 5c)。

次に、HLA Class I 抗体を含む 3 種類の PTR 患者血漿・血清 (Test samples 1~3) を用い、これまでと同様の活性化試験を行い、放出される HBP を測定した。Test sample 1 は血漿で、4 人中 3 人の健康人血球と反応し、有意な HBP の放出が確認された (Fig. 6 left panel)。なお、HBP 放出がなかった血球 (好中球, Cell No. 4) と Test sample 1 中の抗体との結合はみられなかった (data not shown)。Test sample 2 は血清で、5 人中 4 人の健康人血球で有意な HBP 放出が確認され (Fig. 6 middle panel)、Test sample 1 と同様、抗体結合のない血球 (Cell No. 5) からは HBP の放出は観察されなかった (data not shown)。Test sample 3 も血清で、幅広い特異性をもつ HLA Class I 抗体と HNA-1a 抗体を含んでおり、すべての血球と反応し、有意な HBP の放出がみられた (Fig. 6 right panel)。これらの結果は、熱重合ヒト IgG だけでなく HLA 抗体, HNA 抗体を含むヒト血漿・血清も HBP 放出を促すことを示すものである。

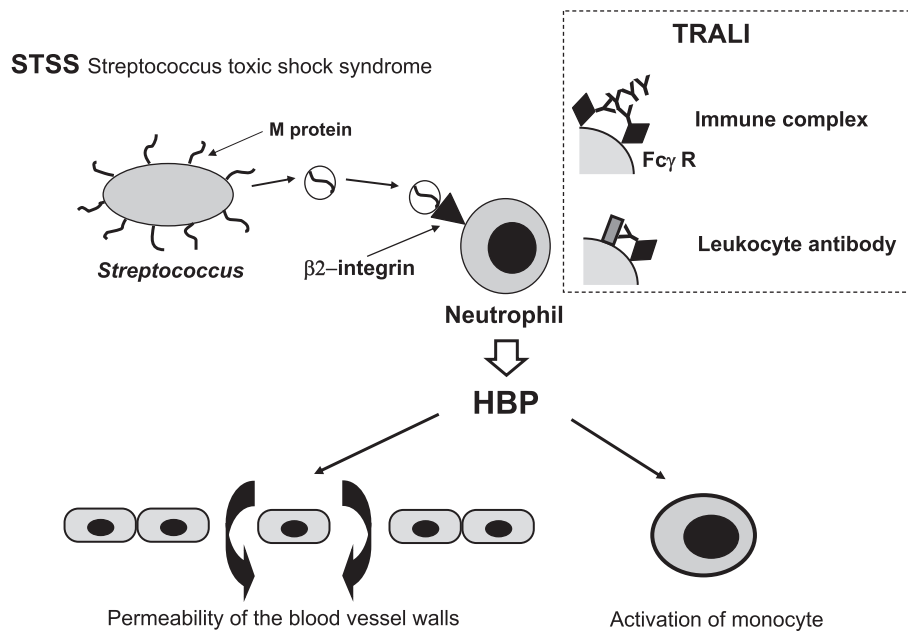


Fig. 7 Possible involvement of HBP in TRALI

考 察

我々は全血を用いた活性化実験を行い、免疫複合体や白血球抗体により好中球が活性化され、種々の液性因子とりわけHBPを放出することを示した。我々が全血を用いた理由は、精製した好中球に比べ、検体の準備が容易で実験環境が生体内に近いと考えたからである。白血球抗体は好中球だけではなく、他の血球細胞や血小板に発現する分子にも結合し、免疫複合体を形成し、結果として間接的に好中球の活性化に影響すると考えられるからである。

抗原・抗体反応によって形成される免疫複合体はTRALIも含め炎症性疾患の原因の一つと考えられている¹⁴⁾³⁶⁾³⁷⁾。実際、Nishimuraらは免疫複合体によるTRALI発症の可能性を報告している¹⁴⁾。LooneyらはTRALI発症原因の一つとして、HLA Class I抗体が好中球上のHLA Class I抗原と結合し、さらに血漿中の可溶性HLA Class I抗原と免疫複合体を形成し、Fc γ レセプターを介した好中球の活性化を誘導することを報告している³⁸⁾。また、Fc γ レセプターを介した活性化には血漿中の可溶性HLA Class I抗原の存在が必須であり、反応系より同抗原を除去するとこの活性化は起こらないことも報告している³⁸⁾。そこで、我々もまず免疫複合体による好中球の活性化実験を試みた。我々は、抗原・抗体反応による免疫複合体を準備できなかったため、広く一般的に免疫複合体として用いられている熱重合させたヒトIgGを免疫複合体として用い³⁰⁾、Fcレセプター(CD16, CD32)を介した好中球の活性化を検出することができた(Fig. 2, 3)。

我々は、活性化実験によっていくつかの液性因子、

すなわちTNF- α 、IL-6、HBPの放出を確認した(Fig. 4)。これらのうち、TRALIの臨床症状と同様に刺激後短時間で(2時間以内)放出されたものはHBPのみであった(Fig. 4)。HBPが刺激後短時間で放出された理由として、同分子が好中球顆粒タンパク質(azurophilic granuleおよびsecretory vesicle中に存在)であることが考えられる¹⁹⁾。すなわち、顆粒タンパク質は刺激後すぐに放出されるのに対し、TNF- α やIL-6などはタンパク質合成ステップを経るため、その放出に時間を要するからである³⁹⁾。実際、我々は代表的なsecretory vesicleタンパク質であるMac-1⁴⁰⁾が熱重合IgGおよびanti-HLA Class I MoAb刺激後30分で放出され増加することを観察した(Fig. 1, 5)。さらに、代表的なazurophilic granuleタンパク質であるelastaseも刺激後30分での放出も確認した(data not shown)。

生体防御において、感染部位や炎症部位への白血球の遊走は最も重要な免疫反応の一つである⁴¹⁾⁴²⁾。その初期段階を担うのが好中球で⁴¹⁾、それに続く単球の遊走・活性化²³⁾、Tリンパ球の遊走²⁵⁾などは同細胞が放出するHBPなどによって促される。また、HBPは内皮細胞と繊維芽細胞の結合分離⁴³⁾、単球でのTNF- α の産生促進⁴⁴⁾、血管内皮細胞の透過性の促進²⁷⁾などにも作用する。さらに我々は、 $\beta 2$ インテグリンを介した接着刺激³⁾²⁷⁾²⁸⁾だけでなく、免疫複合体や白血球抗体刺激によって活性化された好中球からもHBPが放出されることを示した(Fig. 7)。

白血球抗体はTRALI発症に関与する主要な刺激因子の一つと考えられており、その刺激から発症に至る機序を解明することは非常に重要である。我々は、疑似

免疫複合体だけでなく HLA Class I 抗体を含む患者血漿・血清による刺激によって HBP の放出を確認した (Fig. 6). 我々の実験方法は 200 μ l の全血に被検血漿・血清を 10 μ l 加えている. この条件は循環血液量 5l の患者に対して, 白血球抗体を含んだ 250 μ l の新鮮凍結血漿 (FFP) または血小板製剤 (PLT) を輸血したことになり, 実際の輸血の割合をよく再現している. また, 血清検体だけでなく臨床条件により近い血漿検体を用いて実験できたことも意義深い. 以上のように, 我々の実験は実際の輸血に近い条件で行っていることから, 試験管内のみならず生体内においても抗体刺激により活性化された好中球より HBP が放出されると考えてよいであろう.

文 献

- 1) Wedmore CV, Williams TJ: Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. *Nature*, 289: 646—650, 1981.
- 2) Arfors KE, Lundberg C, Lindbom L, et al: A monoclonal antibody to the membrane glycoprotein complex CD18 inhibits polymorphonuclear leukocyte accumulation and plasma leakage in vivo. *Blood*, 69: 338—340, 1987.
- 3) Gautam N, Herwald H, Hedqvist P, et al: Signaling via β 2 integrins triggers neutrophil-dependent alteration in endothelial barrier function. *J. Exp. Med.*, 191: 1829—1839, 2000.
- 4) Popovsky MA, Moore SB: Diagnostic and pathogenetic considerations in transfusion-related acute lung injury. *Transfusion*, 25: 573—577, 1985.
- 5) Eastlund DT, Charbonneau TT, Steinmetz J: Granulocyte antibody detection to diagnose immune granulocytopenia and transfusion reaction due to leucocyte incompatibility. *Hematol. Rev.*, 6: 201—205, 1992.
- 6) Bux J, Becker F, Seeger W, et al: Transfusion-related acute lung injury due to HLA-A2-specific antibodies in recipient and NB1-specific antibodies in donor blood. *Br. J. Haematol.*, 93: 707—713, 1996.
- 7) Davoren A, Curtis BR, Shulman IA, et al: TRALI due to granulocyte-agglutinating human neutrophil antigen-3a (5b) alloantibodies in donor plasma: a report of 2 fatalities. *Transfusion*, 43: 641—645, 2003.
- 8) Kleinman S, Caulfield T, Chan P, et al: Toward an understanding of transfusion-related acute lung injury: statement of a consensus panel. *Transfusion*, 43: 177—189, 2004.
- 9) Webert KE, Blajchman MA: Transfusion-related acute lung injury. *Transfus. Med. Rev.*, 17: 252—262, 2003.
- 10) Bux J: Transfusion-related acute lung injury (TRALI): a serious adverse event of blood transfusion. *Vox Sang.*, 89: 1—10, 2005.
- 11) Bux J, Sachs UJH: The pathogenesis of transfusion-related acute lung injury (TRALI). *Br. J. Haematol.*, 136: 788—799, 2007.
- 12) Silliman CC, Voelkel NF, Allard JD, et al: Plasma and lipids from stored packed red blood cells cause acute lung injury in an animal model. *J. Clin. Invest.*, 101: 1458—1467, 1998.
- 13) Holness L, Knippen MA, Simmons L, et al: Fatalities caused by TRALI. *Transfus. Med. Rev.*, 18: 184—188, 2004.
- 14) Nishimura M, Ishikawa Y, Satake M: Activation of polymorphonuclear neutrophils by immune complex: possible involvement in development of transfusion-related acute lung injury. *Transfus. Med.*, 14: 359—367, 2004.
- 15) Khan SY, Kelher MR, Heal JM, et al: Soluble CD40 ligand accumulates in stored blood components, primes neutrophils through CD40, and is a potential cofactor in the development of transfusion-related acute lung injury. *Blood*, 108: 2455—2462, 2006.
- 16) Silliman CC, Paterson AJ, Dickey WO, et al: The association of biologically active lipids with the development of transfusion-related acute lung injury: a retrospective study. *Transfusion*, 37: 719—726, 1997.
- 17) Nishimura M, Mitsunaga S, Ishikawa Y, et al: Possible mechanisms underlying development of transfusion-related acute lung injury: roles of anti-major histocompatibility complex class II DR antibody. *Transfus. Med.*, 13: 141—147, 2003.
- 18) Kopko PM, Paglieroni TG, Popovsky MA, et al: TRALI: correlation of antigen-antibody and monocyte activation in donor-recipient pairs. *Transfusion*, 43: 177—184, 2003.
- 19) Tapper H, Karlsson A, Morgelin M, et al: Secretion of heparin-binding protein from human neutrophils is determined by its localization in azurophilic granules and secretory vesicles. *Blood*, 99: 1785—1793, 2002.
- 20) Watorek W: Azurocidin-inactive serine proteinase homolog acting as a multifunctional inflammatory mediator. *Acta Biochimica Polonica*, 50: 743—752, 2003.
- 21) Shafer WM, Martin LE, Spitznagel JK: Late Intraphagosomal hydrogen ion concentration favors the in vitro antimicrobial capacity of a 37-kilodalton cationic granule protein of human neutrophil granulocytes. *Infect Immun*, 53: 651—655, 1986.

- 22) Gabay JE, Scott RW, Campanelli D, et al: Antibiotic proteins of human polymorphonuclear leukocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 5610—5614, 1989.
- 23) Pereira HA, Shafer WM, Pohl J, et al: CAP37, a human neutrophil-derived chemotactic factor with monocyte specific activity. *J Clin Invest*, 85: 1468—1476, 1990.
- 24) Flodgaard H, Ostergaard E, Bayne S, et al: Covalent structure of two novel neutrophil leukocyte-derived proteins of porcine and human origin. Neutrophil esterase homologues with strong monocyte and fibroblast chemoattractive activities. *Eur J Biochem*, 197: 535—547, 1991.
- 25) Chertov O, Michiel DF, Xu L, et al: Identification of defensin-1, defensin-2 and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8 stimulated neutrophils. *J Biol Chem*, 271: 2935—2940, 1996.
- 26) Chertov O, Ueda H, Xu LL, et al: Identification of human neutrophil-derived cathepsin G and azurocidin/CAP37 as chemoattractants for mononuclear cells and neutrophils. *J Exp Med*, 186: 739—747, 1997.
- 27) Gautam N, Olofsson AM, Herwald H, et al: Heparin-binding protein (HBP/CAP37): A missing link in neutrophil-evoked alteration of vascular permeability. *Nature Med*, 7: 1123—1127, 2001.
- 28) Herwald H, Cramer H, Morgelin M, et al: M protein, a classical bacterial virulence determinant, forms complexes with fibrinogen that induce vascular leakage. *Cell*, 116: 367—379, 2004.
- 29) Vedder NB, Harlan JM: Increased surface expression of CD11b/CD18 (Mac-1) is not required for stimulated neutrophil adherence to cultured endothelium. *J. Clin. Invest.*, 81: 676—682, 1988.
- 30) Hart SP, Alexander KM, Dransfield I: Immune complexes bind preferentially to FcγRIIA (CD32) on apoptotic neutrophils, leading to augmented phagocytosis by macrophages and release of proinflammatory cytokines. *J. Immunol.*, 172: 1882—1887, 2004.
- 31) Klugewitz K, Ley K, Schuppan D, et al: Activation of the β2 integrin Mac-1 (CD11b/CD18) by an endogenous lipid mediator of human neutrophils and HL-60 cells. *J. Cell Science*, 110: 985—990, 1997.
- 32) Diez-Fraile A, Meyer E, Paape MJ, et al: Analysis of selective mobilization of L-selectin and Mac-1 reservoirs in bovine neutrophils and eosinophils. *Vet. Res.*, 34: 57—70, 2003.
- 33) Tamm A, Kister A, Nolte UK, et al: The IgG binding site of human FcγIIIb receptor involves CC' and FG loops of the membrane-proximal domain. *J. Biol. Chem.*, 271: 3659—3666, 1996.
- 34) Tamm A, Schmidt RE: The binding epitopes of human CD16 (FcγR III) monoclonal antibodies. *J. Immunol.*, 157: 1576—1581, 1996.
- 35) Aicher A, Hayden-Ledbetter M, Brady WA, et al: Characterization of human inducible costimulator ligand expression and function. *J. Immunol.*, 164: 4689—4696, 2000.
- 36) Yamaguchi H, Takeuchi H, Torikata C, et al: Experimental pulmonary fibrosis induced by soluble immune complex and 60% oxygen atmosphere. *Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol.*, 49: 464—477, 1975.
- 37) Guo RF, Ward PA: Mediators and regulation of neutrophil accumulation in inflammatory responses in lung: insights from the IgG immune complex model. *Free Radic. Biol. Med.*, 33: 303—310, 2002.
- 38) Looney MR, Su X, Van Ziffle JA, et al: Neutrophils and their Fcγ receptors are essential in a mouse model of transfusion-related acute lung injury. *J. Clin. Invest.*, 116: 1615—1623, 2006.
- 39) Altstaedt J, Kirchner H, Rink L: Cytokine production of neutrophils is limited to interleukin-8. *Immunology.*, 89: 563—568, 1996.
- 40) Jones DH, Anderson DC, Burr BL, et al: Quantitation of intercellular Mac-1 (CD11b/CD18) pools in human neutrophils. *J. Leukocyte Biol.*, 44: 535—544, 1988.
- 41) Soehnlein O, Xie X, Ulbrich H, et al: Neutrophil-derived heparin-binding protein (HBP/CAP37) deposited on endothelium enhances monocyte arrest under flow conditions. *J. Immunol.*, 174: 6399—6405, 2005.
- 42) Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, et al: Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab. Invest.*, 80: 617—653, 2000.
- 43) Ostergaard E, Flodgaard H: A neutrophil-derived proteolytic inactive elastase homologue (hHBP) mediates reversible contraction of fibroblasts and endothelial cell monolayers and stimulates monocyte survival and thrombospondin secretion. *J. Leukoc. Biol.*, 51: 316—323, 1992.
- 44) Heinzelmann M, Mercer-Jones MA, Flodgaard H, et al: Heparin-binding protein (CAP37) is internalized in monocytes and increases LPS-induced monocyte activation. *J. Immunol.*, 160: 5530—5536, 1998.

POSSIBLE INVOLVEMENT OF HEPARIN-BINDING PROTEIN IN TRANSFUSION-RELATED ACUTE LUNG INJURY

*Kazuta Yasui, Rika A. Furuta, Nobuki Matsuyama, Yasuo Fukumori, Takafumi Kimura, Yoshihiko Tani,
Hirotohi Shibata and Fumiya Hirayama*

Japanese Red Cross Osaka Blood Center

Keywords:

TRALI, heparin-binding protein, neutrophil, immune complex

©2009 The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy

Journal Web Site: <http://www.yuketsu.gr.jp>