

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790192

研究課題名 (和文) 活性酸素産生酵素のアレルギー疾患への関与の解明

研究課題名 (英文) A study on the involvement of NADPH oxidase in allergic diseases

研究代表者

勝山 真人 (KATSUYAMA MASATO)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：60315934

研究成果の概要：I型アレルギーや炎症に重要な役割を果たすマスト細胞において、活性酸素産生酵素 NOX1 が果たす役割を解明することを試みた。マスト細胞の成熟や機能への関与を示唆するデータは得られなかったが、NOX1 は顆粒膜上に局在し、無刺激時には顆粒内に活性酸素を放出しているが、脱顆粒に伴い細胞外に放出するようになると考えられた。NOX1 により産生される活性酸素がマスト細胞のメディエーターのひとつであることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	0	2,500,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	240,000	3,540,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：NADPH オキシダーゼ、マスト細胞、アレルギー

1. 研究開始当初の背景

活性酸素は生体内において、感染微生物を死滅させる「善玉」としての作用と、脂質過酸化などにより生体にダメージを与える「悪玉」としての作用を持つことが知られてきた。「善玉」としての作用については、主に好中球において研究が進められ、活性酸素産生酵素である NADPH オキシダーゼの触媒サブユニットの一種・NOX2 (gp91phox) の変異が、慢性肉芽腫症の原因であることが明らかにされた。一方「悪玉」としての作用については、糖尿病や動脈硬化症といった生活習慣病における血管病変形成への関与が証明されて

きた。NADPH オキシダーゼは複数のサブユニットから構成される複合体である。近年 NOX2 のホモログが相次いで同定され、NADPH オキシダーゼの触媒サブユニットには NOX1 から NOX5 までの5種類が存在することが明らかとなった。

申請者はこれまで、NOX1 の機能について解析を行ってきた。プロスタグランジン (PG) F2 α が NOX1 の発現誘導を介して血管平滑筋細胞を肥大させることを見出し、この発現誘導が、PKC δ 、EGF 受容体、PI3 キナーゼ、転写因子 ATF-1 の活性化により引き起こされることを明らかにした。さらに血管平滑筋細胞

には大腸上皮細胞とは異なる N 末端アミノ酸配列を持つ NOX1 が発現し、その発現が血管平滑筋細胞の脱分化に伴い増加することを見出し、その発現調節機構を明らかにした。また所属研究室で作製した NOX1 ノックアウトマウスを用いた解析により、NOX1 由来の活性酸素がアンギオテンシン II による血圧上昇に必須であることを見出した。

好中球における NOX2 の研究に比し、血球系の細胞における他の NOX アイソフォームの発現についてはこれまでほとんど解析されてこなかった。

2. 研究の目的

申請者は、血球系細胞における各 NOX アイソフォームの生理機能を探索するためその発現を解析したところ、癌化マスト細胞株 P-815 細胞と好塩基球性白血病細胞株 RBL-2H3 細胞において、NOX1 が発現することを見出した。

マスト細胞の脱顆粒に活性酸素が関与することが以前から報告されている。マスト細胞は I 型アレルギーや炎症に重要な役割を果たす細胞である。ヒスタミンやエイコサノイドといったアレルギー・炎症のメディエーターを顆粒中に貯蔵しており、外部からの刺激に誘発された脱顆粒によりメディエーターが放出される。

NADPH オキシダーゼを含むフラビン酵素の阻害薬である diphenyleneiodonium が、抗原刺激による RBL-2H3 細胞での活性酸素産生とヒスタミンの遊離を抑制すること、また抗原刺激によるマスト細胞表面での高親和性イムノグロブリン E 受容体 (FcεRI) のクロスリンクが細胞内での活性酸素産生を促進することが報告されている。これらの報告と申請者の基礎検討の結果を考え合わせると、NOX1 がマスト細胞の脱顆粒に関わる活性酸素を産生している可能性が非常に高い。そこで NOX1/NADPH オキシダーゼがマスト細胞の脱顆粒に関与するという仮説を立て、NOX1 ノックアウトマウス由来マスト細胞を用い、NOX1 のマスト細胞における役割を解明することを試みた。

3. 研究の方法

(1) 骨髄由来マスト細胞 (BMNC) の培養

8~10 週齢のマウス大腿骨・脛骨から骨髄を単離し、IL-3 を含む培地で 4~6 週間培養した。

(2) 活性酸素 (スーパーオキシド) の定量

NADPH 存在下、ルシゲニンの発光を指標としてスーパーオキシド産生を測定した。

(3) 脱顆粒の測定

細胞を抗 DNP-IgE で感作し、DNP-HSA で刺

激して脱顆粒させた。放出される β-ヘキソサミニダーゼ活性は、4-Nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosamide を基質として生成する p-nitrophenol を比色定量することにより求めた。

(4) ヒスタミンの定量

細胞を過塩素酸沈殿による除蛋白、ブタノール・ヘプタンによるアミン抽出にかけ、得られたサンプル中のヒスタミンを HPLC (カラム: WCX-1) により定量した。

(5) 腹腔マスト細胞の染色

腹水より採取した細胞を遠心によりスライドガラスに貼り付け、トルイジンブルーまたはアルシアンブルー/サフラニンで染色した。

(6) 腹腔マスト細胞のプロテアーゼ活性の測定

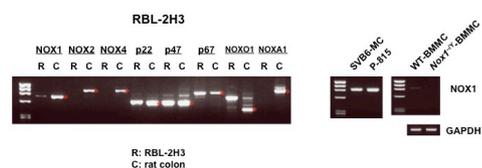
腹水より採取した細胞のキモトリプシン様活性 (基質: MeO-Suc-Arg-Pro-Tyr-pNA)、トリプシン様活性 (基質: H-D-Ile-Pro-Arg-pNA)、カルボキシペプチダーゼ A 活性 (基質: MeO-Ph-N=N-Phe-COOH) を、比色定量により求めた。

4. 研究成果

(1) マスト細胞における NADPH オキシダーゼサブユニットの発現

まずラット好塩基球性白血病細胞株 RBL-2H3 細胞における NADPH オキシダーゼサブユニットの発現を RT-PCR により解析した。触媒サブユニットの NOX については NOX1 のみが発現していた。その他 p22、p47、p67 の発現が認められたが、NOX01 と NOXA1 の発現は認められなかった。SV40 large T 抗原トランスジェニックマウス骨髄由来のマスト細胞株である SVB6-MC や、マウス骨髄由来初代培養マスト細胞 (BMNC) においても NOX1 の発現が認められた。

マスト細胞における NADPH オキシダーゼサブユニットの発現

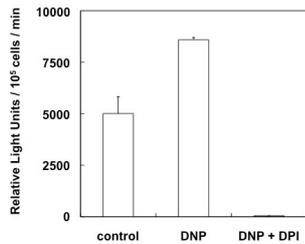


(2) 抗原刺激による活性酸素産生の検討

RBL-2H3 細胞や SVB6-MC 細胞を用い、抗原

刺激に伴う活性酸素の産生をルシゲニンの発光を指標に測定した。無刺激時においても活性酸素の産生は認められたが、抗原刺激に伴いその量は有意に増加した。NADPH オキシダーゼ阻害薬である diphenyleneiodonium の存在下では、無刺激時および抗原刺激に伴う活性酸素産生はほぼ完全に抑制された。

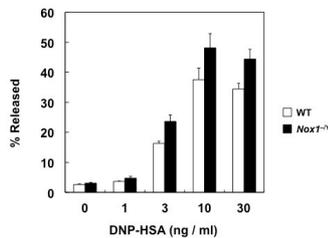
SVB6-MCの抗原刺激によるスーパーオキシド産生



(3) 脱顆粒の検討

NOX1 の脱顆粒への関与の有無について検討した。野生型および NOX1 遺伝子欠損 (NOX1-KO) マウスの BMMC を培養し、抗原刺激による脱顆粒を β -ヘキソサミニダーゼ活性を指標に計測したが、両者の脱顆粒の程度に有意な差は認められなかった。

BMMCの抗原刺激による脱顆粒



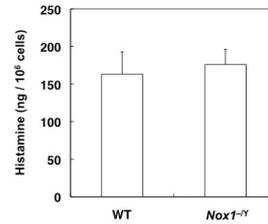
またカルシウムイオノフォアによる脱顆粒にも野生型と NOX1-KO で差は認められなかった。さらに BMMC を stem cell factor と nerve growth factor の存在下で成熟型のマスト細胞に分化させた後脱顆粒の程度を比較したが、抗原刺激、compound 48/80 刺激のどちらにおいても野生型と NOX1-KO で差は認められなかった。

以上の結果、NOX1 由来の活性酸素はマスト細胞の脱顆粒には関与しないと考えられた。

(4) ヒスタミン含量の検討

BMMC のヒスタミン含量を測定したが、野生型と NOX1-KO で有意な差は認められなかった。

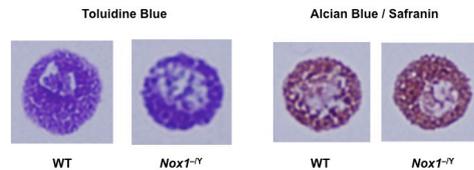
BMMCのヒスタミン含量



(5) 染色像の検討

成熟型のマスト細胞とされる腹水中の腹腔マスト細胞をスライドガラスに貼り付け、マスト細胞の顆粒を染色した。しかしトルイジンブルー染色、アルシアンブルー/サフラン染色のどちらにおいても、野生型と NOX1-KO で染色像の違いは認められなかった。

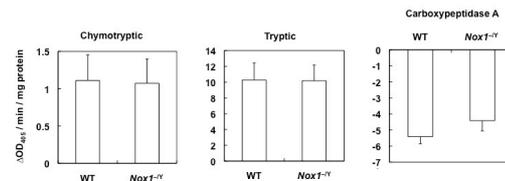
腹腔マスト細胞の染色像



(6) プロテアーゼ活性の検討

腹腔マスト細胞を腹水から回収し、マスト細胞プロテアーゼであるキマーゼ、トリプターゼ、およびカルボキシペプチダーゼ A の活性を測定した。しかしどの酵素の活性についても、野生型と NOX1-KO で有意な差は認められなかった。

腹腔マスト細胞のプロテアーゼ活性

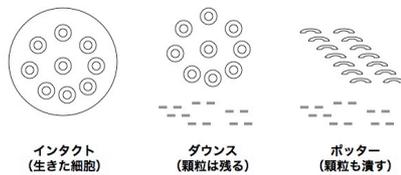


野生型と NOX1-KO でヒスタミン含量、染色像、プロテアーゼ活性に差が認められなかったことから、NOX1 由来の活性酸素はマスト細胞の分化、成熟には関与しないと考えられた。

(7) 活性酸素産生量とホモジナイズの影響

BMMC の活性酸素産生量を、膜非透過型プローブであるルシゲニンの化学発光を指標に測定したところ、野生型と NOX1-KO で差が認められなかった。このことから NOX1 が細胞膜上には局在しないと考えられた。また抗原刺激によりルシゲニンで検出される活性酸素量が増加することから、NOX1 は顆粒の内側に向けて活性酸素を産生していることが予想された。そこで細胞をホモジナイズすることで検出される活性酸素量が増加するのではないかと考え検討を加えた。

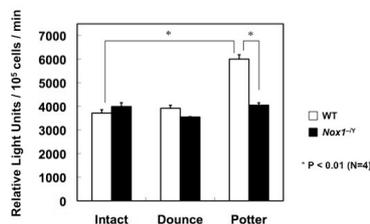
ホモジナイズの影響



→細胞をホモジナイズすることでスーパーオキシドの検出量が増加するのでは？

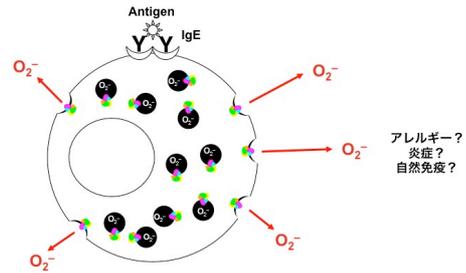
ホモジナイズしない細胞、あるいはルースなダウンスホモジナイザーで処理した細胞では、野生型と NOX1-KO で活性酸素の検出量に差は認められなかった。しかしタイトなポッターホモジナイザーで処理した細胞では、検出される活性酸素量が野生型でのみ有意に増加した。

野生型マウスBMMCではホモジナイズによりスーパーオキシド検出量が増加する



以上のことから、NOX1 は顆粒膜上に局在し、無刺激時には顆粒内に活性酸素を放出しているが、脱顆粒に伴い細胞外に放出するようになると考えられた。

マスト細胞とNOX1由来スーパーオキシド



本研究により、NOX1/NADPH オキシダーゼによって産生される活性酸素は、マスト細胞の機能や分化に関わる細胞内情報伝達分子ではなく、マスト細胞から放出されて作用するメディエーターのひとつであることが示唆された。マスト細胞の機能を考えたとき、アレルギーや炎症、自然免疫に関与する可能性が高いが、現在のところ NOX1-KO マウスにおいてこれらの事象に関連した顕著な表現型は認められていない。今後の検討を要する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

勝山真人、谷川成佑、田中智之、阪中麻利子、矢部千尋. NOX1/NADPH オキシダーゼのマスト細胞における発現. 第 82 回日本薬理学会年会. 2009 年 3 月 17 日. 横浜.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勝山 真人 (KATSUYAMA MASATO)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：60315934