

平成 21 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)
研究期間：2007～2008
課題番号：19790534
研究課題名(和文) 単球による抗炎症性生理活性物質エポキシエイコサトリエン酸の産生
研究課題名(英文) Study on production of epoxyeicosatrienoic acid, an anti-inflammatory lipid mediator, in human monocytes

研究代表者
日塔 武彰 (NITTO TAKEAKI)
横浜薬科大学・薬学部・講師
研究者番号：00301036

研究成果の概要

RT-PCR 法とイムノブロットング法による解析の結果、ヒト単球はエポキシエイコサトリエン酸(EET)の合成酵素 CYP2J2 を発現していることが明らかになった。またヒト単球は細胞内で EET を生合成していることが示唆された。ヒト単球をマクロファージに分化誘導すると、経時的に CYP2J2 の発現も上昇した。分化後のマクロファージにおいて CYP2J2 は細胞質に存在することが免疫組織染色の結果から明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,000,000	510,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：単球、分化、マクロファージ、CYP エポキシゲナーゼ、CYP2J2、エポキシエイコサトリエン酸、ジヒドロキシエイコサトリエン酸

1. 研究開始当初の背景

エポキシエイコサトリエン酸(epoxyeicosatrienoic acid, EET、以下 EET)は、ホスホリパーゼ A₂ によって細胞膜リン脂質から切り出されたアラキドン酸がシトクロム P450 エポキシゲナーゼ(CYP エポキシゲナーゼ)によってエポキシ化された生理活性物質である。EET は、肝臓、腎臓、心臓、血管組織によって産生され、血管弛緩作用、平滑筋増殖抑制作用のほか血管内皮細胞における接着分子の発現を抑制して白血球の浸潤を防ぎ、組織型プラスミノゲン活性化因子の産生を誘導して血液凝固を抑制するなど動脈硬化の原因となるプラークの形成を抑制することが示唆されている。また、これらの働きにより動脈硬化病巣部においてはプラークの

安定化に寄与して、心血管イベントの発生を抑制する方向に働いていると考えられている。EET にはアラキドン酸の 4 つの二重結合の中のエポキシ化の起こる部位によりレジオアイソマーと呼ばれる同属分子が 4 種類存在するが、その中で 11, 12-EET が最も強い抗炎症効果を持っている。EET を産生する CYP エポキシゲナーゼは多数同定されているが、心組織や血管において主に発現しているのは CYP2C 群や CYP2J 群であり、特に CYP2J2 がこれらの組織における EET の産生に大きな役割を持っていると考えられている。EET は可溶型エポキシド水解酵素(soluble epoxide hydrolase、以下 sEH)によって速やかに加水分解され、dihydroeicosatrienoic acid(以下 DHET)となり不活化される。これまでのところ報告さ

れてきた EET を産生する組織あるいは EET が作用する組織は、血管平滑筋細胞、血管内皮細胞、心筋細胞であり、EET と炎症反応の主体である白血球の関係について検討した事例は、国内外を通じてほとんどなかった。従って、白血球の EET を産生する能力や分解する能力、さらには EET の白血球に対する作用については依然として不明な点が多く残されていた。

2. 研究の目的

本研究を開始する以前に行われていた基礎検討の結果から、単球自身が EET 産生に関与する酵素である CYP エポキシゲナーゼ及び EET の加水分解に関与する酵素である sEH を発現していることが見出されていた。そこで、本研究では、白血球の中でも単球に焦点を当て、単球における EET 産生酵素の発現制御がどのように行われているのかを以下の点に注目して解析した。

すなわち、

- (1) ヒト単球系細胞株と末梢血由来単球 (PBMC) にどのような CYP エポキシゲナーゼの分子種が発現しているのか
- (2) 単球に炎症性の刺激を加えると CYP エポキシゲナーゼの発現はどのように変化するか
- (3) 単球をマクロファージに分化する過程で CYP エポキシゲナーゼの発現はどのように変化するか
- (4) 分化後のマクロファージに酸化 LDL を大量に取り込ませて泡沫化を誘導した時に CYP エポキシゲナーゼの発現はどのように変化するか

について検討し、単球から産生される EET が動脈硬化の病態形成に対してどのような役割を持つのかについて考察した。

3. 研究の方法

(1) 細胞の調製

ヒト単球系細胞株 THP-1 および U937 は理研 cell bank より購入し、10% 仔牛由来血清 (FBS) を含む RPMI-1640 中で培養した。また、健康人ボランティアより採取した末梢血を Ficoll-Paque (GE Healthcare) を用いた密度勾配遠心法により分画し、PBMC として採取した。必要に応じて PBMC を human monocyte isolation kit (Miltenyi Biotech) による negative selection あるいは抗 CD14 単クローン抗体の結合した magnetic beads (Miltenyi Biotech) による positive selection を行って、CD14⁺単球を調製した。なお、健康人ボランティアからの末梢血採取は、佐賀大学医学部倫理審査委員会からの承認を得て、個人情報に十分配慮した上で行った。

(2) 単球のマクロファージへの分化と泡沫化の誘導

単球系細胞株 THP-1 及び U937 を 10 nM の PMA 存在下で 7 日間、ヒト末梢血由来 PBMC を 10 ng/ml の M-CSF と GM-CSF の存在下でインキュベートした。形態変化を確認した後、培養皿に接着しなかった細胞を洗浄して取り除き、接着した細胞を以下の実験に用いた。一部の細胞は分化後、一定濃度の LDL あるいは酸化 LDL 存在下で 2 日間培養し、その取り込みのレベルを Oil red O 染色により確認してから、さらなる実験に用いた。

(3) 細胞のミクロソーム画分の調製

ヒト末梢血より分離した単球あるいは単球系細胞株 U937 及び THP-1 を 250 mM スクロース、1 mM EDTA, 1 mM PMSF 中、ダウンスホモジナイザーでホモジナイズした後、核と細胞膜画分を 4℃、10,000 x g で 5 分間遠心することにより除去し、細胞の細胞質画分のホモジネートを調製した。次いで上清を 105,000 x g にて遠心してミクロソーム画分を沈渣として回収した後、20% のグリセロールを含むリン酸緩衝液 (pH7.4) に懸濁し、タンパク質濃度を Bio-Rad Protein Assay により測定した。

(4) 細胞からの総脂質画分の抽出と DHET の測定

(1), (2) で得られた細胞を PBS で洗浄した後、酢酸を添加して酸性にし、酢酸エチルで細胞内脂質を抽出した。抽出溶媒の酢酸エチルを留去した後、ジメチルホルムアミドに再溶解し、11,12-DHET 量を EIA kit (Detroit R&D) にて測定した。

(5) CYP2J2 タンパク質タンパク質の同定

(3) で得られたミクロソーム画分に含まれる CYP2J2 タンパク質を特異的な抗体を用いたイムノブロットング法にて検出した。1 次抗体として抗 CYP2J2 抗体を、2 次抗体としては、ペルオキシダーゼが結合した抗ウサギ IgG 抗体を用いた。また、分化後のマクロファージの細胞内の CYP2J2 を免疫組織化学染色法によって検出した。1 次抗体として抗 CYP2J2 抗体を、2 次抗体として Alexa 488 結合抗ウサギ IgG 抗体を用いた。また、核染色には To-Pro-3 を用いた。染色終了後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。なお、CYP2J2 タンパク質に対する抗体は NIH/NIEH の Zeldin 博士から供与を受けた。

(6) CYP2J2 mRNA の同定と定量

(1), (2) で得られた細胞より Isogen (Nippon Gene) により total RNA を抽出した。定量後、

一定量の total RNA より cDNA を合成した。CYP2J2 に特異的なプライマーを用いて PCR を行った後、アガロース電気泳動により増幅された DNA を検出し、アガロースゲルより PCR 産物を抽出・精製後、塩基配列を解析した。また、(2)の細胞より調製した total RNA と特異的なプライマーを用いて、ABI PRISM 7000 による定量 RT-PCR 法によって CYP2J2, ApoE, MMP-9, GAPDH の各 mRNA の定量を行った。

4. 研究成果

(1) 単球系細胞株およびヒト末梢血由来単球における CYP2J2 の発現

単球系細胞株 THP-1 及び U937 の CYP2J2 の mRNA の発現を RT-PCR によって検討したところ、どちらの細胞にも CYP2J2 の mRNA が検出された (図 1)。一方、CYP2C8 や CYP2C9 は検出されなかった。

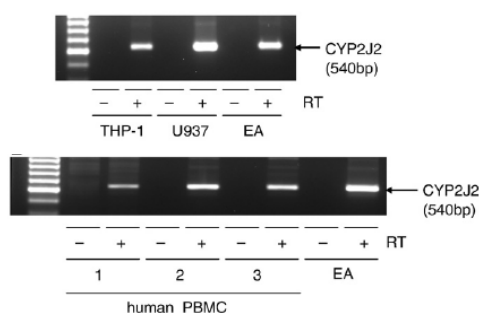


図 1 単球系細胞株における CYP2J2 の発現

PBMC から CD14 結合 magnetic beads を用いて純化した CD14⁺細胞や monocyte isolation kit を用いた negative selection によって精製した単球にも CYP2J2 の発現が見られたことから、PBMC の中でも CD14⁺単球が CYP2J2 を発現することが明らかになった。(図 2)

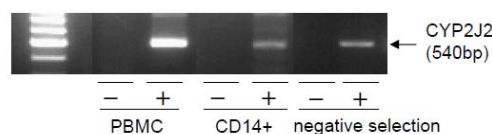


図 2 精製した単球における CYP2J2 の発現

CYP2J2 には splice variant が存在することが報告されているので、単球に発現する CYP2J2 がどのようなタイプの mRNA なのかを解析した。RT-PCR (図 3) と塩基配列の解析の結果 (データ未掲載)、ヒト単球に発現する CYP2J2 の mRNA は CYP2J2 タンパク質の全長をコードしていた。従って、ヒト単球は CYP2J2 の splice variant ではなく、全長の mRNA を発現することが明らかになった。

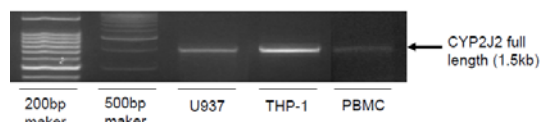


図 3 単球系細胞における全長 CYP2J2 の発現

ヒト単球における CYP2J2 タンパク質をイムノブロットング法により同定を試みた。ヒト PBMC において CYP2J2 が検出され、その分子量はおよそ 50 kDa であった。(図 4)

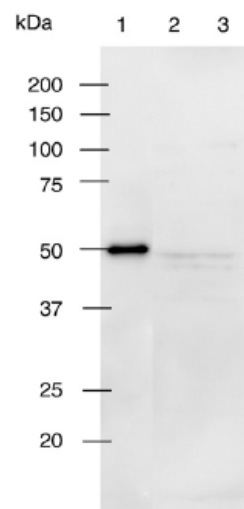


図 4 ヒト単球における CYP2J2 タンパク質の検出 (Lane 1: 293 細胞に強制発現させたヒト CYP2J2, Lane 2, 3: 単球由来ミクロソームタンパク質)

(2) マクロファージに分化誘導した単球系細胞株 THP-1 における CYP2J2 の発現

単球系細胞株 THP-1 細胞を 100 nM PMA 存在下で 1 週間培養した。細胞の形態は経時的に変化し、培養 5～7 日後にはマクロファージ様に形態が変化した。(図 5)

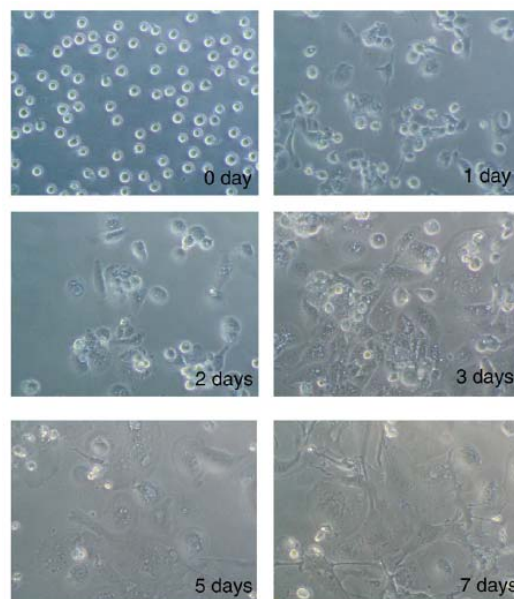


図 5 PMA で刺激した THP-1 細胞の形態

PMA による刺激を行ってから、1, 2, 3, 5, 7 日後に細胞より total RNA を調製して定量 PCR 法にて CYP2J2 及びマクロファージのマーカー遺伝子となる MMP9, ApoE の発現量を測定した。その結果、CYP2J2 の mRNA の発現量は MMP9 や ApoE と同様に、PMA による刺激後、経時的に増加し、刺激 5 日後にプラトーに達した。

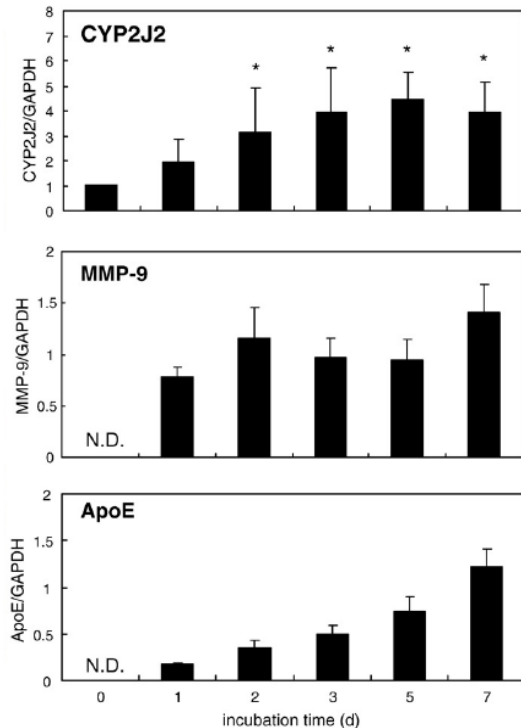


図6 PMA で刺激した THP-1 細胞の CYP2J2 の発現の経時変化

(3) マクロファージに分化誘導したヒト PBMC における CYP2J2 の発現

ヒト PBMC を 10 ng/ml の GM-CSF, 10 ng/ml の M-CSF あるいは両方の共存下で 7 日間刺激したところ、THP-1 を 100 nM の PMA で刺激した場合と同様に、形態が変化し、マクロファージ様の形態を示した。(図 7) またこの時細胞より total RNA を抽出し、定量 PCR 法によって CYP2J2, MMP9, ApoE の発現量を測定したところ、10 ng/ml GM-CSF と 10 ng/ml M-CSF の共存下で培養した時に CYP2J2 の発現が対照群に比べ有意に増加した。MMP9 や ApoE についても同様の結果が得られた。(図 8) ヒト PBMC の代わりに CD14⁺単球を用いても同様の結果が得られた。(図 9) 従って、ヒト単球をマクロファージに分化誘導すると CYP2J2 の発現が上昇することが示唆された。

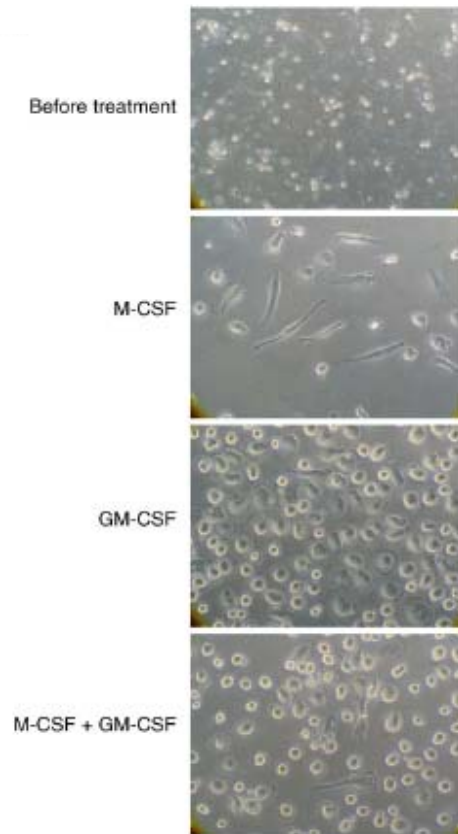


図7 M-CSF と GM-CSF で 7 日間刺激したヒト PBMC の形態変化

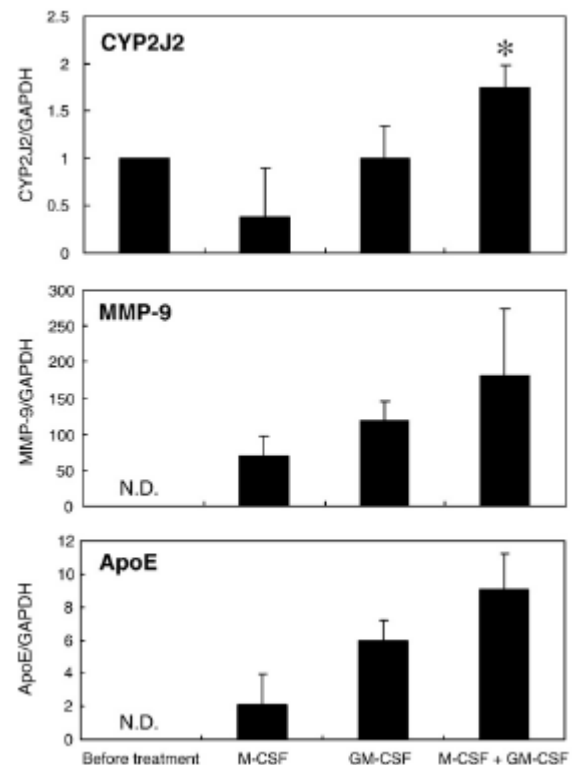


図8 M-CSF と GM-CSF で 7 日間刺激したヒト PBMC における CYP2J2 の発現変化

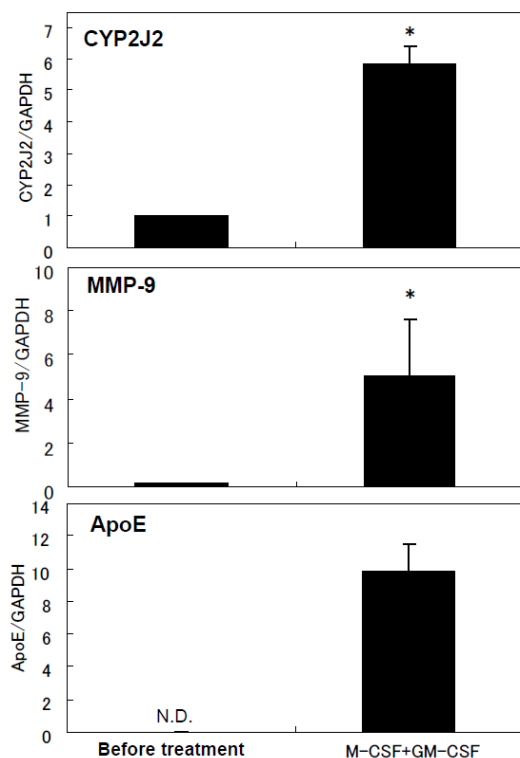


図9 M-CSFとGM-CSFで7日間刺激したヒトCD14⁺単球におけるCYP2J2の発現変化

(4) 分化したヒトマクロファージにおけるCYP2J2の分布

マクロファージにおけるCYP2J2タンパク質の細胞内分布を免疫組織化学染色法により検討した。100 ng/mlのPMAで7日間刺激したTHP-1に由来するマクロファージ(THP1由来)においても、10 ng/ml M-CSFと10 ng/ml GM-CSFの共存下で7日間刺激した単球に由来するマクロファージ(PBMC由来)においても、CYP2J2は細胞質に広く分布していた。

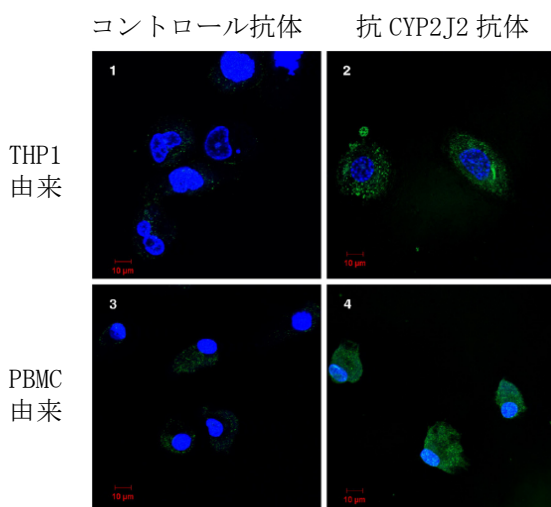


図10 分化したマクロファージにおけるCYP2J2の分布

(5) 炎症性刺激を受けたヒトPBMCにおけるCYP2J2の発現変化

炎症性刺激のCYP2J2発現に於ける影響を解析した。ヒト単球をTNF- α 、IL-1、LPSで刺激してCYP2J2の発現の変化を観察したところ、これらの刺激によってCYP2J2の発現は変化しなかった(データ未掲載)。

(6) ヒト単球とマクロファージにおけるEETの産生

ヒトPBMCとM-CSFとGM-CSFで7日間刺激したヒトPBMCより総脂質を抽出し、抽出した脂質中のEETの安定代謝産物であるDHETの量をEIA法により測定した。その結果、無刺激のPBMCでは 1.47 ± 0.3 ng/ 10^6 個(n=5)だったのに対し、刺激後では 2.68 ± 0.5 ng/ 10^6 個(n=5)と、増加していた。従って、マクロファージへの分化に伴ってCYP2J2の発現が増加し、結果的に代謝産物のEETの量も増加していることが示唆された。

(7) 泡沫化を誘導したマクロファージにおけるCYP2J2の発現変化

M-CSFとGM-CSFの共刺激によりヒトCD14⁺単球をマクロファージに分化させたのち、酸化LDLの存在下で培養して酸化LDLを細胞内に取り込ませて泡沫化を誘導した時にCYPエポキシゲナーゼの発現はどのように変化するかを検討したところ、ヒトCD14⁺単球に比べて分化したマクロファージではCYP2J2の発現は増加したものの、酸化LDLを分化したマクロファージに負荷してもCYP2J2の発現は増加しなかった(データ未掲載)。

(8) まとめ

以上の結果から、ヒト単球にはCYP2J2が発現し、EET産生能力を持ち合わせていることが明らかになった。CYP2J2の発現は炎症性刺激によっては増加せず、マクロファージへの分化を誘導することにより増加することが明らかになった。マクロファージへ分化するに伴い、EETの産生量も増加することが示唆された。また、酸化LDLの負荷によってはCYP2J2の発現は変化しなかったことから、泡沫化することはマクロファージのEETの産生には影響を与えないことが示唆された。

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)

〔雑誌論文〕(計1件)

- ① Nakayama K, Nitto T, Inoue T, Node K.
Expression of the cytochrome P450
epoxygenase CYP2J2 in human monocytic
leukocytes. Life Sci. 83: 339-345,
(2008), 査読有

〔学会発表〕(計2件)

中山佳絵子、日塔武彰、井上晃男、野出孝一：
ヒト単球におけるCYP2J2の発現. 日本薬学会
第128年会，横浜市；2008年3月

中山佳絵子、日塔武彰、井上晃男、野出孝一：
ヒト単球におけるCYP2J2の同定と発現変化.
第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学
学会合同大会，神戸市；2008年12月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

講師 日塔 武彰 (NITTO TAKEAKI)

研究者番号：00301036

