

好酸球性白血病細胞EoL-1におけるミエロペルオキシダーゼによるチロシンニトロ化能の解析

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4521

好酸球性白血病細胞EoL-1におけるミエロペルオキシダーゼによる チロシンニトロ化能の解析

金沢大学大学院医学系研究科環境医科学専攻環境生態医学
(旧講座名：公衆衛生学)
(主任：荻野景規教授)

児 玉 典 央

種々の病態において、チロシンニトロ化を活性窒素種産生の指標として調べられている。しかしながら、ニトロチロシンの病態生理学的意義に関しては、未だ十分には解明されていない。本研究は、酪酸添加誘導したヒト好酸球性白血病細胞EoL-1が、ペルオキシダーゼ依存性チロシンニトロ化能の研究上有用であるかどうかを検討した。酪酸誘導によりEoL-1細胞は増殖阻害を受け、培養9日目では好酸球顆粒の形成がみられた。ペルオキシダーゼ活性は酪酸誘導3日目より生化学的および組織化学的に認められ、培養期間に伴い増加した。このペルオキシダーゼ活性はシアンにより阻害された。酪酸誘導したEoL-1細胞は過酸化水素 (H_2O_2) および亜硝酸イオン (NO_2^-) の濃度依存的なチロシンのニトロ化能を有していた。酪酸誘導したEoL-1細胞のチロシンニトロ化活性は、非常に強力なチロシンニトロ化活性を持つことが知られているヒト末梢血好酸球と同等の強さであった。しかしながら、酪酸誘導したEoL-1細胞の好酸球ペルオキシダーゼ (eosinophil peroxidase, EPO) の発現は逆転写PCR反応 (reverse transcription-PCR, RT-PCR) および免疫蛍光染色により認められなかった。一方、酪酸によるミエロペルオキシダーゼ (myeloperoxidase, MPO) の発現誘導はRT-PCR, ノーザンブロット, および免疫蛍光染色により認められた。 H_2O_2 非存在下で NO_2^- と反応させると一部の酪酸誘導したEoL-1細胞はニトロチロシン陽性所見を認めた。しかし、酪酸誘導したEoL-1細胞を、好酸球や好中球においてNADPH オキシダーゼを活性化することにより、スーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$) の産生を介し H_2O_2 産生を誘導するフォルボールエステル (4 β -phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) を NO_2^- とともに反応させても、 NO_2^- 単独との反応による以上のチロシンニトロ化の増強はみられなかった。酪酸誘導の有無に関わらずEoL-1細胞はPMA刺激により $O_2^{\cdot-}$ を産生せず、NADPH オキシダーゼの4種類の構成タンパク質 (p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, gp91^{phox}) の発現もRT-PCRにより確認できなかった。以上より、酪酸誘導したEoL-1細胞は、EPOではなくMPOを発現し、NADPH オキシダーゼの発現がないなど、好酸球とは異なる性質を持つ細胞へと変化することが示され、この細胞を用いた研究を進める上で注意を要すると考えられた。

Key words eosinophil peroxidase, myeloperoxidase, nitrotyrosine, reactive nitrogen species

EoL-1は急性ヒト好酸球性白血病患者より株化された細胞株であり、通常培養条件下では骨髄芽球様の形態を呈する¹⁾。EoL-1は、さまざまな誘導剤により、好酸球顆粒の形成、ホルミルペプチド受容体、Fc γ 受容体III、細胞接着分子、非特異的エステラーゼ発現などの好酸球様の性質を持つ細胞へと分化することが知られている^{2)~8)}。さらに、酪酸によりEoL-1細胞は、インターロイキン-3、インターロイキン-5、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子に対する受容体の発現とそれらのサイトカインに対する遊走能などの誘導を受けることも知られている⁹⁾。概して、酪酸は、さまざまな細胞に対して、核内

のヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤として働き、遺伝子発現を生じ、分化等の細胞変化を誘導する⁹⁾。

病理的な条件下では、一酸化窒素 (NO^{\cdot}) に由来する活性窒素種が組織の酸化的傷害を引き起こすことが知られている¹⁰⁾。ペルオキシニトライト ($ONOO^{\cdot}$) はもっともよく研究されている活性窒素種の一つであり、 NO^{\cdot} とスーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$) の拡散律速的反応により産生される¹¹⁾。 $ONOO^{\cdot}$ は、非常に強力な酸化剤であり、タンパク質、核酸、脂質といった様々な生体分子のニトロ化やヒドロキシル化等を引き起こす¹¹⁾。特に、 $ONOO^{\cdot}$ は遊離及びタンパク質結合チロシンをニトロ化しニト

平成14年11月18日受付, 平成15年1月9日受理

Abbreviations : DAB, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; dbcAMP, dibutyl cAMP; DIG, digoxigenin; EPO, eosinophil peroxidase; HRP, horseradish peroxidase; INF- γ , interferon γ ; LFB, luxol fast blue; MPO, myeloperoxidase; NaCN, sodium cyanide; OPD, *o*-phenylene diamine; PMA, 4 β -phorbol 12-myristate 13-acetate; RT-PCR, reverse transcription-PCR; TBS, Tris-buffered saline; TBS-T, TBS containing 0.05% Tween20; TNF- α , tumor necrosis factor α

ロチロシンを生じさせる¹¹⁾。急性および慢性炎症過程や敗血症、虚血再灌流傷害、神経変性疾患などのさまざまなヒトの疾患やそれらの動物および培養細胞モデルにおいてニトロチロシンが増加することが報告されている¹²⁾。

ニトロチロシン産生はもともとONOO⁻発生の特異的マーカーと考えられていたが、近年、好酸球ペルオキシダーゼ (eosinophil peroxidase, EPO) やミエロペルオキシダーゼ (myeloperoxidase, MPO) のようなヘム含有白血球ペルオキシダーゼによるチロシンのニトロ化反応に注目が集まっている^{13)~16)}。MPOは好中球、単球、およびある種のマクロファージに発現しているが、EPOは好酸球に特異的である。MPOおよびEPOは過酸化水素 (H₂O₂) 存在下において亜硝酸イオン (NO₂⁻) の酸化を触媒することにより二酸化窒素 (NO₂[•]) を産生し、これが遊離およびタンパク質結合チロシンをニトロ化する¹⁷⁾。MPOおよびEPOのノックアウトマウスを用いた研究から、いくつかの急性炎症モデルにおいてMPOもしくはEPO/H₂O₂/NO₂⁻系によるチロシンのニトロ化が*in vivo*において実際に生じていることが証明されている^{17)~19)}。

このように、生化学的なチロシンのニトロ化機構やさまざまな病態におけるニトロチロシンの検出に関する報告は多数なされているが、ニトロチロシンの病態における意義に関しては解明されていない。特に好酸球は末梢血中の存在数が少ないため、研究に必要な細胞数を分離することが難しい。このため、優れた培養細胞モデルが必要とされる。EoL-1は好酸球性白血病細胞であるため、ペルオキシダーゼを発現すると考えられる。そこで、本研究ではEoL-1がペルオキシダーゼによるチロシンニトロ化機構を研究するための好酸球モデルとして利用できるか検討した。

材料および方法

I. 分化誘導

EoL-1およびHL-60はそれぞれRIKEN ジーンバンク (茨城) およびAmerican Type Culture Collection (Rockville, USA) より購入した。通常の培養は10%非動化ウシ胎児血清 (JRH Biosciences, Lenexa, USA), 2 mM グルタミン (和光, 大阪), 100 units/ml ペニシリン, 100 μg/ml ストレプトマイシン (Invitrogen Corp., Carlsbad, USA) を含むRPMI1640培地 (ニッスイ, 東京) 中、5%二酸化炭素下で37°Cにて行った。EoL-1細胞の好酸球様細胞への分化誘導は、Saitoら⁵⁾の方法に従い、0.5 mM 酪酸を含むRPMI1640培地中で細胞数を5×10⁵個/mlとして培養した。その際、トリパンブルーの排出を指標として、生細胞数を算出し、3日ごとに新鮮な分化誘導培地を用いて細胞数を5×10⁵個/mlに調整した。好酸球顆粒の検出は、ルキソールファーストブルー (luxol fast blue, LFB) 染色により行った。HL-60細胞の好中球様細胞への分化誘導は、細胞数3×10⁵個/mlにおいて1.3%ジメチルスルフォキシド (Merck, Whitehouse Station, USA) を含むRPMI培地中で7日間培養することにより行った²⁰⁾。

II. ヒト末梢血からの好酸球および好中球の分離

健常者 (25歳から27歳, 男性) からクエン酸採血した新鮮な全血より、好酸球および好中球を分離した²¹⁾。提供者には、本研究の目的および方法を説明し、インフォームドコンセントを得た。全血を等量の4.5%デキストラン (アマシャムジャパン, 東京) と混合し、室温で1時間静置し、赤血球を沈降させた。

上清を回収し、1,200回転/分で5分間遠心分離し、細胞沈殿を滅菌したPBS/2 mM EDTA溶液に懸濁した。15 mlポリプロピレンチューブに3 ml HISTOPAQUE-1077 (Sigma, St. Louis, USA) を加え、その上に細胞懸濁液を重ねた。3,000回転/分で15分間遠心分離し、単核球と顆粒球を分離した。得られた顆粒球分画をPBS/2 mM EDTA溶液により洗浄した後、155 mM NH₄Cl/10 mM KHCO₃/0.1 mM EDTA溶液中で5分間静置した。その後、1,200回転/分で5分間遠心分離し、混入した赤血球を除去した。得られた顆粒球はギムザ染色による顕微鏡観察により95%以上の好中球を含んでいるため、本研究ではこの分画を好中球として実験に用いた。好酸球を分離するために、顆粒球の沈殿を5×10⁷cells/50 μlとなるようにPBS/2 mM EDTA/0.5% ウシ血清アルブミン溶液に懸濁後、同容量のCD16磁気マイクロビーズ (第一科学, 東京) と混合し、4°Cで30分間反応させた。磁気細胞分離システム (magnetic cell separation system) (Mitenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) により、CD16を発現する細胞である好中球を選択的に除去した。本方法で得られた好酸球は99%以上の純度であった。

III. 免疫細胞化学

既報²¹⁾に従いEoL-1細胞中のニトロチロシンを免疫組織化学的に検出した。細胞 (1×10⁶個/ml) を種々の濃度のH₂O₂およびNO₂⁻とCa²⁺とMg²⁺を含まないHank's液 [HBSS (-)] 中において37°Cで30分間反応させ、細胞中にあるタンパク質チロシン残基のニトロ化を行った。反応後、細胞をCytospin Model3 (Shandon Southern Instruments, Sewickley, USA) を用いて、スライドガラスに細胞集積遠心した。中性緩衝ホルマリン中で10分間固定し、トリス緩衝生理食塩水 (Tris buffered saline, TBS) [50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 150 mM NaCl] で5分×3回洗浄後、0.3% H₂O₂を含むメタノール中で細胞内因性のペルオキシダーゼ活性を阻害した。TBSで5分×3回洗浄後、5%正常ヤギ血清と20分間反応させ、抗体の非特異的結合部位をブロックした。これをウサギ抗ニトロチロシン抗体 (1:800) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA) と4°Cで一晩反応させた。TBS中で5分×3回洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase, HRP) 結合ヤギ抗ウサギIgG抗体のポリマー (ENVISION+, Dako, Carpinteria, USA) と室温で1時間反応させた。TBS中で5分×3回洗浄後、TBS中で2 mM 3,3'-ジアミノベンジジン 4塩酸塩 (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB) および0.1% H₂O₂と反応させ、ヘマトキシリンにより核を染色し封入した。陰性対照実験として、ニトロチロシン抗体をニトロチロシン (10 mM) と室温で1時間あらかじめ反応させ抗体を吸収させたもの、あるいは非免疫ウサギイムノグロブリンを一次抗体として用いた。また別の陰性対照実験として、固定後の標本を100 mM ジチオナイトにより処理し、ニトロチロシンをアミノチロシンに還元したものを抗ニトロチロシン抗体により染色した。EPOおよびMPOの染色は、サイトスピン標本を4%パラホルムアルデヒド中において室温で1時間固定し、TBS中で5分×3回洗浄後、5%正常ヤギ血清と20分間反応させ、マウスモノクローナル抗ヒトEPO抗体 (1:100) (Oncogene Research Products, Cambridge, USA) あるいはマウスモノクローナル抗ヒトMPO抗体 (1:100) (Dako) と4°Cで一晩反応させた。TBS中で5分×3回洗浄後、フルオレッセン・イソチオシアン酸 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 結合ヤギ抗マウス抗体 (Dako) と室温にて1時間反応させ、再度、

TBS中で5分×3回洗浄し、水性封入剤にて封入した。

IV. ウェスタンブロット

既報²¹⁾に従いEoL-1細胞のタンパク質中のニトロチロシンをウェスタンブロットにより検出した。細胞 (1×10^6 個/ml) をHBSS (-) 中で $50 \mu\text{M}$ H_2O_2 および 1 mM NO_2^- の有無の条件下において、 37°C で30分間反応させた。遠心 (3,000回転/分, 5分間) により細胞を沈殿させ、 1×10^6 細胞あたり $50 \mu\text{l}$ の β -メルカプトエタノールを含まないLaemmli溶液 (0.1 M Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 20%グリセロール, 0.01%プロモフェノールブルー) に直接懸濁した。100°Cにおいて5分間処理しSDS-PAGEに供した。PVDF (polyvinylidene difluoride) 膜 (Millipore, Bedford, USA) に転写後、5%スキムミルクを含むTBS-T (TBS/0.05%, Tween20) 中で4°Cにおいて一晩反応させた。その後、2.5%スキムミルクを含むTBS-Tにより1,000倍に希釈したウサギ抗ニトロチロシン抗体、あるいは10 mMニトロチロシンとあらかじめ室温で1時間反応させた抗ニトロチロシン抗体と室温において2時間反応させた。TBS-T中で10分×3回洗浄後、HRP標識抗ウサギIgG抗体 (Dako) を室温において1時間反応させた。再びTBS-T中で10分×3回洗浄後、ECL (Enhanced chemiluminescence) キット (NEM Life Science Products, Boston, USA) を用いて、X線フィルムを感光した。

V. 高速液体クロマトグラフィーによる遊離ニトロチロシンの定量

EoL-1細胞、ヒト好中球、ヒト好酸球の H_2O_2 および NO_2^- 存在下における遊離チロシンのニトロ化を既報²²⁾に従って測定した。 2.5×10^6 個の細胞を237.5 μl の1 mM L-チロシンと1 mM NO_2^- を溶解させたHBSS (-) に懸濁後、 37°C になるまで温めた。12.5 μl の1 mM H_2O_2 (最終濃度 $50 \mu\text{M}$) を加えて反応を開始し、1時間後に遠心分離により細胞を除き、反応を停止させた。上清を分子量10,000の限外濾過フィルターに通し、溶液中のタンパク質を除去した。同溶液中のニトロチロシンを5 μm Spherisorb ODS-2RP-18カラム (Waters Chromatography, Milford, USA) を用い、50 mMリン酸カリウム (pH 3.0) /7%メタノール溶液を移動相とした高速液体クロマトグラフィーにより274 nmの紫外吸収を利用して検出した。

VI. ペルオキシダーゼ活性の測定

SchneiderとIssekutzの方法²³⁾に従って、*o*-フェニレンジアミン (*o*-phenylene diamine, OPD) (和光) を基質としてペルオキシダーゼ活性を測定した。細胞 (1×10^7 個/ml) を0.25%ショ糖/0.22%セチルトリメチルアンモニウムクロリド溶液に懸濁し、液体窒素により凍結後融解し、 $10,000 \times g$ で4°Cにおいて10分間遠心分離した。その上清を同容量の50 mMヘプス (pH 8.0) /6 mM臭素化カリウム/3 mM OPD/8.8 mM H_2O_2 溶液と混合し、 37°C で15分間反応させた。2倍容量の氷冷した1 M硫酸/2 mMレゾルシノール溶液を加えて反応を停止し、490 nmにおける吸光度を分光光度計 (UV1200, 島津, 京都) を用いて測定した。15分間の490 nmにおける吸光度変化からあらかじめ氷冷した1 M硫酸/2 mMレゾルシノール溶液を加えた反応から得た吸光度変化 (バックグラウンド) を差し引いた値を酵素活性として表した。

VII. ペルオキシダーゼ染色

サイトスピン標本を中性緩衝ホルマリンで10分間固定し、TBS中で5分×3回洗浄後、MPO阻害物質であるシアン化ナトリウム (10 mM NaCN) 有無の条件下でTBS中において2 mM

DABおよび0.1% H_2O_2 と室温で30分間反応させた²⁴⁾。ヘマトキシリンによる核染色後、封入した。

VIII. 全RNAの抽出

ISOGEN (ニッポンジーン, 富山) を用いてRNAを抽出した。0.5 mM酪酸存在下で3, 6, 9日間培養した細胞、および非誘導細胞のそれぞれ 1×10^7 細胞を滅菌したPBSにより洗浄した後、遠心により沈殿させた。ISOGEN 1 mlを加え、18 Gの注射針を装着した1 ml注射筒を用いてシェアリングを行った後、クロロホルム0.2 mlを加え攪拌し、室温にて5分間静置した。12,000回転/分で4°Cにおいて15分間遠心後、上清を回収した。これに、インプロピルアルコール0.5 mlを加え、12,000回転/分で4°Cにおいて5分間遠心した。上清を除去し、沈殿をジエチルピロカルボネート処理した蒸留水に溶解した。各RNAの260 nmにおける吸光度を測定し、1ODを40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ としてRNA濃度を計算した。

IX. 逆転写PCR反応 (reverse transcription-PCR, RT-PCR)

AMV RNA PCRキット (宝酒造, 京都) を用いてRT-PCRを行った。1 μg の全RNAをoligo-dTプライマーを用いて逆転写し、そのcDNAをPCR (94°C 1分, 60°C 1分, 72°C 1分; 30サイクル) に供した。使用したプライマーは、EPO (センス, 5'-CACGGTTTCAAGGGACATC-3'; アンチセンス, 5'-ATTGTGGGGTGTCTGGAGGC-3'), MPO (センス, 5'-GACACCTCGTTGGTGCTGAG-3'; アンチセンス, 5'-TCGCAGTTGACGCCAGTGC-3'), p22^{phox} (センス, 5'-GTTTGTTTTGTGCTGCTGGAGT-3'; アンチセンス, 5'-GGGCGGCTGCTTGATGGT-3'), p47^{phox} (センス, 5'-ACCCAGCCAGCACTATGTGT-3'; アンチセンス, 5'-AGTAGCCTGTGACGTCGTCT-3'), p67^{phox} (センス, 5'-CGAGGGAACCAGCTGATAGA-3'; アンチセンス, 5'-CATGGGAACACTGAGCTTCA-3'), gp91^{phox} (センス, 5'-GCTGTTCAATGCTTGTGGCT-3'; アンチセンス, 5'-GCTGTTCAATGCTTGTGGCT-3') である。グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 検出用のプライマーはClontech社 (Palo Alto, USA) より購入した。検出されたDNA断片は直接塩基配列決定法により配列を確認し、pGEM-T-Easyプラスミドベクター (Promega, Madison, USA) にサブクローニングした。

X. プローブの作製

MPOのノーザンブロット用プローブをDIG-RNAラベリングキット (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) を用いて作製した。MPOのcDNA断片を挿入したpGEM-T-Easyプラスミド (1 μg) をSalIにより消化した後、ジゴキシゲニン (digoxigenin, DIG) 結合UTP存在下でSP6 RNAポリメラーゼにより試験管内RNA合成反応を行い、DIG標識RNAプローブを作製した。

XI. ノーザンブロット

10 μg の全RNAを1%アガロース/ホルムアルデヒドゲルを用いて電気泳動し、 $20 \times \text{SSC}$ ($1 \times \text{SSC}$: 150 mM塩化ナトリウム, 15 mMクエン酸ナトリウム) によりナイロンメンブレンフィルターにブロットした。紫外線照射 ($0.12 \text{ J}/\text{cm}^2$) により、RNAをフィルターに架橋した後、 $5 \times \text{SSC}/50\%$ フォルマミド中で 68°C 、60分間プレハイブリダイゼーションを行った。100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のDIG標識MPO RNAプローブと 68°C で一晩反応させた。 $2 \times \text{SSC}/0.1\%$ SDS, 室温5分の洗浄を2回行った後、 $0.1 \times \text{SSC}/0.1\%$ SDS, 68°C 、15分の洗浄を2回行った。0.15 M

NaCl/0.1 M マレイン酸 (pH 7.5) 溶液を用いて平衡化した後、1% ブロッキング溶液 (Rhoche Diagnostics) 中で1時間反応させた。その後、アルカリフォスファターゼ結合抗DIG抗体 (Rhoche Diagnostics) と室温で1時間反応させ、0.15 M NaCl/0.1 M マレイン酸 (pH 7.5) /0.3% Tween20 溶液を用い、室温下において15分の洗浄を2回行った。0.1 M Tris-HCl (pH9.5) /0.1 M NaCl/50 mM MgCl₂ 溶液でフィルターを平衡化し、同溶液により100倍希釈したCSPD (ジソディウム3-(4-メソキシスピロ [1,2-ジオキセタン-3,2'-(5'-クロロ) トリシクロ [3.3.1.1] デカン-4-イル) フェニルリン酸) (Rhoche Diagnostics) と37°C で30分反応させた後、X線フィルムを感光した。

XII. チトクロムc還元法によるスーパーオキシドの定量

4β-フォルボール12-ミリストート13-アセテート (4β-phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) はジアシルグリセロール類似構造を持つためプロテインキナーゼCを活性化する²⁵⁾。その結果、好酸球や好中球においてはNADPHオキシダーゼが活性化され、O₂⁻産生が起こる²⁶⁾。このフォルボールエステル刺激に伴う好酸球、好中球、EoL-1細胞からのO₂⁻産生量をチトクロムc還元法²⁷⁾により測定した。細胞 (1×10⁶個/ml) を0.1 mMチトクロムc (和光) を含むHBSS (-) 中で0.1 μM PMA (和光) の有無の条件において、37°Cで1時間反応させた。遠心 (3,000回転/分、5分) により細胞を除き、上清の550 nmにおける吸光度を分光光度計を用いて測定した。10 μg/mlウシ心臓由来Cu, Zn-スーパーオキシドディスムターゼ (superoxide dismutase) (和光) を添加した対照実験より得られた吸光度を差し引いた値から還元型チトクロムcの550 nmにおけるモル吸光度係数21.1×10³ M⁻¹cm⁻¹を用いて、産生されたO₂⁻濃度を算出した。

XIII. 過酸化水素の定量

H₂O₂をスコポレチン/HRP法²⁸⁾により測定した。細胞 (1×10⁷個/ml) を4 μMスコポレチン (和光) /5 μg/ml HRP (東洋紡, 大阪) /1 mMアジ化ナトリウムを含むHBSS (-) 中で37°C, 1時間反応させた。遠心分離 (5,000回転/分、5分) 後の上清の蛍光 (Ex=360 nm, Em=450 nm) を測定した。H₂O₂の濃度は240 nmにおけるモル吸光度係数40 M⁻¹cm⁻¹を利用して求めた。このH₂O₂を標準液として作成した検量線から、各細胞の産生したH₂O₂濃度を推定した。

XIV. 統計学的処理

繰り返し行われた実験の観察データは、平均±標準偏差 (X̄±SD) で表した。対照との差や群間の差の統計学的有意性は、一元配置分散分析の後、Bonferroniの方法で多重比較を行い、いずれも危険率5%未満を統計学的有意差ありとした。

成 績

I. EoL-1細胞の増殖および好酸球顆粒の形成に対する酪酸の効果

通常培養条件下では、EoL-1細胞は骨髓芽球様の形態を示し、LFB染色では好酸球顆粒を含む細胞は見られなかった。EoL-1細胞を酪酸添加培養すると培養期間に応じた増殖阻害が観察された。顆粒形成は酪酸誘導6日目までは観察されなかったが、誘導9日目では2.3±0.5%、12日目では9.9±0.5%の細胞がLFB染色陽性を示した (図1, 2)。

II. 酪酸によるチロシンニトロ化能の誘導

1. ニトロチロシンの免疫細胞化学的検出

H₂O₂およびNO₂⁻と反応させた細胞中のニトロチロシンを免疫組織化学的に観察した (図3)。酪酸非誘導細胞では50 μM H₂O₂および1 mM NO₂⁻と反応させても、ニトロチロシンは検

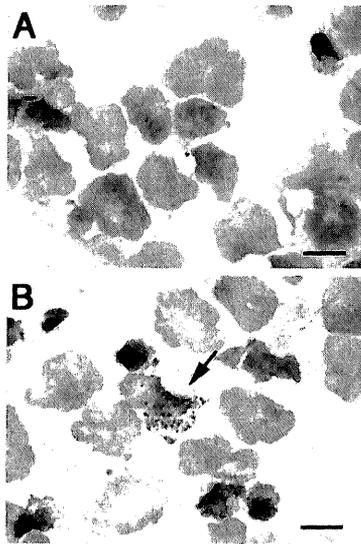


Fig. 1. Representative result of luxol fast blue staining in uninduced and butyrate-induced EoL-1 cells. Cytospin preparations of uninduced (A) and butyrate-induced EoL-1 cells (12 days) (B) were fixed with 10% neutral buffered formalin and then stained with 0.1% Solvent Blue38 in urea-saturated 70% ethanol. An eosinophilic granule-containing cell is indicated by the arrow. Bars represent 10 μm.

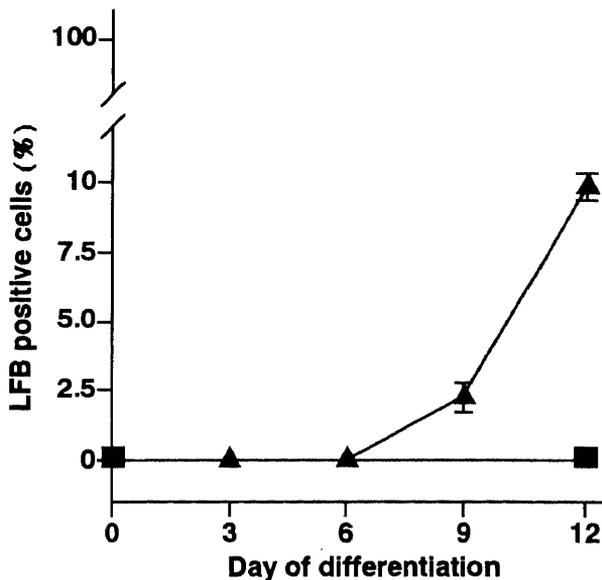


Fig. 2. Effect of butyrate on induction of eosinophilic granules in EoL-1 cells. Uninduced cells (■) showed no LFB-positive eosinophilic granules over culture periods. Butyrate-induced cells (▲) showed time-dependent increase in eosinophilic granules containing cells after 9 days of culture. Data represent X̄±SD of five experiments.

出されなかった (図3A). 酪酸誘導9日目の細胞では, $50 \mu\text{M}$ H_2O_2 存在下において, NO_2^- 濃度が $0.1 \mu\text{M}$ から 10mM の範囲で濃度依存的にニトロチロシン陽性細胞が検出された (図3B). 一方, NO_2^- 非存在下において, ニトロチロシンは検出されなかった. 一部の酪酸誘導細胞は, 1mM NO_2^- のみとの反応によりニトロチロシン抗体で染色された (図3C). $0.1 \mu\text{M}$ PMAにより刺激した酪酸誘導細胞を 1mM NO_2^- と反応させた場合と, 無刺激の誘導細胞を 1mM NO_2^- と反応させた場合で, ニトロチロシン染色の強度と陽性細胞数 (NO_2^- , $15.2 \pm 2.5\%$; PMA+ NO_2^- , $16.2 \pm 2.8\%$) において違いがみられなかった. 無刺激の酪酸誘導細胞に 1mM NO_2^- を加えた時に認められたニトロチロシンに対する免疫活性はカタラーゼの添加により消失した (図3D). ジチオナイト処理した標本の抗ニトロチロシン抗体による染色, 抗原であるニトロチロシンとあらかじめ反応させた抗ニトロチロシン抗体, もしくは非免疫ウサギイムノグロブリンを一次抗

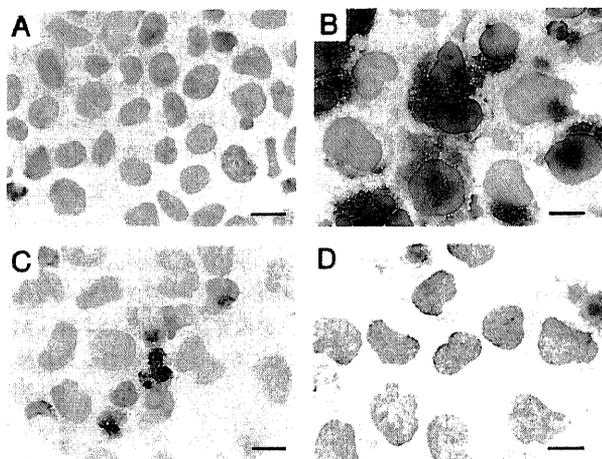


Fig. 3. Immunocytochemical detection of nitrotyrosine in EoL-1 cells. (A) Uninduced EoL-1 cells incubated with $50 \mu\text{M}$ H_2O_2 and 1mM NO_2^- . (B) Butyrate-induced EoL-1 cells incubated with $50 \mu\text{M}$ H_2O_2 and 1mM NO_2^- . (C) Butyrate-induced EoL-1 cells incubated with 1mM NO_2^- . (D) Butyrate-induced EoL-1 cells incubated with 1mM NO_2^- and catalase. Bars indicated $10 \mu\text{m}$.

体として用いた陰性対照実験では, $50 \mu\text{M}$ H_2O_2 および 1mM NO_2^- と反応させた酪酸誘導細胞における染色はみられなかった.

2. ウェスタンブロット法によるタンパク質チロシン残基ニトロ化の確認

抗ニトロチロシン抗体を用いたウェスタンブロットの結果を図4に示した. H_2O_2 および NO_2^- 非存在下では酪酸誘導及び非誘導EoL-1細胞内にタンパク質中のニトロチロシンは検出されなかった. 酪酸誘導した細胞を $50 \mu\text{M}$ H_2O_2 と 1mM NO_2^- と反応させた場合, 多くのバンドが認められ, タンパク質チロシン残

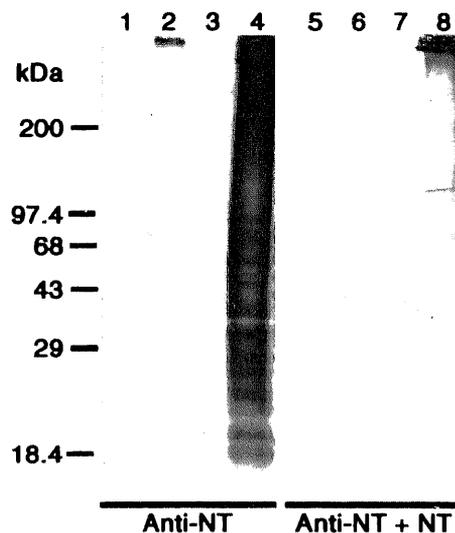


Fig. 4. Western blot analysis for nitrotyrosine. 1×10^6 cells/ml of uninduced or butyrate-induced EoL-1 cells were incubated with or without $50 \mu\text{M}$ H_2O_2 and 1mM NO_2^- at 37°C for 1 h. Nitrotyrosine-containing proteins were detected with anti-nitrotyrosine antibody on the membrane where $30 \mu\text{g}$ proteins from butyrate-induced EoL-1 cells were blotted after electrophoresis. No band was detected on negative control experiments with anti-nitrotyrosine antibody blocked with 10mM nitrotyrosine. Lane 1 and 5, uninduced EoL-1 cells; 2 and 6, uninduced EoL-1 cells incubated with $50 \mu\text{M}$ H_2O_2 and 1mM NO_2^- ; 3 and 7, butyrate-induced EoL-1 cells; 4 and 8, butyrate-induced EoL-1 cells incubated with $50 \mu\text{M}$ H_2O_2 and 1mM NO_2^- .

Table 1. Nitration of free tyrosine by human eosinophils, neutrophils, and EoL-1 cells

Reagents	Nitrotyrosine (μM)			
	Eosinophils	Neutrophils	EoL-1 cells	
			Uninduced	Butyrate-induced
$\text{H}_2\text{O}_2+\text{NO}_2^-$	$0.45 \pm 0.05^{**}$	0.05 ± 0.01	ND ^{a)}	0.30 ± 0.03
NO_2^-	0.04 ± 0.02	ND	ND	ND
H_2O_2	ND	ND	ND	ND
PMA+ NO_2^-	$1.09 \pm 0.20^{**}$	ND	ND	ND

Eosinophils, neutrophils, uninduced or butyrate-treated EoL-1 cells (2.5×10^5 cells/ $250 \mu\text{l}$) were incubated in HBSS (-) at 37°C with 1mM tyrosine, and in the presence of $50 \mu\text{M}$ NO_2^- , $50 \mu\text{M}$ H_2O_2 , $0.1 \mu\text{M}$ PMA or a combination of these reagents. After incubation for 1 hr, the reaction was stopped by pelleting the cells. Concentrations of nitrated tyrosine were determined by HPLC-UV as described in Materials and Methods. Results are expressed as the $\bar{X} \pm \text{SD}$ of five experiments. ^{a)}ND, not detected. ^{**} $P < 0.01$ versus NO_2^- group.

基の多くがニトロ化されていることを確認した。抗原であるニトロチロシンであらかじめ吸収した抗ニトロチロシン抗体を用いた陰性対照実験では、バンドは認められなかった。

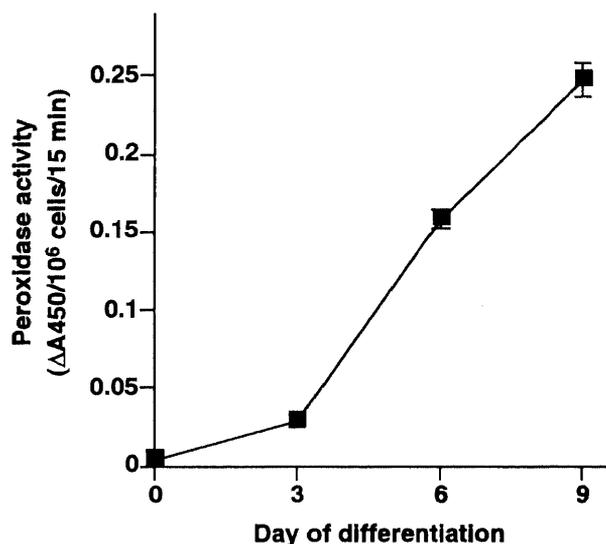


Fig. 5. Effect of butyrate on peroxidase activity in EoL-1 cells. Peroxidase activity in butyrate-induced EoL-1 cells was measured by OPD oxidation. Data represent $\bar{X} \pm SD$ of five experiments.

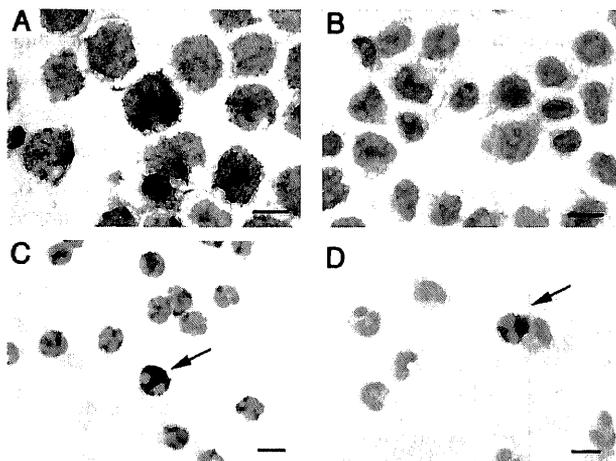


Fig. 6. Effect of cyanide on peroxidase staining in butyrate-induced EoL-1 cells and human granulocytes. Cytospin slides of butyrate-induced EoL-1 cells (9 days) or human granulocytes were stained with DAB in the presence or absence of 10 mM NaCN. Almost all butyrate-induced EoL-1 cells were stained positive with DAB in the absence of NaCN, although the intensities of peroxidase staining varied among individual cells (A). In the presence of NaCN, the peroxidase staining observed in butyrate-induced EoL-1 cells was completely suppressed (B). In granulocytes, eosinophils and neutrophils were stained positive for peroxidase (C). The staining in neutrophils was suppressed by NaCN, while the staining in eosinophils was not (D). Eosinophils in granulocytes were indicated by the arrows. Bars indicated 10 μ m.

3. 高速液体クロマトグラフィーを用いたニトロチロシンの測定

EoL-1細胞のペルオキシダーゼ依存性遊離チロシンニトロ化能をヒト好酸球および好中球と比較した(表1)。50 μ M H₂O₂及び50 μ M NO₂⁻存在下において、酪酸誘導9日目のEoL-1細胞ではニトロチロシン産生が認められたが、非誘導細胞ではニトロチロシンを検出できなかった。50 μ M H₂O₂及び50 μ M NO₂⁻存在下において、ヒト好酸球と好中球はいずれもチロシンニトロ化活性を示したが、好酸球は好中球の9倍のニトロチロシンを産生した。酪酸誘導したEoL-1細胞において産生されたニトロチロシンは好中球の6倍で好酸球と同程度の量であった。50 μ M NO₂⁻の存在下で、H₂O₂を添加せずにPMA刺激によりH₂O₂を産生させた場合には、好酸球でのみニトロチロシンが検出され、酪酸誘導したEoL-1細胞および好中球では検出されなかった。なお、本法におけるニトロチロシン検出の限界は0.03 μ Mであった。

III. 酪酸によるペルオキシダーゼの誘導

1. ペルオキシダーゼ活性の誘導

ペルオキシダーゼ活性について生化学的な活性測定により検討した結果を図5に、組織化学的に染色した結果を図6に示した。非誘導細胞中においては、いずれの方法でもペルオキシダーゼ活性を認められなかった。一方、酪酸誘導した細胞では培養期間に伴うペルオキシダーゼ活性の増加がみられた(図5)。組織化学的ペルオキシダーゼ染色においても、酪酸誘導9日目でほぼすべての細胞が陽性を示したが、その染色強度は個々の細胞によって異なっていた(図6A)。10 mM NaCN存在下におけるペルオキシダーゼ染色では酪酸誘導細胞における染色はみられなかった(図6B)。ヒト顆粒球分画のペルオキシダーゼ染色では、好中球の染色はNaCNにより抑制されたが、好酸球の染色は影響されなかった(図6C, D)。

2. 好酸球ペルオキシダーゼおよびミエロペルオキシダーゼ mRNAの検出

EoL-1細胞中のEPO mRNAは、酪酸誘導の有無にかかわらず、RT-PCRにより検出されなかった(図7)。一方、MPOのmRNA

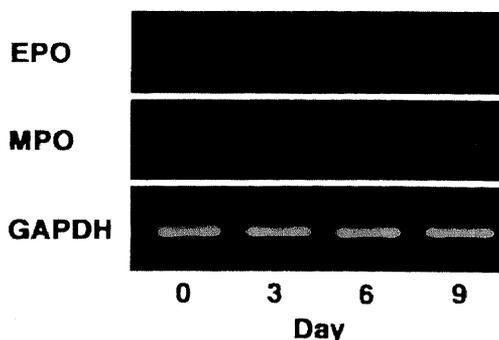


Fig. 7. RT-PCR analysis for EPO and MPO in EoL-1 cells during culture with butyrate. Each RNA (1 μ g) was reverse-transcribed and the cDNAs were subjected to PCR with primers for EPO, MPO, or GAPDH. Expression of EPO mRNA was not detected in EoL-1 cells over the culture periods. MPO mRNA was detected in butyrate-induced EoL-1 cells at 3, 6, and 9 days but none was found in the uninduced cells. RT-PCR for GAPDH indicated the levels of RNAs used were nearly same each other.

は、酪酸誘導3, 6, 9日目のEoL-1細胞で、RT-PCR (図7) およびノーザンブロット (図8) によりはっきりと検出された。非誘導細胞ではRT-PCRにおいてもMPOのmRNAは検出されなかつた (図7)。

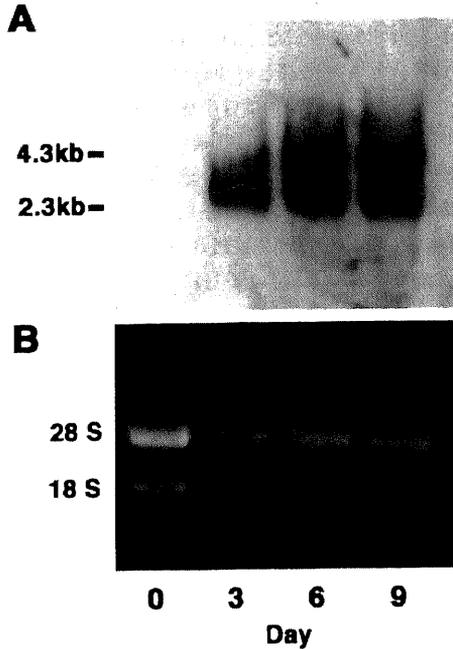


Fig. 8. Northern blot analysis for MPO. The blot containing total RNA (10 μ g) was reacted with DIG-labeled RNA probe for MPO (A). Two RNA species of 3.0 to 3.3 and 3.5 to 4.0 kb were detected in the butyrate-induced EoL-1 cells at 3, 6, and 9 days but none was found in the uninduced cells. Equal RNA loading in the lanes and the absence of RNA degradation were confirmed by staining of ribosomal RNA in the ethidium bromide-exposed gel (B).

った (図7)。ヒト前骨髄性白血病細胞系 HL-60 での報告²⁹⁾と同様の3.0kから3.3kベースと3.5kから4.0kベースの2種類のRNA種がノーザンブロットにより酪酸誘導3, 6, 9日目の細胞より検出された (図8)。

3. 好酸球ペルオキシダーゼおよびミエロペルオキシダーゼの免疫細胞化学

EPO および MPO の免疫蛍光染色の結果を図9に示した。酪酸誘導の有無にかかわらず、EoL-1細胞にはEPOに対する特異

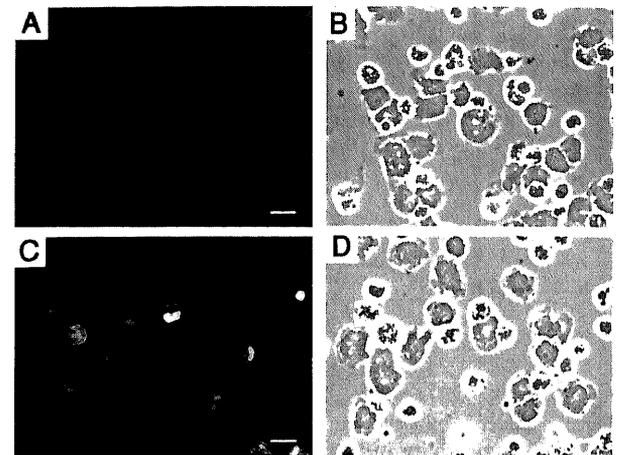


Fig. 9. Immunofluorescent detection of EPO and MPO in butyrate-induced EoL-1 cells. EoL-1 cells incubated with 0.5 mM butyrate for 6 days were stained with anti-EPO antibodies (A) and anti-MPO antibodies (C). No specific immunofluorescence of EPO was detected, while MPO was detected in the cytoplasm of butyrate-induced EoL-1 cells. Phase contrast views of the same fields as (A) and (C) are shown in (B) and (D), respectively. Bars indicated 10 μ m.

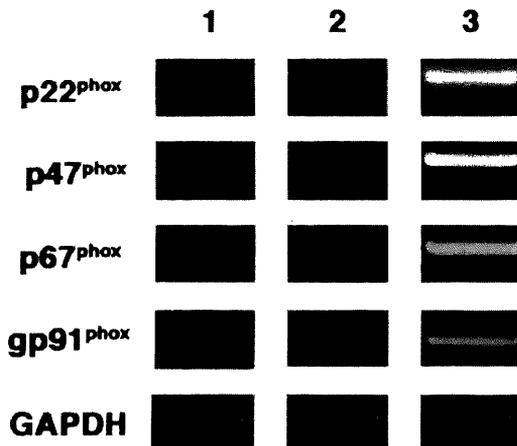


Fig. 10. RT-PCR analysis for NADPH oxidase components. Total RNAs from uninduced (Lane 1) and butyrate-induced (Lane 2) EoL-1 cells (9 days) and DMSO-treated HL-60 cells (Lane 3) were subjected to RT-PCR with primers specific for p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, or gp91^{phox}. All the components analyzed were detected in the differentiated HL-60 cells, but not in EoL-1 cells regardless of butyrate induction. RT-PCR for GAPDH indicated the levels of RNAs used were nearly equal each other.

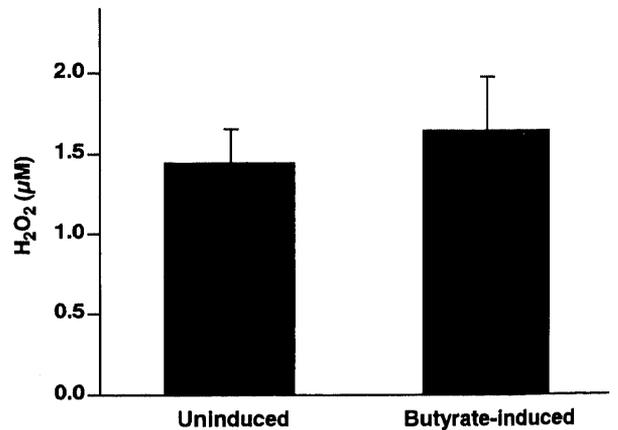


Fig. 11. Effect of butyrate on H₂O₂ levels in EoL-1 cells at resting state. Generation of H₂O₂ in uninduced or butyrate-induced EoL-1 cells (9 days) was measured by the scopoletin/HRP method. Data represent $\bar{X} \pm$ SD of five experiments.

的な免疫活性はみられなかった(図9A, B). 一方, 抗MPO抗体による免疫蛍光染色では非誘導細胞では免疫活性は認められなかったが, 酪酸誘導した細胞では細胞質に特異的なFITCの蛍光が観察された(図9C, D).

IV. スーパーオキシド, 過酸化水素産生に対する酪酸の効果

1. スーパーオキシドの測定

PMA刺激した細胞における $O_2^{\cdot-}$ 産生量を測定した結果, 好酸球および好中球ではそれぞれ $63.8 \pm 0.3 \mu\text{mol}/10^6$ 個/分および $58.6 \pm 4.3 \mu\text{mol}/10^6$ 個/分の $O_2^{\cdot-}$ 産生がみられた. しかしながら, EoL-1細胞では酪酸誘導の有無に関わらず, $O_2^{\cdot-}$ は検出されなかった.

2. NADPH オキシダーゼ mRNA の検出

NADPH オキシダーゼの4種類の構成タンパク質 (p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, gp91^{phox}) の mRNA の発現を RT-PCR により調べた結果, これら4種類のタンパク質の発現が知られている好中球様細胞へと分化誘導した HL-60 細胞では全ての mRNA が検出された. しかし, EoL-1 細胞では酪酸誘導の有無に関わらず, 4種全ての mRNA は検出されなかった(図10).

3. 過酸化水素の生成

PMAによる刺激を行っていない静止状態の細胞における H_2O_2 産生量を測定した結果, 非誘導および酪酸添加誘導9日目のEoL-1細胞は, それぞれ $1.42 \pm 0.21 \mu\text{M}$ および $1.64 \pm 0.33 \mu\text{M}$ の H_2O_2 を産生した(図11). これら2種類の細胞からの H_2O_2 産生量に統計学的有意差はみられなかった.

考 察

酪酸はEoL-1細胞を好酸球様の性質を持つ細胞へと分化誘導することが報告されている^{4)~6)}. 酪酸の分化誘導効果に関する研究はHL-60でよく知られている³⁰⁾. 近年, 分化誘導効果に加えて, 酪酸は抗増殖作用や遺伝子発現の調節, 細胞周期タンパクの調節やアポトーシスの誘導等のさまざまな機能を持つことが示されている⁹⁾. 酪酸の種々の細胞に対する効果は, 核内のヒストン脱アセチル化酵素の阻害により説明され, これにより遺伝子発現が生じ, 結果的に分化等が引き起こされると考えられている⁹⁾.

EoL-1細胞がさまざまな誘導剤により好酸球様細胞へと分化することはよく知られているが, EPOの発現を直接かつ明確に証明した報告はない. 我々は当初, 酪酸を添加することによりEoL-1細胞はEPOを発現するのではないかと考えた. しかし, 予想に反してEPOの発現は高感度検出法であるRT-PCR法や免疫蛍光染色法によっても検出することができなかった. Taiら⁸⁾は細胞内に取り込まれた後に酪酸とcAMPに分解されるdbcAMPを用いてEoL-1細胞を培養すると, 好酸球顆粒が検出されると報告している. この顆粒形成は, おもに細胞内のcAMP濃度の上昇により引き起こされ, 酪酸は単独では効果が少ないが, cAMPの効果を増強する. このことから, EoL-1細胞においては, 酪酸の好酸球分化誘導効果は小さいと考えられる.

EoL-1細胞の酪酸添加培養によるEPOの誘導はみられなかったが, ペルオキシダーゼ活性の増加は非常に顕著であった. そのペルオキシダーゼ活性はシアン感受性であり, DABを基質とした組織化学的なペルオキシダーゼ活性染色では, EPOはシアン耐性であることが知られていることから, EPO以外のシアン感受性のペルオキシダーゼが誘導されていると考えられた. MPOは好中球や単球, 一部のマクロファージに発現している

ペルオキシダーゼであり, EoL-1と同時に構築された別の細胞株であるEoL-3ではMPOが恒常的に発現しているとの報告³¹⁾から, MPOが酪酸添加によりEoL-1細胞において誘導されていることが予想された. 我々は, RT-PCR, ノーザンブロットおよび免疫蛍光染色により, MPOの酪酸による発現誘導を証明した. MPOの発現は骨髄における血球分化の過程では, 非常に初期の特異的な段階に限定されており, 分化, 成熟の過程では発現しないことが知られている³²⁾. 従って, EoL-1の酪酸によるMPO発現誘導は非常に興味深い現象であると考えられる.

喘息や腹膜炎の動物実験モデルにおけるペルオキシダーゼ依存性ニトロチロシン産生に関する研究がさかに行われている¹⁷⁾¹⁸⁾³³⁾³⁴⁾. ニトロチロシンは, もともと $O_2^{\cdot-}$ と NO^{\cdot} の拡散律速的反応により生成するONOO⁻の発生を示す指標と考えられていた¹³⁾. しかし, ONOO⁻に代わるチロシンニトロ化機構として, H_2O_2 存在下においてEPOやMPOなどのペルオキシダーゼによる NO_2^{\cdot} の酸化により生成される NO_2^{\cdot} がチロシンのニトロ化を行うことが証明された¹⁷⁾. 本研究において我々は, 酪酸添加培養したEoL-1細胞がMPO/ H_2O_2 / NO_2^{\cdot} 系によりニトロチロシンを生成させることを証明した.

本論文において, EoL-1細胞の遊離チロシンのニトロ化活性をヒト好中球や好酸球と比較した. Wuら¹³⁾は精製したEPOはMPOの4倍高いチロシンニトロ化活性を有すると報告しているが, 本研究における細胞によるチロシンニトロ化能の比較では, 好酸球が好中球の9倍であった. この精製酵素と細胞でのチロシンニトロ化の割合の違いはグルタチオンやシステイン, メチオニン, カタラーゼ, グルタチオンペルオキシダーゼなどの細胞中にある抗酸化剤の濃度や抗酸化酵素量の違いを反映していると考えられる. 酪酸添加培養したEoL-1細胞中に認められるニトロチロシンは好中球のそれより多く, 好酸球と同等であった. このことは, 酪酸添加培養したEoL-1細胞におけるMPOの発現量が好中球におけるよりも多い可能性を示唆している. また, 細胞内の抗酸化系も細胞によるチロシンニトロ化に影響を与える因子である.

好酸球や好中球の特徴的な性質の一つに, NADPH オキシダーゼによる $O_2^{\cdot-}$ 産生があげられる²⁶⁾. NADPH オキシダーゼは細胞膜成分であるgp91^{phox}とp22^{phox}と細胞質成分であるp47^{phox}, p67^{phox}, racの少なくとも5種類のタンパク質よりなる酵素で, フォルボールエステルやホルミルペプチドなどの様々な刺激により細胞質成分が細胞膜へと移行し, 複合体を再構成することにより酵素活性を発揮することが知られている³⁵⁾. NADPH オキシダーゼの4種類のサブユニット (p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, gp91^{phox}) の mRNA を RT-PCR により調べた結果, EoL-1 細胞は NADPH オキシダーゼのこれらのサブユニットを発現しておらず, また酪酸添加による誘導も起きないことが分かった. また, PMA 刺激に反応した $O_2^{\cdot-}$ の産生も認められなかった. 腫瘍壊死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α) あるいはインターフェロン- γ (interferon- γ , INF- γ) とともに培養した EoL-1 細胞は, フォルボールエステルやカルシウムイオノフォア刺激に反応して $O_2^{\cdot-}$ を産生し, その産生量は TNF- α と INF- γ をともに含む培地での培養により増強すると報告されている³⁶⁾.

H_2O_2 非存在下において, 1 mM NO_2^{\cdot} 単独との反応により, 一部の酪酸添加培養したEoL-1細胞が抗ニトロチロシン抗体を用いた免疫染色で陽性を示した. この免疫染色はカタラーゼによ

り阻害されることから、 H_2O_2 に依存した反応によりニトロチロシンが生じていると考えられる。静止状態のEoL-1細胞中に数 μM の H_2O_2 が存在することを確認した。好中球や好酸球における細胞内の H_2O_2 生成経路として最も主要な経路はNADPHオキシダーゼにより生じた $O_2^{\cdot -}$ の不均化反応($O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$)である³⁷⁾。しかしながら、EoL-1細胞におけるNADPHオキシダーゼの発現は確認できず、 H_2O_2 産生源を特定することができなかった。一般的に、生体内の H_2O_2 産生源としてミトコンドリアより漏出した $O_2^{\cdot -}$ の不均化反応やモノアミンオキシダーゼなどの酵素作用が知られており³⁷⁾、これらの H_2O_2 産生経路がEoL-1細胞においても関与しているかもしれない。

酪酸添加培養したEoL-1細胞の1 mM NO_2^- 単独との反応で生じたニトロチロシン免疫染色は、全ての細胞で観察されるわけではなく、一部の細胞でのみ陽性所見が認められた。その理由としては、まず、特にMPOの発現の高い細胞が染色されることが考えられる。また、 H_2O_2 産生量が個々の細胞により異なっていることが考えられる。しかし、ヒト好酸球において、 H_2O_2 と NO_2^- を加えた場合全ての細胞が均一に染色され(EPOの発現量が均一であることを示している)、PMA刺激した場合ニトロブルーテトラゾリウム染色($O_2^{\cdot -}$ 産生活性による染色)で全ての細胞が均一に染色されるにもかかわらず、PMAと NO_2^- 存在下では一部の細胞のみが染色されることが示されている(未発表)。このように、NADPHオキシダーゼが均一に発現している好酸球においても同様のばらつきが見られることから、個々の細胞におけるカタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼといった H_2O_2 消去系の含有量の違いがあることも推測される。

本研究では酪酸によりEoL-1細胞においてMPOが誘導されたが、HL-60細胞においては酪酸によりEPOが誘導されることが示されている³⁸⁾。この誘導されるペルオキシダーゼを分化の指標と捉え、酪酸は、EoL-1細胞を好中球・単球様細胞へ、HL-60細胞を好酸球様細胞へ分化誘導していると考えられる。今後、EoL-1細胞における酪酸によるMPOの発現調節の分子機構を解明することにより、造血幹細胞からの血球細胞、特に好中球・単球への分化のメカニズムの解明に新たな知見を与えることが期待される。また、酪酸添加培養したEoL-1細胞のチロシンニトロ化能は好酸球や好中球とは異なるが、さらなる解析により、チロシンニトロ化の機能的な重要性を解明するための材料になることが期待される。

結 論

酪酸添加培養したEoL-1細胞のペルオキシダーゼ依存性チロシンニトロ化活性に関する性質を解析し、以下の結論を得た。

1. 酪酸と培養することにより、EoL-1細胞において、EPOではなく、MPOが誘導された。
2. EoL-1細胞は静止状態において、 $1.42 \pm 0.21 \mu M$ の H_2O_2 を産生していたが、酪酸添加培養による H_2O_2 産生の量的増加は認められなかった。
3. 酪酸とともに培養したEoL-1細胞は、MPOによる H_2O_2 および NO_2^- に依存したチロシンニトロ化能を示した。
4. 酪酸添加培養したEoL-1細胞の H_2O_2 と NO_2^- の存在下におけるチロシンニトロ化能は、好中球よりも6倍高く、好酸球と同等の強さであった。

5. EoL-1細胞におけるNADPHオキシダーゼの発現は酪酸添加の有無に関わらず検出されず、フォルボールエステル刺激に伴う $O_2^{\cdot -}$ 産生もみられなかった。

以上より、酪酸添加培養したEoL-1細胞は、一般的に好酸球様細胞へ分化すると指摘されてきたが、本研究により、好酸球とは異なる一部好中球様の分化誘導も受けており、研究を進める上で注意を要すると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、直接御指導をいただきました金沢大学大学院医学系研究科環境生態医学講座萩野景規教授に深甚なる謝意を表します。また本研究の遂行に際し終始、御指導、御助言を頂きました同教室員の皆様から感謝の意を表します。

なお、本研究の一部は、第71回日本衛生学会(福島, 2001)、第1回日本NO学会(福岡, 2001)ならびにA Joint Scientific Meeting of The Society for Free Radicl Research (Australasia) and The Society for Free Radical Research (Japan) (Sydney, 2001)において発表した。

文 献

- 1) Saito H, Bourinbaier A, Ginsburg M, Minato K, Ceresi E, Yamada K, Machover D, Breard J, Mathe G. Establishment and characterization of a new human eosinophilic leukemia cell line. *Blood* 66: 1233-1240, 1985
- 2) Morita M, Saito H, Honjo T, Saito Y, Tsuruta S, Kim K-M, Tanaka M, Mori KJ, Mayumi M, Mikawa H. Differentiation of a human eosinophilic leukemia cell line (EoL-1) by a human T-cell leukemia cell line (HIL-3)-derived factor. *Blood* 77: 1766-1775, 1991
- 3) Kikuchi A, Holan V, Minowada J. Effects of tumor necrosis factor α and interferon γ on non-lymphoid leukemia cell lines: growth inhibition, differentiation induction and drug sensitivity modulation. *Cancer Immunol Immunother* 35: 257-263, 1992
- 4) Uenoyama Y, Ohshima Y, Morita M, Akutagawa H, Nambu M, Kim K-M, Mayumi M, Mikawa H. Dibutyryl cyclic AMP induces formyl peptide receptor expression and chemotactic responses in a human eosinophilic cell line, EoL-1. *Exp Hematol* 19: 823-828, 1991
- 5) Saito H, Hayakawa T, Mita H, Akiyama K, Shida T. Effect of butyric acid on induction of differentiation into eosinophil-like cells in human eosinophilic leukemia cells, EoL-1 cell line: possible role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as an autocrine differentiating factor. *Int Arch Allergy Immunol* 100: 240-247, 1993
- 6) Jung E-Y, Ohshima Y, Shintaku N, Sumimoto S-I, Heike T, Katamura K, Mayumi M. Effects of cyclic AMP on expression of LFA-1, Mac-1, and VLA-4 and eosinophilic differentiation of a human leukemia cell line, EoL-1. *Eur J Haematol* 53: 156-162, 1994
- 7) Shintaku N, Ohshima Y, Jung E-Y, Kanazashi S, Sumimoto S, Ohmori K, Heike T, Katamura K, Mayumi M. Induction of eosinophilic granules, nonspecific esterase activity and CD14 expression in the human eosinophilic leukemia cell line, EoL-1. *Hematol Oncol* 1994; 12: 129-139.
- 8) Tai G, Jung E-Y, Horiguchi Y, Kawai M, Heike T, Katamura K, Furusho K, Mayumi M. Different effects of cyclic AMP and butyrate on eosinophilic differentiation, apoptosis and bcl-2

- expression of a human eosinophilic leukemia cell line, EoL-1. *Hematol Oncol* 14: 181-192, 1996
- 9) Patnaik A, Rowinsky EK, Villalona MA, Hammond LA, Britten CD, Siu LL, Goetz A, Felton SA, Burton S, Volone FH, Eckhardt SG. A phase I study of pivaloyloxymethyl butyrate, a prodrug of the differentiating agent butyric acid, in patients with advanced solid malignancies. *Clin Cancer Res* 8: 2142-2148, 2002
- 10) Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunol* 2: 907-916, 2001
- 11) Radi R, Peluffo G, Alvarez MN, Naviliat M, Cayota A. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic Biol Med* 30: 463-488, 2001
- 12) Ischiropoulos H. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* 356: 1-11, 1998
- 13) Wu W, Chen Y, Hazen SL. Eosinophil peroxidase nitrates protein tyrosyl residues: implications for oxidative damage by nitrating intermediates in eosinophilic inflammatory disorders. *J Biol Chem* 274: 25933-25944, 1999
- 14) van der Vliet A, Eiserich JP, Halliwell B, Cross CE. Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite: a potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. *J Biol Chem* 272: 7617-7625, 1997
- 15) Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, van der Vliet A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 391: 393-397, 1998
- 16) Sampson JB, Ye Y, Rosen H, Beckman JS. Myeloperoxidase and horseradish peroxidase catalyze tyrosine nitration in proteins from nitrite and hydrogen peroxide. *Arch Biochem Biophys* 356: 207-213, 1998
- 17) Brennan M-L, Wu W, Fu X, Shen Z, Song W, Frost H, Vadseth C, Narine L, Lenkiewicz E, Borchers MT, Lusic AJ, Lee JJ, Lee NA, Abu-Soud HM, Ischiropoulos H, Hazen SL. A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vitro using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *J Biol Chem* 277: 17415-17427, 2002
- 18) Denzler KL, Borchers MT, Crosby JR, Cieslewicz G, Hines EM, Justice JP, Cormier SA, Lindenberger KA, Song W, Wu W, Hazen SL, Gleich GJ, Lee JJ, Lee NA. Extensive eosinophil degranulation and peroxidase-mediated oxidation of airway proteins do not occur in a mouse ovalbumin-challenge model of pulmonary inflammation. *J Immunol* 167: 1672-1682, 2001
- 19) Gaut JP, Byun J, Tran HD, Lauber WM, Carroll JA, Hotchkiss RS, Belaouaj A, Heinecke JW. Myeloperoxidase produces nitrating oxidants in vivo. *J Clin Invest* 109: 1311-1319, 2002
- 20) Floyd RA, Watson JJ, Harris J, West M, Wong PK. Formation of 8-hydroxyguanosine, hydroxyl free radical adduct of DNA in granulocytes exposed to the tumor promoter, tetradecanoylphorbol acetate. *Biochem Biophys Res Commun* 137: 841-846, 1986
- 21) Ogino K, Nakajima M, Kodama N, Kubo M, Kimura S, Nagase H, Nakamura H. Immunohistochemical artifact for nitrotyrosine in eosinophils or eosinophil containing tissue. *Free Radic Res* 36: 1163-1170, 2002
- 22) Ogino K, Kodama N, Nakajima M, Yamada A, Nakamura H, Ngase H, Sadamitsu D, Maekawa T. Catalase catalyzes nitrotyrosine formation from sodium azide and hydrogen peroxide. *Free Radic Res* 35: 735-747, 2001
- 23) Schneider T, Issekutz AC. Quantitation of eosinophil and neutrophil infiltration into rat lung by specific assays for eosinophil peroxidase and myeloperoxidase: application in a brown Norway rat model of allergic pulmonary inflammation. *J Immunol Methods* 198: 1-14, 1996
- 24) Bos AJ, Wever R, Hamers MN, Roos D. Some enzymatic characteristics of eosinophil peroxidase from patients with eosinophilia and from healthy donors. *Infect Immun* 32: 427-431, 1981
- 25) Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 257: 7847-7851, 1982
- 26) Someya A, Nishijima K, Nunoi H, Irie S, Nagaoka I. Study on the superoxide-producing enzyme of eosinophils and neutrophils: comparison of the NADPH oxidase components. *Arch Biochem Biophys* 345: 207-213, 1997
- 27) Ogino K, Izumi Y, Segawa H, Takeyama Y, Ishiyama H, Houbara T, Uda T, Yamashita S. Zinc hydroxide induced respiratory burst in rat neutrophils. *Eur J Pharmacol* 270: 73-78, 1994
- 28) Lu H, Ballantyne C, Smith CW. LFA-1 (CD11a/CD18) triggers hydrogen peroxide production by canine neutrophils. *J Leukoc Biol* 68: 73-80, 2000
- 29) Johnson KR, Nauseef WM, Care A, Wheelock MJ, Shane S, Hudson S, Koeffler HP, Selsted M, Miller C, Rovera G. Characterization of cDNA clones for human myeloperoxidase: predicted amino acid sequence and evidence for multiple RNA species. *Nucleic Acids Res* 15: 2013-2128, 1987
- 30) Fischkoff SA, Pollak A, Gleich GJ, Testa JR, Misawa S, Reber TJ. Eosinophilic differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line, HL-60. *J Exp Med* 160: 179-196, 1984
- 31) Hu Z-B, Ma W, Uphoff CC, Metge K, Gignac SM, Drexler HG. Myeloperoxidase: expression and modulation in a large panel of human leukemia-lymphoma cell lines. *Blood* 82: 1599-1607, 1993
- 32) Ferrari S, Tagliafico E, Ceccherelli G, Selleri L, Calabretta B, Donelli A, Temperani P, Sarti M, Sacchi S, Emillia G. Expression of the myeloperoxidase gene in acute and chronic myeloid leukemias: relationship to the expression of cell cycle-related genes. *Leukemia* 3: 423-430, 1989
- 33) Duguet A, Iijima H, Eum S-Y, Hamid Q, Eidelman D. Eosinophil peroxidase mediates protein nitration in allergic airway inflammation in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 1119-1126, 2001

- 34) MacPherson JC, Comhair SA, Erzurum SC, Klein DF, Lipscomb MF, Kavuru MS, Samoszuk MK, Hazen SL. Eosinophils are a major source of nitric oxide-derived oxidants in severe asthma: characterization of pathways available to eosinophils for generating reactive nitrogen species. *J Immunol* 166: 5763-5772, 2001
- 35) Clark RA. Activation of the neutrophil respiratory burst oxidase. *J Infect Dis* 179: S309-S317, 1999
- 36) Yoshie O, Majima T, Saito H. Membrane oxidative metabolism of human eosinophilic cell line EoL-1 in response to phorbol diester and formyl peptide: synergistic augmentation by interferon-gamma and tumor necrosis factor. *J Leukoc Biol* 45: 10-20, 1989
- 37) Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605, 1979
- 38) Yamaguchi Y, Zang D-E, Albee EA, Nagata S, Tene DG, Ackerman SJ. Functional characterization of the promoter for the gene encoding human eosinophil peroxidase. *J Biol Chem* 269: 19410-19419, 1994

Butyrate induced tyrosine nitration activity in a human eosinophilic leukemia cell line, EoL-1 Norio Kodama, Department of Environmental and Preventive Medicine, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Juzen Med Soc.*, **111**, 326 — 336 (2002)

Key words eosinophil peroxidase, myeloperoxidase, nitrotyrosine, reactive nitrogen species

Abstract

In almost every major disorder, nitrotyrosine formation was reported as a marker of the generation of reactive nitrogen species. However, the functional significance of tyrosine nitration and the toxicity of nitrotyrosine are not yet adequately understood. In this study, the human eosinophilic leukemia cell line, EoL-1, differentiated with butyrate as an eosinophilic cellular model, was evaluated for peroxidase-dependent tyrosine nitration. Butyrate suppressed cell growth and induced eosinophilic granules in EoL-1 cells after 9 days of culture. Peroxidase activity was detected biochemically and histochemically from day-3 cultures and increased in a time dependent manner. This peroxidase activity was inhibited by cyanide. Nitrotyrosine formation catalyzed by peroxidase using hydrogen peroxide (H_2O_2) and nitrite (NO_2^-) was detected at a high level similar to that of mature eosinophils. However, no expression of eosinophil peroxidase (EPO) was detected by RT-PCR or immunocytochemistry. In contrast, the induction of myeloperoxidase (MPO) by butyrate was clearly detected by RT-PCR, Northern blot, and immunocytochemical staining. In the absence of H_2O_2 , the butyrate-induced EoL-1 cells showed immunoreactivity to nitrotyrosine after incubation with NO_2^- only. However, there was no elevation of nitrotyrosine formation in phorbol ester (PMA)-stimulated EoL-1 cells. Indeed, no formation of $O_2^{\cdot -}$ was detected from PMA-stimulated cells. Moreover, mRNA for the four components of NADPH oxidase (p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, and gp91^{phox}) was not detected by RT-PCR. Small amounts of H_2O_2 were detected from EoL-1 cells in the resting state. These results suggest that EoL-1 cells differentiate to cells different from eosinophils by butyrate, and so care is needed when using the cell as an eosinophilic cellular model.