

インターロイキン-5による好酸球分化誘導機構の解明と好酸球分化抑制剤の開発のための方法論の構築

所 属 東北大学 大学院薬学研究科
研究者 石原 研治

要旨

Butyrate は HL-60 clone 15 細胞を好酸球に分化させる作用を持つ。そこで、本研究では好酸球分化機構を解明する目的で、butyrate が HL-60 clone 15 細胞を好酸球に分化させる機序を明らかにすることを目的とした。Butyrate は histone deacetylase (HDAC) 阻害作用を示すが、この作用が好酸球の分化に必要なのか明らかにされていないため、HDAC 阻害薬 apicidin および trichostatin A (TSA) も用いて解析した。その結果、(1) apicidin は butyrate と同様に HL-60 clone 15 細胞を好酸球に分化させる作用を持つこと。(2) TSA には好酸球分化誘導能が無いこと。(3) Apicidin および butyrate は HL-60 clone 15 細胞に対して持続的なヒストンのアセチル化を誘導するのに対して、TSA は一過的なアセチル化を誘導すること。(4) HL-60 clone 15 細胞が好酸球に分化するためには持続的なヒストンのアセチル化が必要であること。(5) butyrate の好酸球分化誘導能は HDAC 阻害による作用であることが明らかになった。

1. 研究目的

好酸球の分化機構を解明するために、butyrate によって好酸球に分化することが知られている HL-60 clone 15 細胞を用いて HL-60 clone 15 細胞の好酸球への分化機序を明らかにすることを目的とした。

2. 研究方法

2-1. HL-60 clone 15 細胞の培養

HL-60 clone 15 細胞 (American Type Culture Collection) を 10% FBS-RPMI-1640 medium (pH 7.8) に 1×10^5 cells/ml の密度で各種濃度の apicidin (Calbiochem)、TSA (Wako) あるいは butyrate (Wako) を含む 10% FBS-RPMI-1640 medium 中で一定時間培養した。Apicidin および TSA は DMSO で溶解し、butyrate は滅菌水で溶解して medium に対して 0.1% 以下になるように添加した。また、vehicle control として DMSO を medium に対して 0.1% 以下になるように添加した。

2-2. Luxol-fast-blue 染色

一定時間培養後、HL-60 clone 15 細胞を回収し、塗沫標本を作製した。メタノールで固定後、Luxol-fast-blue 染色液 (EM SCIENCE) で好酸球性細胞を染色し、hematoxylin 染色液 (Merck) で核を染色した。全有核細胞に対する好酸球性細胞の割合を以下の式で算出した。

$$\text{Eosinophilic cells (\%)} = [\text{Number of cells stained with Luxol-fast-blue} / \text{Number of cells stained with hematoxylin}] \times 100$$

2-3. 細胞増殖抑制作用の解析

HL-60 clone 15 細胞に各種濃度の apicidin、TSA あるいは butyrate 存在下で一定時間培養後、細胞を回収してその一部を用いて細胞数を計測した。

2-4. Flow cytometry 法による細胞内構造変化の解析

一定時間培養した細胞を回収してフローサイトメーター (Becton Dickinson) を用いて解析した。インテグリン $\beta 7$ を検出するには R-phycoerythrin-conjugated anti-integrin $\beta 7$ monoclonal antibody solution (FIB504, BD Pharmingen) を用いた。細胞の生存率は 7-aminoactinomycin D (Sigma) を用いて解析した。

2-5. Immunoblotting

一定時間培養した細胞を回収して細胞数を計測した。細胞の密度が 5×10^6 cells/ml の密度になるように sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, 6 M urea, 10% glycerol, 2% SDS, 0.00125% bromophenol blue, 5% 2-mercaptoethanol, pH 6.8) を加えた。Immunoblotting は、17.5% ポリアクリルアミドゲルを用いて、1 レーンに $20 \mu\text{l}$ アプライして 1×10^4 cells 中の蛋白質を検出した。泳動は 60 V の定電圧で約 180 分間行い、200 mA の定電流で 1 時間ニトロセルロース膜に転写した。その後、block Ace (Dainippon Pharmaceuticals) でブロッキングした膜を 1 次抗体溶液に浸して 4°C で一晩反応させた。次いで 2 次抗体に 3 時間浸して化学発光させてフィルムに露光し目的の蛋白質を検出した。アセチル化されたヒストン、major basic protein (MBP)、p15、p21 および p27 を検出する場合に用いた 1 次抗体はそれぞれ rabbit anti-acetyl histone H4 pAb (Upstate)、mouse anti-eosinophil MBP mAb (AHE-2, Chemicon)、rabbit anti-p15 pAb (Santa Cruz)、goat anti-p21 pAb (Santa Cruz) および rabbit anti-p27 pAb (Santa Cruz) を用いた。2 次抗体には biotinylated anti-rabbit IgG 溶液 (Vector)、biotinylated anti-mouse IgG 溶液 (Vector) あるいは biotinylated anti-goat IgG (Santa Cruz) を 1 次抗体にあわせて使用した。

2-6. HDAC 阻害作用の持続時間の違いによる細胞増殖抑制および分化誘導作用の解析

$500 \mu\text{M}$ の butyrate 存在下で一定時間培養した細胞を 10% FBS-RPMI-1640 で 3 回洗浄し、butyrate を含まない培地でさらに培養した。あるいは $300 \mu\text{M}$ の TSA を medium に対して 0.01% になるように 12 時間おきに添加した。一定時間培養後、3-5 に示した方法で immunoblotting 用のサンプルを調製した。また、6 日間培養後に細胞を回収して 3-2 および 3-3 に従い好酸球性細胞の割合および細胞数を算定した。

2-7. 統計処理

棄却検定は Thompson's F-test により、有意差検定は Student's *t*-test により行った。結果は mean \pm S.E.M. で表した。

3. 研究成果

3-1. HL-60 clone 15 細胞の好酸球への分化に対する HDAC 阻害薬の効果

HDAC 阻害薬が好酸球の分化を誘導するかどうかを明らかにする目的で、HL-60 clone 15 細胞を 100 nM の apicidin、 30 nM の TSA あるいは $500 \mu\text{M}$ の butyrate を含む培地中で 6 日間培養した。その結果、apicidin 存在下で培養した細胞は $38.0 \pm 0.2\%$ の細胞が Luxol-fast-blue で染色され、butyrate 存在下で培養した細胞では $66.0 \pm 2.4\%$ の細胞が染色された (Fig. 1)。しかし、TSA 存在下あるいは HDAC 阻害薬非存在下で培養した細胞では Luxol-fast-blue で染色された細胞は認められなかった (Fig. 1)。また、HL-60 clone 15 細胞を 100 nM の apicidin、 30 nM の TSA あるいは $500 \mu\text{M}$ の butyrate を含む培地中で 6 日間培養し、flow cytometry 法により側方散乱 (side scatter, SSC) の値の変化を解析した。その結果、apicidin および butyrate 存在下で培養した場合、SSC が大きな値を示す細胞の割合は HDAC 阻害薬非存在下で培養した細胞と比べて有意に増加し、インテグリン $\beta 7$ の発現も認められた (data not Shown)。しかし、TSA 存在下で培養した細胞は HDAC 阻害薬非存在下で培養した細胞と比較して SSC の値に差は認められず、インテグリン $\beta 7$ の発現も認められなかった (data not Shown)。さらに、好酸球顆粒蛋白質の 1 つ MBP が発現しているかどうかを immunoblotting により解析した結果、apicidin および butyrate で細胞を培養すると、培養開始 2、4 および 6 日目

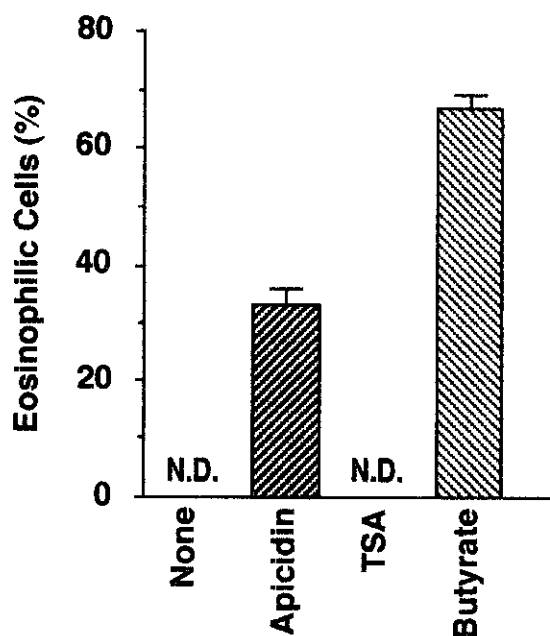


Fig. 1 Percentage of cells stained with Luxol-fast-blue

HL-60 clone 15 cells (1×10^5 cells) were incubated at 37°C for 6 days in 1 ml of medium containing 100 nM apicidin, 30 nM TSA, 500 μM butyrate or vehicle. After incubation, the percentage of eosinophilic cells was calculated. The cells incubated with TSA or vehicle were not stained with Luxol-fast-blue. N.D., not detected.

で経時的に MBP 蛋白質が検出されたが、TSA で培養した細胞は HDAC 非存在下で培養した場合と同様に MBP は発現しなかった (Fig. 2)。なお、300 nM 以上の濃度の apicidin および 100 nM 以上の濃度の TSA は HL-60 clone 15 細胞に対して毒性を示した。また、30 nM 以下の濃度の apicidin は好酸球の分化を誘導しなかった。

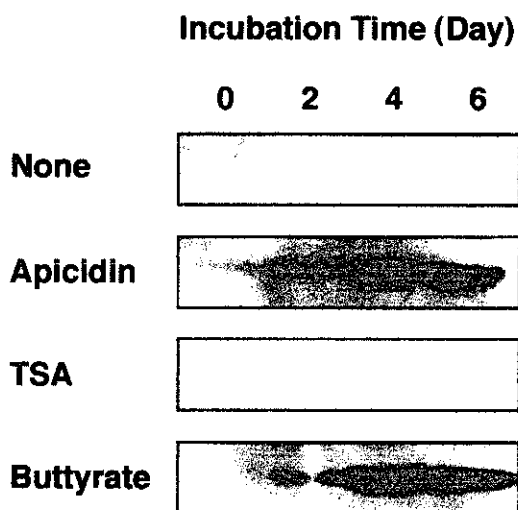


Fig. 2 Effects of apicidin, TSA and butyrate on the expression of MBP in HL-60 clone 15 cells

HL-60 clone 15 cells (1×10^5 cells) were incubated at 37°C for the periods indicated in 1 ml of medium containing 100 nM apicidin, 30 nM TSA, 500 μM butyrate or vehicle. After incubation, the number of cells was counted and lysed in a sample buffer at a final concentration of 5×10^6 cells/ml. The MBP content in 1×10^5 cells were detected by immunoblotting.

3-2. HL-60 clone 15 細胞の増殖に対する HDAC 阻害薬の効果

HDAC 阻害薬が HL-60 clone 15 細胞の増殖を抑制するかどうかを明らかにする目的で、HL-60 clone 15 細胞を 100 nM の apicidin、30 nM の TSA あるいは 500 μM の butyrate を含む培地中で一定間培養し細胞数を算出した。HDAC 阻害薬非存在下で 6 日間培養すると、HL-60 clone 15 細胞は 6 日目まで経時的に増殖した (data not shown)。Apicidin あ

るいは butyrate で培養した場合、細胞数の増加は抑制され apicidin では 4 日目から、butyrate では 3 日目から細胞数の増加が有意に抑制された (data not Shown)。一方、TSA 存在下で培養した場合、細胞数は経時的に増加し、HDAC 阻害薬非存在下で培養した場合と差は認められなかった。また、細胞増殖抑制に関与する p15、p21 および p27 蛋白質の発現を immunoblotting で解析した。その結果、apicidin および butyrate で培養した場合、p15、p21 および p27 蛋白質の発現量は培養開始 2、4 および 6 日目で経時的に増加した (data not Shown)。TSA で培養した場合は培養開始 2 日目で一過的にこれらの蛋白質の発現が認められた (data not Shown)。なお、培養 6 日後の生存率をフローサイトメトリー法により解析した結果、apicidin、TSA および butyrate で培養した細胞の生存率は HDAC 非存在下で培養した場合と比較して差がなかった (data not Shown)。

3-3. ヒストン H4 のアセチル化に対する HDAC 阻害薬の効果

各種 HDAC 阻害薬によりヒストンのアセチル化がどのように変化するかを明らかにする目的で、HL-60 clone 15 細胞を 100 nM の apicidin、30 nM の TSA あるいは 500 μM の butyrate を含む培地中で一定時間培養し、immunoblotting を用いてアセチル化されたヒストン H4 を検出した。その結果、apicidin は HL-60 clone 15 細胞のヒストンのアセチル化を培養 4 時間後から 48 時間後まで経時的に増加させた。また、butyrate は 4 時間後をピークにその後持続的にヒストンのアセチル化を誘導した。しかし、TSA 存在下で培養した細胞のヒストンのアセチル化は培養 4 時間後をピークにその後減弱し 24 時間後にはほぼもとの状態に戻った。

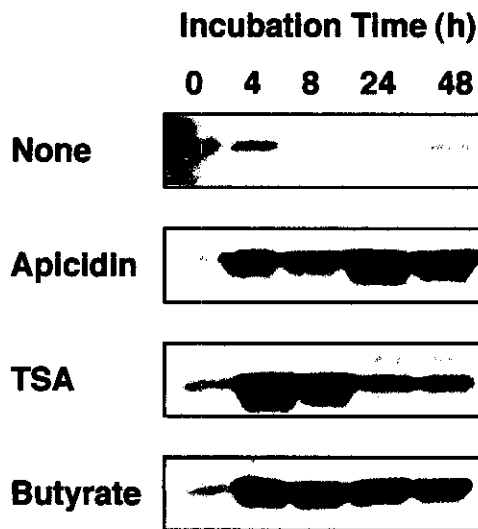


Fig. 3 Effects of apicidin, TSA and butyrate on the acetylation of histone H4

HL-60 clone 15 cells (1×10^5 cells) were incubated at 37°C for the periods indicated in 1 ml of medium containing 100 nM apicidin, 30 nM TSA, 500 μM butyrate or vehicle. After incubation, the number of cells was counted and lysed in a sample buffer at a final concentration of 5×10^6 cells/ml. The acetylated-histone H4 contents in 1×10^5 cells were detected by immunoblotting.

3-4. HDAC 阻害の作用時間の違いによる細胞増殖抑制作用および分化誘導作用の変化

HL-60 clone 15 細胞が好酸球に分化するためには持続的なヒストンのアセチル化が必要であるかどうかを明らかにすることを目的として、HL-60 clone 15 細胞を 500 μM の butyrate を含む培地中で 4、8 あるいは 24 時間培養し、その後 butyrate を含まない培地に置換して 6 日間培養した。その結果、HL-60 clone 15 細胞は butyrate 存在下で培養している期間では持続的にヒストンのアセチル化が誘導されており、butyrate を含まない培地に置換することによってヒストン H4 は速やかに脱アセチル化された (data not Shown)。このような条件下で 6 日間培養し HL-60 clone 15 細胞の細胞数を算定したところ、butyrate 存在下で 4 および 8 時間培養し、その後 butyrate を含まない培地中で培養した群では細胞増殖は抑制されなかった (data not Shown)。一方、butyrate 存在下で 24 時間培養し、その後 butyrate を含まない

培地中で培養した群は細胞の増殖が抑制された (data not Shown)。また、Luxol-fast-blue で好酸球性細胞の割合を算定した結果、butyrate 存在下で 24 時間培養した場合に有意に好酸球性細胞の割合が増加した (data not Shown)。また、butyrate 存在下で 24 時間培養した細胞では MBP、p15、p21 および p27 蛋白質の発現が増加することが immunolotting により明らかになった (data not Shown)。同様に、細胞培養系に TSA の添加を繰り返した場合に好酸球の分化が誘導されるかどうか解析した。すなわち、300 nM の TSA を medium に対して 0.01% になるように 12 時間おきに計 5 回まで添加してヒストンを TSA によって持続的にアセチル化させた (data not Shown)。その結果、TSA の添加回数に依存して細胞増殖の抑制、好酸球性細胞の増加、MBP および インテグリン $\beta 7$ の発現の増加が認められた (data not Shown)。

4. 考察・まとめ

真核細胞の分化・増殖には種々の遺伝子の転写が関与しており、この転写制御の 1 つにはクロマチンの構造の変化が重要な役割を果たしている。クロマチンは、ヌクレオソームコア粒子および linker DNA によって構成され、さらにヌクレオソームコア粒子はヒストン H2A、H2B、H3 および H4 の各 2 分子によって構成されるヒストンの 8 量体に 145 塩基対の DNA が 1.75 周巻き付く構造をしている。各コアヒストンの N 末端には 15 から 30 残基の塩基性アミノ酸に富んだ N 末端テールがあり、この N 末端テールは負電荷を持つ DNA と結合することによってヌクレオソーム構造を安定化しており、転写因子や RNA ポリメラーゼなどが DNA に結合することを阻害し転写反応を抑制している。しかし、N 末端テールのリシン残基がアセチル化されるとヒストンの持つ正電荷が中和され、ヒストンと DNA との親和性が減少するためヌクレオソーム構造が緩み、転写因子や RNA ポリメラーゼなどが target gene に近づきやすくなり一連の転写反応が開始される。コアヒストンのアセチル化を誘導する酵素が histone acetyltransferase であり、脱アセチル化する酵素が HDAC である。Apicidin、TSA および butyrate などの HDAC 阻害薬は HDAC を阻害することによってヒストンを高アセチル化状態に保つ薬物であり、その結果、種々の遺伝子の転写が促進される。

私達は、HDAC 阻害薬 apicidin が前骨髄球性白血病細胞株 HL-60 細胞の増殖を抑制し、分化を誘導することを明らかにしてきた。一方、HL-60 細胞の subclone である HL-60 clone 15 細胞は HDAC 阻害薬 butyrate により好酸球に分化することが報告されている細胞であるため、HL-60 clone 15 細胞を用いて好酸球の分化機序を明らかにすることを目的とした。また、butyrate による好酸球分化誘導作用は butyrate の HDAC 阻害作用によるものなのかどうか不明であるため、分化誘導作用とヒストンのアセチル化との関連性を明らかにする目的で、HDAC 阻害薬 apicidin、TSA および butyrate の作用を比較した。その結果、以下の 5 点が明らかになった。(1) Apicidin は butyrate と同様に HL-60 clone 15 細胞を好酸球に分化させる作用を持つこと。(2) TSA には好酸球分化誘導能が無いこと。(3) Apicidin および butyrate は HL-60 clone 15 細胞に対して持続的なヒストンのアセチル化を誘導するのに対して、TSA は一過的なアセチル化を誘導すること。(4) HL-60 clone 15 細胞が好酸球に分化するためには持続的なヒストンのアセチル化が必要であること。(5) Butyrate の好酸球分化誘導能は HDAC 阻害による作用であることである。

Luxol-fast-blue 染色は塩基性蛋白質を染色するため、好酸球を同定する染色方法の 1 つとして用いられている。本研究でも 100 nM の apicidin および 500 μ M の butyrate によってそれぞれ $38.0 \pm 0.2\%$ および $66.0 \pm 2.4\%$ の細胞が Luxol-fast-blue によって染色された。さらに本研究では本来好酸球が持ちうるような機能的な分化が誘導されているのかどうか解析した。その結果、100 nM の apicidin は 500 μ M の butyrate と同様に HL-60 clone 15 細胞の増殖を抑制し、細胞内構造変化および MBP、インテグリン $\beta 7$ の発現を亢進させた。また、cyclin-dependent kinase inhibitor である p15、p21 および p27 の発現を伴った細胞の増殖抑制が認められた。従って、apicidin は HL-60 clone 15 細胞を好酸球に分化させる作用を持つことが示めされた。

本研究では、300 nM 以上の apicidin および 100 nM 以上の TSA は HL-60 clone 15 細胞に対して毒性を示すことを明らかにした。また、butyrate は 750 μ M 以上の濃度で細胞毒性を示し、好酸球への分化誘導には 300-500 μ M の濃度が必要であること報告されている。そこで、本研究では apicidin、TSA および butyrate を 100 nM、30 nM および 500 μ M の濃度で使用した。しかし、10 および 30 nM の apicidin は好酸球への分化誘導作用を示さなかった。Butyrate は 500 μ M

の濃度で約 80% の HL-60 clone 15 細胞を好酸球に分化させるのに対し、200 および 300 μM の濃度では約 50%、100 μM の濃度では約 30% にまで分化誘導作用が減弱することから、butyrate による分化誘導作用を示す濃度範囲は狭いことが報告されている。これらのことから、apicidin は butyrate と同様に分化を誘導する濃度範囲が狭く、厳密なヒストンのアセチル化が好酸球の分化誘導に必要であるのではないかと考えられる。

Apicidin や butyrate と同様に HDAC 阻害薬である TSA を 30 nM の濃度で HL-60 clone 15 細胞を培養した時、細胞の増殖は抑制されず、Luxol-fast-blue 染色性、細胞内構造変化および MBP の発現は亢進しなかったことから、TSA は好酸球への分化を誘導する作用がないことが明らかになった。そこで、分化誘導作用とヒストンのアセチル化との関連性について明らかにする目的で、各種 HDAC 阻害薬によるヒストンのアセチル化の経時的な変化について immunoblotting で解析した。その結果、apicidin および butyrate はヒストンのアセチル化を持続的に亢進するのに対し、TSA は一過的に亢進させたことから、持続的なヒストンのアセチル化が好酸球への分化誘導作用に深く関わっているのではないかと考えられた。そこで butyrate の作用時間を作法的にコントロールし持続的なヒストンのアセチル化と好酸球への分化誘導作用との関連性について解析した。その結果、butyrate を 4 時間あるいは 8 時間作用させアセチル化を一過的に誘導した場合には細胞増殖抑制作用および好酸球性細胞の割合の増加は認められず、この作用は TSA による作用と類似していた。しかし、butyrate を 24 時間以上作用させると好酸球の割合の増加が認められた。同様に、TSA を添加することによって好酸球の割合が増加した。従って、HL-60 clone 15 細胞から好酸球への分化には持続的なヒストンのアセチル化が必要であることが示唆された。

ヒストンがアセチル化されると転写が促進される状態になるため、apicidin や butyrate によってヒストンが持続的にアセチル化されると、長時間にわたって様々な転写因子が DNA に結合し種々の遺伝子の転写を活性化することができるようにと考えられる。TSA が一過的にヒストンをアセチル化しても好酸球への分化が起こらないことから、持続的なアセチル化による様々な転写因子の発現と活性化が好酸球を産生させるためには必要であると考えられる。本研究では、どのような転写因子が発現し活性化しているかは明らかにできなかったが、MBP 遺伝子の発現は GATA-1、C/EBP β 、C/EBP ϵ および PU.1 などの転写因子が関与していること、骨髄幹細胞 CD34⁺ cell に GATA-1 を over expression させると好酸球に分化することが報告されている。従って、これらの転写因子が好酸球の分化に関与していると考えられるが詳細は明らかではない。今後、apicidin、TSA あるいは butyrate など異なったヒストンのアセチル化を引き起こす HDAC 阻害薬を使用することによって好酸球分化機構を解明する糸口になるかもしれない。

5. 研究成果

第 123 年会 日本薬学会 (H15.3.27-29)

HDAC 阻害薬 apicidin の HL-60 clone 15 細胞に対する分化誘導作用

○石原研治¹、伊藤進策¹、JangJa Hong^{1,2}、OkPyo Zee²、大内和雄¹ (¹ 東北大薬、² Graduate School of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Korea)

6. 知的所有権の取得状況

なし