

末梢血単球による選択的ヘムオキシゲナーゼ1産生とその機能的意義

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/2297/4541

末梢血単球による選択的ヘムオキシゲナーゼ1産生とその機能的意義

金沢大学大学院医学系研究科循環医学専攻血管発生発達病態学
 (旧講座名：小児科学)
 (主任：小泉晶一教授)

市 村 昇 悦

ヘムオキシゲナーゼ (heme oxygenase, HO) は、ヘムをビリベルジン、遊離鉄、一酸化炭素に代謝する反応を触媒する酵素であり、HO-1, HO-2, およびHO-3のアイソフォームが存在する。我々は最近HO-1欠損症の世界第一例を経験し、その病態の主体が血管内皮傷害、腎尿細管傷害を中心とする広範な細胞傷害にあることをすでに報告した。さらに本例では単球の形態異常、貪食能の異常などが観察され、HO-1と単球機能との密接な関連が示唆された。そこで今回の研究では、正常ヒト末梢血単核球亜群によるHO-1産生を比較し、さらにヘムが単球機能に与える影響に関して検討した。リンパ球亜群ならびに単球の検索では、単球のみが種々のストレス刺激に反応してHO-1 mRNAを発現し、HO-1蛋白を産生した。リンパ球では高濃度のヘムによっても細胞傷害はほとんど誘導されず、構成的に発現するHO活性をHO阻害剤であるSnPP (tin protoporphyrin IX dichloride) の添加により特異的に抑制しても細胞傷害の程度に変化はなかった。一方、単球ではヘム暴露により濃度依存性に細胞傷害が誘導され、SnPP添加により著明に増強した。短時間のヘム暴露により、単球表面抗原の内CD36, CD11b, CD14の発現が特異的に低下した。さらに、ヘム刺激後の単球では、IgGによりオプソニン化した赤血球の貪食が著明に抑制され、HO-1産生が亢進した。これらの結果は、単球が強いヘム感受性を有すること、ヘムによる細胞傷害の誘導を制御するために選択的なHO-1産生機構を有すること、さらにこれらの機構の傷害による細胞内ヘムの蓄積により、細胞傷害のみでなく、細胞表面抗原の発現低下を伴う貪食機能障害が惹起されることを示している。これらの結果より、血管内皮傷害や尿管内皮傷害のみでなく、単球/貪食細胞機能障害がHO-1欠損症で観察された複雑な臨床症状発現に強く関与していることが示唆された。

Key words heme oxygenase-1, monocyte, oxidative stress, phagocytosis, cell injury

緒 言

我々は以前に、ヘムオキシゲナーゼ (heme oxygenase, HO)-1欠損症の世界第一例を経験し、その病態の主体が、血管内皮傷害、腎尿細管傷害を中心とする広範な細胞傷害に基づくことを示し報告した^{1)~4)}。この症例では、血液中にヘムが蓄積、高濃度のヘムに暴露された血管内皮細胞や腎尿細管上皮細胞において、HO-1酵素活性の欠損のために直接細胞傷害が惹起されたと推定された。患児ではさらに末梢血単球の形態異常、単球表面抗原発現の低下に加え、単球貪食能の異常に起因すると考えられる破碎赤血球の異常増加、ヘム結合蛋白の蓄積などが観察された¹⁾。HOはヘムをビリベルジン、遊離鉄、一酸化炭素に代謝する反応を触媒する律速酵素である。HOには種々の臓器に構成的に発現しているHO-2, HO-3と、肝臓や脾臓などを中心にヘム、ヘミンなどのHO基質に加え重金属、一酸化炭素、活性酸素などの種々のストレス刺激によりその産生が誘導されるHO-1とが知られている^{5)~7)}。しかし、構成的に発現するHO-2の酵素活性は低レベルであり、ストレス下でのHO活性の

ほとんどは、この誘導型のHO-1によって担われると考えられている⁵⁾。一方、単球/マクロファージを含む貪食細胞群は末梢血中ならびに種々の実質臓器に存在し、異物や病原体の貪食、抗原提示、ならびに種々のサイトカインの産生を介して、生体防御システムの恒常性の維持に極めて重要な働きを有していることが知られている。また血球貪食とヘム代謝は、老朽化した赤血球を破壊し、新しい赤血球合成のための鉄供給機構として、脾臓におけるマクロファージの重要な機能となっている。したがって、HO-1欠損によりヘム代謝が障害された場合には、遊離鉄合成低下により鉄再利用が著しく障害されるのみならず、赤血球貪食後に細胞内でヘムが多量に蓄積し、単球機能低下や細胞傷害が惹起されることが予想される。しかし、単球を含む血球系の細胞によるHO-1産生調節機構やストレス刺激下でのHO-1産生の意義についての検討はほとんどなされておらず、HO-1欠損症の報告も我々の報告以外にはないことから、HO-1酵素活性の欠損が実際に単球機能にどのような影響を与えるかは全く不明である。今回の研究では、種々のストレス刺激により誘導される末梢血リンパ球ならびに単球によるHO-1産生を

平成13年10月1日受付、平成13年11月22日受理

Abbreviations : CD, cluster of differentiation; FCS, fetal calf serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; HLA-DR, human leukocyte antigen - DR; HO, heme oxygenase; LDL, low density lipoprotein; LPS, lipopolysaccharide; MFI, mean fluorescence intensity; NK, natural killer; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; PE, phycoerythrin; PI,

比較し、特に単球によるHO-1産生の意義を検討した。また、ヘム暴露による細胞傷害の誘導とHO-1による細胞傷害の抑制を比較し、酸化ストレス下における単球の細胞保護と機能維持に対するHO-1依存性も検討した。さらに、ヘム暴露の単球表面抗原発現、貪食能におよぼす影響を検討し、HO-1欠損症例で観察された単球機能低下に起因すると思われる種々の異常との関連を考察した。

材料および方法

I. 材 料

1. 細胞の調製

1) 単核球の分離

健康成人よりヘパリン加末梢静脈血を得た後、フィコールハイパーク (Ficoll-Hypaque) 比重遠心法にて単核球を分離した。単核球はさらに、2-アミノエチルイソチオウロニウムブロマイド (2-aminoethylisothiuroniumbromide) (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) 処理ヒツジ赤血球を用いてロゼット法とフィコールハイパーク比重遠心法によりヒツジ赤血球ロゼット (Eロゼット) 形成細胞とEロゼット非形成細胞に分離した。

2) 単球の濃縮

Eロゼット非形成細胞は、5% 非働化ウシ胎児血清 (fetal calf serum, FCS) (Nipro Co. Ltd., Osaka, Japan) を含む RPMI 1640 培養液 (Gibco Laboratories, Grand Island, USA) に 2×10^6 /ml の濃度で浮遊させたのち 75cm^2 培養フラスコ (Costar, Corning Incorporated, Corning, USA) に 10ml ずつ分注し 37°C , 5% CO_2 , 30分間培養し、フラスコ付着細胞とフラスコ非付着細胞に分離した。このフラスコ付着細胞を単球として以後の実験に用いた。

3) リンパ球サブセットの単離

Eロゼット形成細胞は、0.01% アジ化ナトリウム (NaN_3), 3% 非働化 FCS を加えた PBS (pH 7.2) に 1×10^7 /ml の濃度で浮遊させ、フルオレッセン・イソチオシアン酸 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識抗ヒト CD (cluster of differentiation) 4 単クローン抗体 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Mountain View, USA) とフィコエリスリン (phycoerythrin, PE) 標識抗ヒト CD8 単クローン抗体 (Becton Dickinson) を結合させ、セル・ソーター EPICS ELITE (Coulter Corporation, Hialeah, USA) により CD4 陽性 T 細胞, CD8 陽性 T 細胞に単離した。また、Eロゼット非形成細胞より単球を分離した後のフラスコ非付着細胞は、0.01% NaN_3 , 3% FCS を加えた PBS に 1×10^7 /ml の濃度で浮遊させ、FITC 標識抗ヒト CD16 単クローン抗体 (Ortho Clinical Diagnostics, Tokyo, Japan) と PE 標識抗ヒト CD20 単クローン抗体 (Becton Dickinson) を結合させ、セル・ソーター EPICS ELITE により CD16 陽性 NK 細胞, CD20 陽性 B 細胞に単離した。

2. 試薬の調製

HO-1 産生誘導には、ヘミン (hemin) (Sigma), 塩化カドミウム (CdCl_2) (和光純薬工業, 大阪) あるいは亜硫酸 (NaAsO_2) (和光純薬工業) を培養液に種々の濃度に添加して用いた。ヘミン, あるいは塩化カドミウムの添加のないものを対照とした。HO

活性の抑制にはスズプロトポルフィリン (tin protoporphyrin IX dichloride, SnPP) (AFFINITY Research Products Ltd., Mamhead, UK) を $100 \mu\text{M}$ の濃度で用いた。

II. 方 法

1. 細胞培養

細胞は、10% FCS, 25 mM ヘペス (Hepes) 緩衝液, 5×10^{-5} M 2-メルカプトエタノール (2-mercaptoethanol), ペニシリン 100 単位/ml, ゲンタマイシン $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む RPMI 1640 培養液に 1×10^6 /ml の濃度で浮遊させ、 37°C , 5% CO_2 の条件下ポリプロピレン製 5ml チューブ (IWAKI 2215-012) を用いて培養した。ただし、フラスコ培養付着細胞の生存率の解析では、 25cm^2 細胞培養フラスコ (Costar) を用いて試料を加えた後に 37°C , 5% CO_2 の条件下で培養した。

HO-1 産生の濃度依存性の検討は、末梢血単球あるいはリンパ球を種々の濃度のヘミン, 塩化カドミウムあるいは亜硫酸を添加し、8時間培養した。経時変化の検討は、これらの細胞にヘミン $100 \mu\text{M}$, 塩化カドミウム $10 \mu\text{M}$, 亜硫酸 $10 \mu\text{M}$ を添加し、種々の時間培養した。培養後の細胞のHO-1産生を後述するフローサイトメトリーにより定量的に評価した。HO-1 発現の評価は、無刺激下で培養した細胞の平均蛍光強度 (Mean fluorescence intensity, MFI) を測定しこれを対照とし、刺激細胞の MFI を測定後、両者の差を Δ MFI として算出した。予備実験にて無刺激培養によりHO-1発現が全く誘導されないことを、後述する免疫組織染色ならびにイムノブロットティングにより確認している。

2. HO-1 蛋白発現の解析

1) 免疫組織染色

刺激後の末梢血単核球を 1×10^5 /ml に調整後、 $50 \mu\text{l}$ を細胞遠心沈殿装置 Cytospin2 (Shandon Southern Products, Cheshire, UK) を用いてシリランコーティングスライドガラス (DAKO Co., Copenhagen, Denmark) 上に遠沈してサイトスピン標本を作成し、十分に風乾させた後 4°C アセトンで固定した。トリスアミノメタン緩衝生理食塩水 (Tris-buffered saline, TBS) (pH 7.2) にて洗浄し、4% 正常ヤギ血清 (Normal goat serum) (DAKO) を加えた TBS で 30分間ブロッキング処理後、200倍希釈のウサギ抗ヒトHO-1ポリクローナル抗体 (SPA896, Affinity Bioreagents, USA) を一次抗体として室温で1時間反応させた。TBSにて5分、3回洗浄後アルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギ・抗マウス血清 (DAKO Corporation, Carpinteria, USA) を二次抗体としてさらに30分間反応させた。0.1M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.6) にて洗浄後、0.1M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.6) 9.8ml に Naphthol AS-MX phosphate (Sigma) 2mg, シアゾジウム塩 (Fast red TR salt, Sigma) 10mg, レバミゾール (Levamisole, Sigma) 2.4mg を溶解したものを基質として発色させた。発色後、蒸留水内で反応を止め、Mayer ヘマトキシリン溶液にて核染色を行い、観察した。

2) フローサイトメトリー

刺激後の末梢血単核球 1×10^7 /ml を PBS にて 2 回洗浄後、PBS にて調製した 4% パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde)

pröpidium iodide; RT, reverse transcribed; SB, saponin buffer; SnPP, tin protoporphyrin IX dichloride; TBS, Tris-buffered saline; WB, washing buffer

で室温、20分間固定した。PBSにて2回洗浄後、3% FCS, 0.1% NaN_3 を加え、PBSにて調製した0.2% サポニン緩衝液 (Saponin buffer, SB) で室温、20分間反応させて単核球細胞壁に孔をつくり、一次抗体として上記SBにて1,000倍希釈したマウス抗ラットHO-1モノクローナル抗体 (ヒトHO-1と交差反応、慶應義塾大学末松誠博士より供与) を添加し室温、30分間反応させた。反応後、3% FCS, 0.1% NaN_3 を加えたPBS (Washing buffer, WB) にて2回洗浄後、二次抗体としてFITC標識ヤギ抗マウス抗体 (TAGO Inc., Burlingame, USA) を添加、4℃、30分間反応させた。2カラーフローサイトメトリーによる解析の場合にはWBにて2回洗浄後、正常マウス血清 (DAKO) を添加してブロッキング後、PE標識抗ヒトCD4単クローン抗体 (DAKO), 抗ヒトCD8単クローン抗体 (DAKO), 抗ヒトCD16単クローン抗体 (Becton Dickinson) あるいは抗ヒトCD20単クローン抗体 (Becton Dickinson) を4℃、20分間反応させた。WBにて2回洗浄後、約600 μl のWBに浮遊させ、フローサイトメーターCytoron Absolute (Ortho Diagnostic System, 東京) を用いて、各細胞におけるHO-1の発現を解析した。

3. HO-1 mRNA 発現の解析

1) RNA の抽出

刺激後の細胞 1×10^6 に対してTRIZOL Reagent (ライフテック オリエンタル(株), 東京) を1ml用いて試料となる細胞を溶解し、室温にて5分間静置した後、99.5%クロロホルム200 μl を加え、よく混和し、室温にて3分間静置した後に12,000回転/分にて15分間遠心沈殿し、上清を1.7mlエッペンドルフチューブに移した。その上清に99.5% 2-プロパノールを500 μl 加え、室温にて1分間静置した後に12,000回転/分にて10分間遠心沈殿した。上清を除去し、80%エタノールを1ml加えて沈殿物を溶解し、室温にて1分間静置後に8,000回転/分にて5分間遠心沈殿し、エタノールを乾燥消失させた後に1×Tris-EDTA緩衝液 (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 6.8, 1×TE) 50 μl に溶解した。一部を取り、260nmの吸光度を測定して全RNA量を計算した。

2) 逆転写反応

ランダムヘキサヌクレオチドプライマー (Random hexanucleotide primer, Takara, 大津) を鋳型として、逆転写酵素 RAV-2 (Takara) を用いた。逆転写反応は、以下の二段階にて行った。まず、試料を総RNA 2 μg を含むように1×Tris-EDTA (TE) (pH 6.8) にて希釈し23.5 μl に容量を調整し、希釈した試料を鋳型として80 μM ランダムヘキサヌクレオチドプライマーを1.5 μl 加えて、GeneAmp™ PCRシステム 9600-R (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division, Foster City, California, USA) を用いて、65℃で10分間保持後、20分かけて25℃まで徐冷することでRNAの変性とプライマーをアニーリングさせた。次にRAV-2に付属の逆転写反作用緩衝液 (5×RAV-2 Reverse Transcriptase Buffer) に各1mM dNTP (Pharmacia, USA) を加えた緩衝液 24.5 μl とRAV-2 0.5 μl (10単位) を加えて、GeneAmp™ PCRシステム 9600-Rを用いて、42℃で60分間保持し、cDNAを合成させた後、90℃、2分間でRAV-2を失活させた。得られたcDNAに1×TE (pH 7.0) 50 μl を加えてcDNA鋳型とした。

3) cDNA を用いたPCR法

HO-1のcDNA塩基配列はゲノムデータベース (Genome Data

Base, Baltimore, USA) より引用した。今回HO-1遺伝子の翻訳領域のうち、エクソン1からエクソン3領域がHO-2遺伝子との相同性が低いことに着目して独自にPCRプライマーを、5'末端側を5'-GAGGGGAGCTCGCAGGAG-3', 3'末端側を5'-AATGGCACCCGTGACTTCC-3'と設定し、それぞれ5N, 3Nと呼ぶことにした。これにより得られるPCR反応産物は、399bpとなる。プライマーの合成は、フナコシ (株) (東京) に委託した。逆転写反応よりえられた試料5 μl を鋳型として、各プライマー (最終濃度 0.2mM), 2 μM の各dNTP, PCR反応緩衝液 [10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl_2], Taq DNAポリメラーゼ (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, USA) 1.25単位を加え全量を50 μl とした。PCR法は、GeneAmp™ PCRシステム 9600-Rを用い、94℃にて5分間の初期変性の後、95℃にて30秒間の変性過程、50秒後に57℃にて30秒のアニーリング、35秒後に72℃にて90秒の伸長反応 (extension), 60秒後に再び変性過程に戻るサイクルを35サイクルおよび40サイクル行った。反応後10分の1容量のタイプII泳動緩衝液 (0.25% ブロモフェノールブルー, 0.25% キシレンシアノール, 15% フィコール400) を加え、15 μl を1.5% アガロースゲル (H14-Takara, Takara) で50Vにて電気泳動し、泳動したアガロースゲルをエチジウムブロマイド染色後、紫外線照射装置 (トランスイルミネーター, フナコシ) 上で観察した。

4. ヘミン誘導細胞傷害

末梢血単核球に種々の濃度のヘミンを添加し24時間培養後PBSにて2回洗浄し、最終濃度1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のヨウ化プロピジウム (propidium iodide, PI) を添加し、フローサイトメトリーにて解析した。単球領域、ならびにリンパ球領域を設定し、それぞれの領域においてPIにて染色されず、前方散乱の低下しない細胞を生細胞として算定した。培養開始前の試料中のPIにて染色されない生存リンパ球および生存単球を100とし、培養後の生存細胞比率を算定した。

5. ヘミン刺激による単球機能の変化

1) ヘミン刺激による単球表面抗原の変化

各々の試料をPBSにて2回洗浄後、単球におけるCD11b, CD14, CD16, CD36およびHLA-DR (human leukocyte antigen-DR) の発現を、PE標識抗ヒトCD11b単クローン抗体 (Becton Dickinson), FITC標識抗ヒトCD14単クローン抗体 (Ortho), FITC標識抗ヒトCD16単クローン抗体, FITC標識抗ヒトCD36単クローン抗体 (Ortho), FITC標識抗ヒトHLA-DR単クローン抗体 (Becton Dickinson) を用いて染色の後フローサイトメトリーにて解析した。

2) ヘミン刺激による単球貪食能の変化

末梢血単核球より非ロゼット形成細胞を分離、これを単球分画とし、その1mlを5mlのポリプロピレンチューブで培養した。培養は100 μM のヘミン, 100 μM のSnPP, あるいは両者を添加して施行した。対照にはいずれも添加しなかった。培養開始6時間後に蛍光標識ラテックス・ビーズ (Latex Beads mean diameter 1.1 μm) (Sigma) あるいは抗D抗体感作自己赤血球を添加し、さらに1時間培養した。感作赤血球の作成はO型赤血球をPBSにて3回洗浄後、3%赤血球浮遊液とし、パイオクローン抗D (Ortho) を混和、震盪しながら37℃、30分間反応させた。反応終了後、PBSにて3回洗浄し赤血球ペレットを作成

した。1mlの細胞浮遊液に感作赤血球ペレットを5 μ l, 蛍光標識ラテックス・ビーズを0.5 μ l添加した。培養終了後, 蛍光標識ラテックス・ビーズの貪食能は, フローサイトメトリーを用いて単球領域の細胞の蛍光シグナル陽性比率により定量した。感作赤血球の貪食能は, 細胞混合液をPBSにて洗浄後, 非貪食赤血球をNH₄Cl 155mM, KHCO₃ 10mM, ならびにEDTA \cdot 2Na 0.1mMを含む溶血試薬にて溶血後, さらにPBSにて洗浄, サイトスピン標本を作成した後, May-Giemsa染色を施行し, 顕微鏡下で貪食単球比率を算定した。

6. 感作赤血球貪食によるHO-1産生誘導

末梢血単核球より非ロゼット形成細胞を分離し, その1mlを5mlポリプロピレンチューブで培養した。培養開始時に抗D抗体感作O型赤血球を添加した。1mlの細胞培養に感作赤血球ペレット5 μ lを添加し, 6時間培養を行った。培養終了後PBSにて洗浄, 非貪食赤血球を溶血試薬にて溶血, さらにPBSにて洗浄しサイトスピン標本を作成した後, ウサギ抗HO-1抗体を用

いた免疫組織染色によりHO-1産生を検討した。

7. 統計学的処理

統計学的処理はStudentのt検定にて行った。

成 績

I. 末梢血単核球亜群によるHO-1産生

1. 単球ならびにリンパ球によるHO-1産生の比較

末梢血単核球をヘミン, 塩化カドミウムあるいは亜砒酸を添加して培養後, サイトスピン標本を作成, HO-1蛋白発現を免疫組織染色にて検討した(図1A~D)。いずれの刺激によっても, 明らかに単球の形態を示す細胞にのみ強いHO-1産生が確認され, リンパ球における産生はほとんど認められなかった。対照とした無刺激培養では, 単球におけるHO-1産生も全く誘導されなかった。さらに, フローサイトメトリーによる検討でも, 単球領域の細胞にのみHO-1産生が確認され, リンパ球に

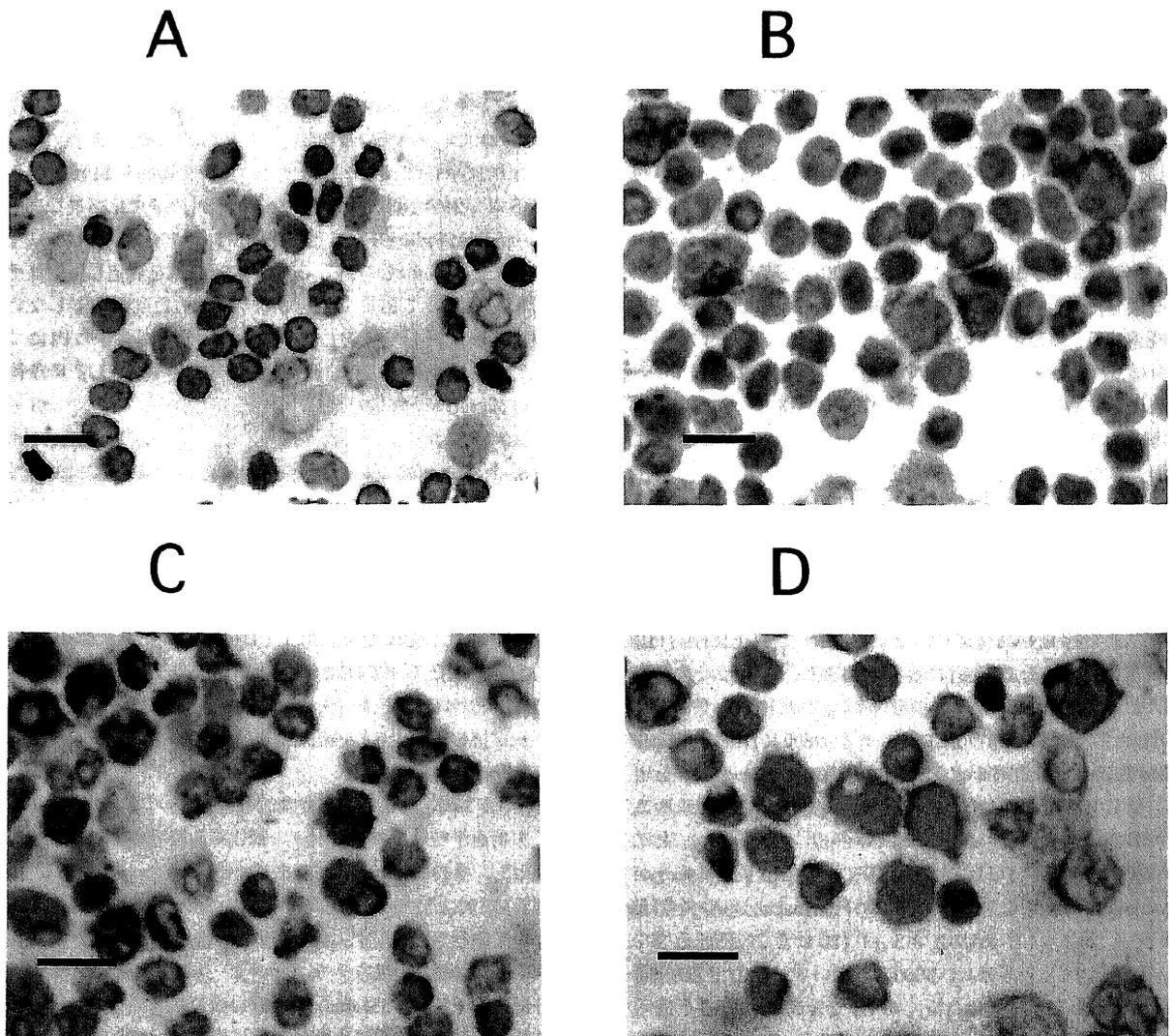


Fig. 1. Immunohistochemical staining of HO-1 in PBMCs. PBMCs were cultured alone (A), with 100 μ M hemin (B), with 10 μ M cadmium chloride (C) or with 10 μ M sodium arsenite (D) for 8 hrs. Cytospin preparations were made after the culture and they were stained with anti-HO-1 antibody. Scale bar indicates 20 μ m.

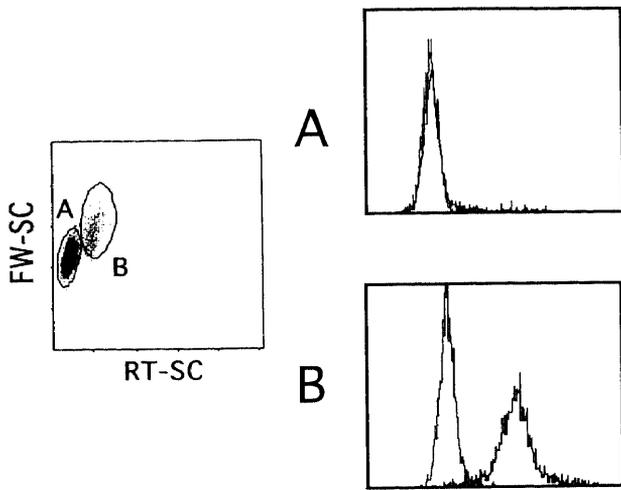


Fig. 2. Flow cytometric analysis of HO-1 production by PBMCs. HO-1 productions by lymphocytes (A) and monocytes (B) were compared. X axis denotes fluorescence intensity of FITC (HO-1). Y axis denotes cell numbers. FW-SC is forward scatter, and RT-SC is right scatter. Solid and dotted lines indicate staining with anti-HO-1 antibody and with isotype-matched control antibody, respectively.

よる HO-1 産生は極めてわずかしか認められなかった (図2)。

2. HO-1 産生の濃度依存性

末梢血単核球を種々の濃度 (0.16~100 μM) のヘミン、塩化カドミウムあるいは亜砒酸添加により8時間培養し、単球ならびにリンパ球のHO-1発現をフローサイトメトリーにより検討した。HO-1発現の強度は無刺激培養細胞を対照として、MFIの差 (ΔMFI) により比較した (図3A~C)。単球では各刺激に対して低濃度でHO-1産生が誘導され、濃度依存性に増加、亜砒酸では4 μM 、ヘミンならびに塩化カドミウムでは20 μM の刺激にて最大となった。一方、リンパ球ではヘミンによるHO-1産生誘導はほとんど認められず、塩化カドミウムおよび亜砒酸でも20 μM 以上の濃度ではじめて少量のHO-1産生誘導が観察された。ただし、いずれの刺激においてもリンパ球でのHO-1産生は単球と比較し明らかに少なかった。

3. HO-1 産生の経時的変化

末梢血単核球にヘミン、塩化カドミウムあるいは亜砒酸をそれぞれ100 μM 、10 μM 、10 μM の濃度で添加し、経時的にHO-1産生の変化をフローサイトメトリーにより比較した (図4

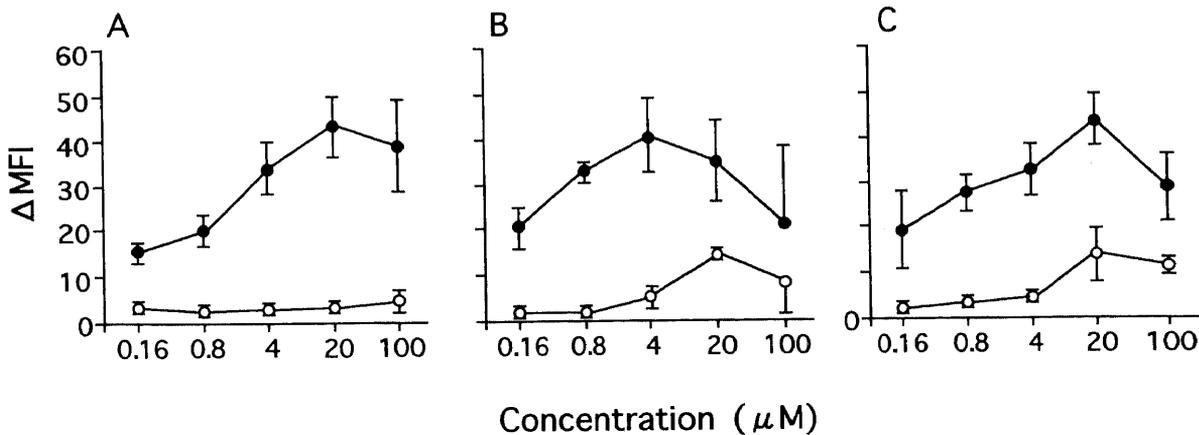


Fig. 3. Dose responses of HO-1 production by monocytes (●) and lymphocytes (○). PBMCs were stimulated with various concentrations of hemin (A), cadmium chloride (B) or sodium arsenite (C) for 8 hrs and HO-1 production was evaluated by flow cytometry. The data represent the $\bar{X} \pm \text{SD}$ of 5 independent experiments.

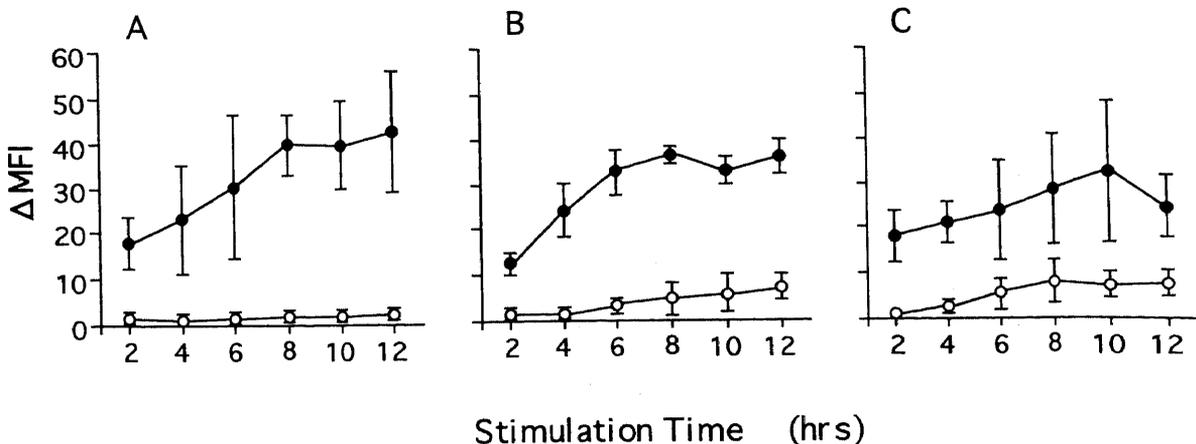


Fig. 4. Kinetics of HO-1 production by monocytes (●) and lymphocytes (○). PBMCs were stimulated with 100 μM hemin (A), 10 μM cadmium chloride (B) or 10 μM sodium arsenite (C) for various time and HO-1 production was evaluated by flow cytometry. The data represent the $\bar{X} \pm \text{SD}$ of 5 independent experiments.

A～C). 単球では刺激培養開始2時間にてすでにHO-1の産生が認められ、その後徐々に増加し8～10時間で最大値に達した。一方、リンパ球ではヘミン添加によっては全くHO-1産生は誘導されず、塩化カドミウム、亜砒酸による刺激では培養開始6時間より弱いHO-1産生が誘導され、8時間で最大値に達した。

4. リンパ球亜群によるHO-1産生

各リンパ球亜群におけるHO-1産生を2カラーフローサイトメトリー法により解析した。PE標識抗CD4, CD8, CD16あるいはCD20抗体により染色される陽性細胞集団に領域設定し、それぞれのリンパ球亜群におけるHO-1産生の強度を比較した(図5)。CD20陽性細胞においては少量であるが有意なHO-1産

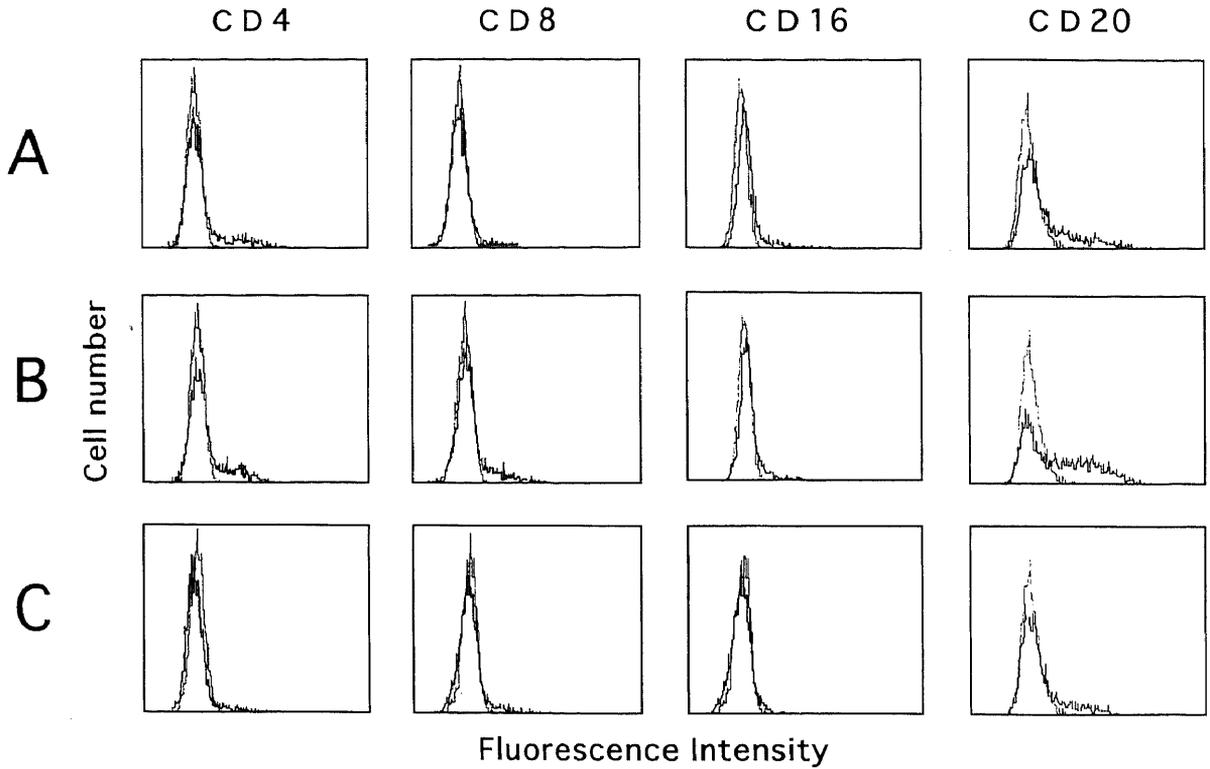


Fig. 5. HO-1 production by lymphocyte subpopulations. Peripheral blood lymphocyte subpopulations were stimulated with 100 μ M hemin (A), 10 μ M sodium arsenite (B) or 10 μ M cadmium chloride (C) for 8 hrs and HO-1 expressions were evaluated by flow cytometry. Solid and dotted lines indicate staining with anti-HO-1 antibody and with isotype-matched control antibody, respectively.

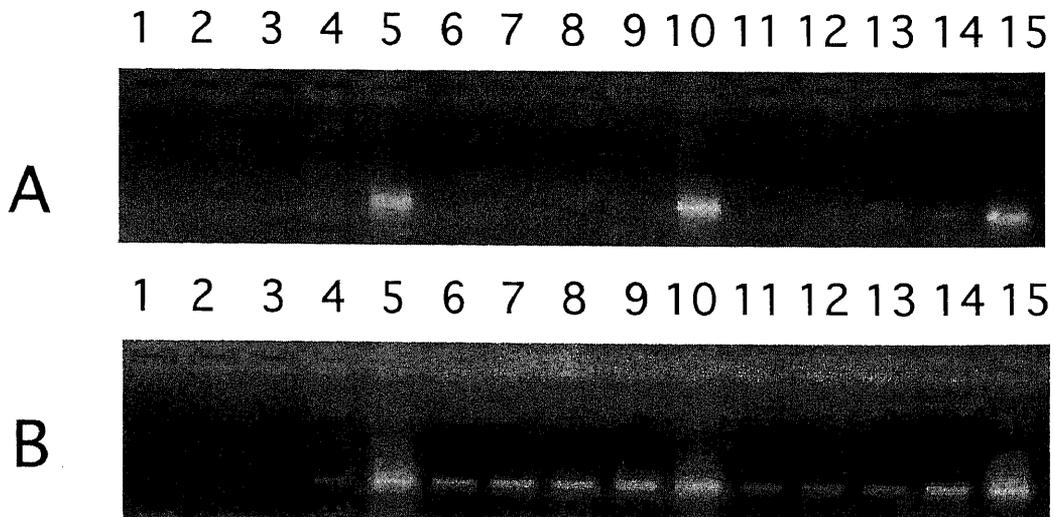


Fig. 6. HO-1 mRNA expression by PBMCs subpopulations. Monocyte-enriched fraction (5,10,15) purified CD4⁺ T cells (1,6,11), CD8⁺ T cells (2,7,12), CD16⁺ NK cells (3,8,13), and CD20⁺ B cells (4,9,14) were stimulated with 100 μ M hemin (1～5), 5 μ M sodium arsenite (6～10) or 20 μ M cadmium chloride (11～15) for 2 hr. HO-1 mRNA expression were compared by RT-PCR with 35 (A) or 40 (B) cycles of reactions.

生が観察された。ただし、単球におけるHO-1の発現よりは明らかに弱かった。その他のリンパ球亜群であるCD4陽性細胞、CD8陽性細胞、CD16陽性細胞でのHO-1産生は刺激の種類に関らず極めて少量であった。

II. 末梢単核球亜群によるHO-1 mRNA発現

単離した単球ならびに各リンパ球亜群を各種刺激因子を添加して2時間培養、RT-PCR法によりHO-1 mRNA発現を比較した。半定量的評価の目的でPCRサイクル数を35(図6A)ならびに40(図6B)の2段階に設定した。単球では、ヘミン100 μ M、塩化カドミウム20 μ M、亜硫酸5 μ Mの各刺激にてHO-1 mRNAの強い発現が認められた。PCRサイクル数が35サイクルでは、各刺激におけるリンパ球亜群におけるHO-1 mRNAの発現はほとんど認められなかったが、PCRサイクル数を40サイクルに増加させたところ、各リンパ球亜群でのHO-1 mRNAの発現が認められるようになった。中でもCD20陽性細胞での発現が比較的強く誘導されることが明らかとなった。これらの

結果より、HO-1産生の誘導が新たなmRNA発現に由来するものであることが明らかにされ、さらに末梢血単核球によるHO-1産生の主体が単球であることが確認された。

III. ヘミン誘導細胞傷害

末梢血単核球を種々の濃度のヘミン存在下で24時間培養し、生細胞比率をフローサイトメトリーにより検討した。低濃度のヘミン添加ではリンパ球の細胞傷害はほとんど誘導されず、HO活性抑制剤であるSnPP添加によっても細胞傷害の増強は観察されなかった(図7A)。50 μ M以上の高濃度のヘミンにより有意な細胞傷害が誘導された。一方、単球では低濃度のヘミン添加により著明な細胞傷害の誘導が確認され、SnPP添加により細胞傷害は増強された(図7B)。さらに、単球ではヘミン無添加であってもSnPPのみにより明らかな細胞傷害が誘導された。

IV. ヘミンによる単球機能抑制

1. 表面抗原発現の変化

単球を濃縮したEロゼット非形成細胞をヘミン100 μ M、SnPP 100 μ Mあるいは両者を共に添加して6時間培養、培養後の各表面抗原発現をフローサイトメトリーにより検討した(図8)。細胞傷害の検討では、培養6時間後の単球の細胞傷害はほとんど観察されなかった。ヘミン、SnPPのいずれも添加せずに培養した、対照単球のMFIとの差を Δ MFIとして表現した。CD45あるいはHLA-DR発現はヘミンあるいはSnPP添加によりほとんど変化が認められなかった。CD36ならびにCD16発現はSnPPの添加によっては有意な変化が観察されなかったが、

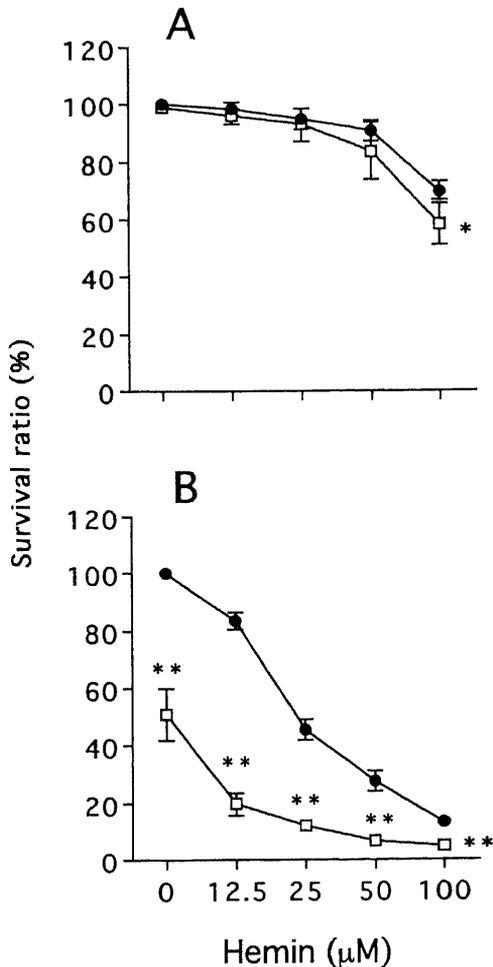


Fig. 7. Hemin-induced cell injury of peripheral blood lymphocytes and monocytes. PBMCs were cultured for 24 hr with medium alone, 100 μ M hemin (●) or 100 μ M hemin with 100 μ M SnPP (□). Lymphocyte (A) and monocyte (B) regions were gated separately and cell injury was determined by flow cytometry. The data represent the $\bar{X} \pm$ SD of 3 independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

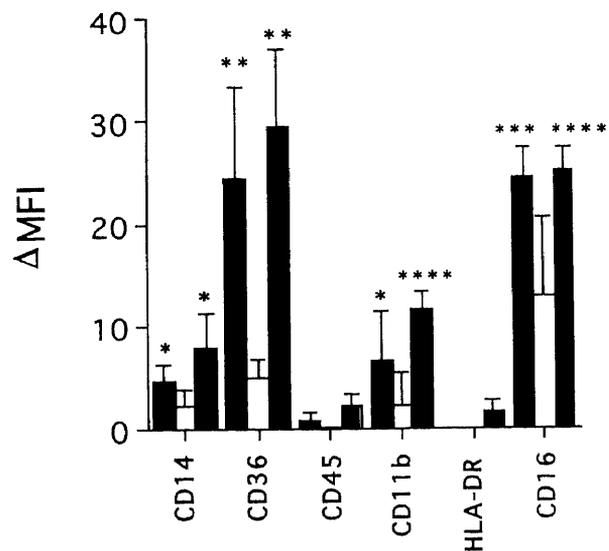


Fig. 8. Modulation of surface marker expression on hemin-treated monocytes. Monocytes were cultured with medium alone, 100 μ M Hemin (■), 100 μ M SnPP (□) or 100 μ M hemin with 100 μ M SnPP (●) for 6 hrs. After culture, expressions of monocyte antigens were compared by flow cytometry. The data represent the $\bar{X} \pm$ SD of 3 independent experiments. * $p < 0.1$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$, **** $p < 0.005$.

ヘミン添加により著明に抑制された。CD14ならびにCD11b発現も程度は弱いヘミン添加により明らかな発現低下が認められた。

2. 単球貪食能の抑制

濃縮した単球を培養し、蛍光標識ラテックス・ビーズあるいは

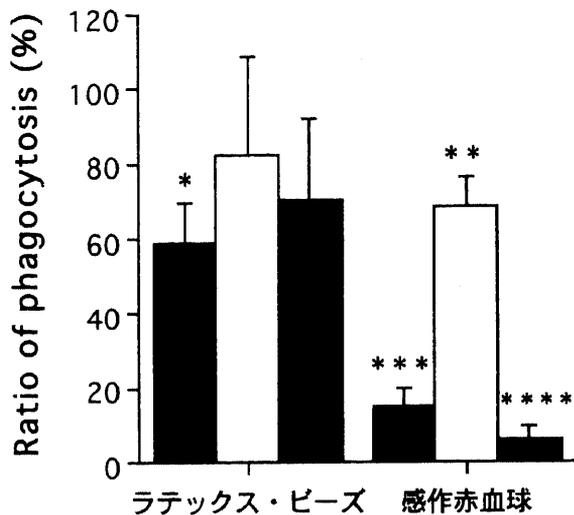


Fig. 9. Effect of hemin-treatment on monocyte phagocytosis. The phagocytosis of latex beads and opsonized RBC were compared after the culture with hemin (■), SnPP (□) or both (◼). The data represent the $\bar{X} \pm SD$ of 3 independent experiments. * $p < 0.1$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

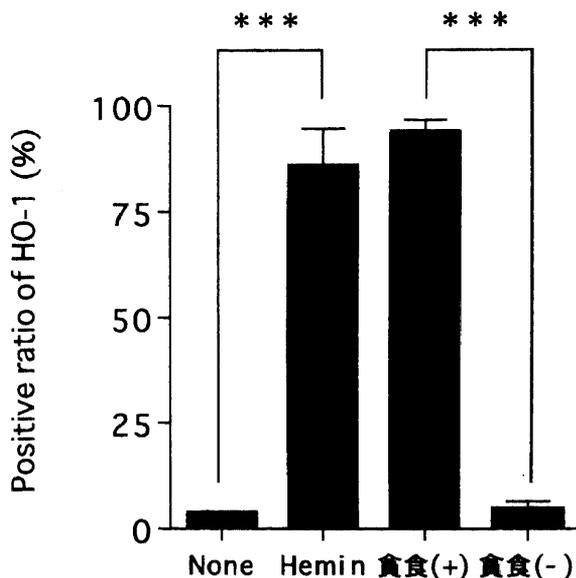


Fig. 10. HO-1 production by monocytes after erythrophagocytosis. Monocytes were cultured with opsonized erythrocytes. After the culture, cytospin preparations were made and HO-1 production by monocytes undergoing erythrophagocytosis was evaluated by immuno histochemistry. The data represent the $\bar{X} \pm SD$ of 3 independent experiments. *** $p < 0.001$.

は感作赤血球の貪食率に与えるヘミンの影響を比較検討した(図9)。SnPP単独の添加では、いずれの貪食も抑制されなかった。ヘミン添加により感作赤血球貪食が著明に抑制され、SnPPの添加によりさらに抑制は増強された。一方、ヘミン添加によりラテックス・ビーズの貪食も抑制されたが、その程度は極めてわずかであり、SnPP添加による増強も認められなかった。

V. 感作赤血球貪食によるHO-1産生誘導

感作赤血球と共に培養した後の単球濃縮分画のサイトスピン標本を作成、免疫組織染色により赤血球貪食とHO-1産生の関連を検討した(図10)。無刺激培養ならびにヘミン添加培養を対照とした。無刺激ではほとんどHO-1産生は誘導されず、ヘミン添加培養により高率に単球のHO-1産生が誘導された。感作赤血球を貪食した単球では、ほぼすべてに強いHO-1産生が観察された。一方、血球を貪食していない単球ではHO-1産生は全く認められなかった。

考 察

我々は世界第一例目のHO-1欠損症の患児を経験した¹⁾。患児には様々な症候がみられたが、なかでも患児血清中にはヘモグロビンまたはメトヘモグロビンと結合したハプトグロビンが著明に増加していた。また、著しい高脂血症を認め、さらに凝固・線溶系の異常にも関わらず血小板数は異常に増加し、増加した血小板は凝集機能を欠如していた。また、破碎赤血球の増加も著明で、血管内皮傷害と脾臓の欠如がその一因であると考えられた。しかし、これら異常血球の増加に加え、ヘム蛋白の蓄積、さらに高脂血症は脾臓の欠損だけでは説明が困難であった。一方、患児の末梢血単球の形態は正常者のそれと比較し大型で、なかには空胞を形成しているものもみられた。さらに、単球表面抗原のうち、種々の分子の受容体として貪食機能と強く関連していることが示唆されているCD36抗原発現の著明な低下が観察された。CD36は膜変性赤血球の貪食や変性低比重リポ蛋白(low density lipoprotein, LDL)の貪食に関与し、スカベンジャー受容体として重要な機能を果たすことが知られており⁹⁻¹¹⁾、HO-1欠損症においては血管内皮傷害¹⁾や尿管上皮細胞傷害⁹⁾のみでなく、単球を含む網内系細胞傷害あるいは機能抑制による貪食能障害も多彩な症状発現に強く関連している可能性が示唆された。今回の検討では、網内系細胞におけるHO-1発現の意義を明らかにするために、末梢血単核球におけるHO-1産生誘導と貪食能との関連を検討した。

臓器に常在する単球系の細胞としては、肝臓のKupffer細胞、脾臓マクロファージ、肺マクロファージさらに腹腔マクロファージなどが知られている¹²⁾。この内、すでに肝臓Kupffer細胞では常時HO-1が産生されていることがラットにおける研究で報告されており¹³⁾、この細胞が酸化ストレスに対する応答のみでなく、肝における微小循環還流調節のための一酸化炭素供給機能を有していることが示唆されている⁹⁾。また、これまでの臓器別の検討でも脾臓や肝臓において誘導型のHO-1の局在が示されており⁹⁾¹³⁾、単球/マクロファージ系細胞がHO-1産生の主体であることが予想された。今回の検討では、予想通り単球に選択的なHO-1の産生が確認され、リンパ系細胞におけるHO-1産生に比較し極めて高いHO-1産生が誘導されることから、ストレス刺激下では単球が著明に反応することが明らかとな

った。リンパ球亜群の一部、特にB細胞においても少量のHO-1産生の誘導が観察されたが、その発現誘導は単球に比較し遅くまた高濃度の酸化ストレス刺激が必要であることから、通常の生体内での応答には重要な貢献はしていないと考えられる。Willis¹⁴⁾らやMarini¹⁵⁾らは、血球細胞がHO-1を発現することで酸化ストレスに対して保護的に作用している可能性を報告している。これらの研究では末梢血単核球におけるHO-1産生を検討しており、リンパ球がその主たる産生細胞であるとしている。これに関連して、単球や気道上皮細胞でも酸化ストレスに対してHO-1が保護的な作用をしていることが報告されている¹⁶⁾¹⁷⁾。また、Menzel¹⁸⁾らはリンパ球におけるHO-1の発現は重金属による障害の程度を把握する点で有用としている。しかし、Marini¹⁵⁾らやMenzel¹⁸⁾らのしめした方法では末梢血単核球を「リンパ球」として用いており、HO-1産生が主として単球に由来するものか、リンパ球に由来するものかに関しては明らかにしていない。彼等は末梢血リンパ球の単離にフィコールハイパークによる比重遠心法を用いていることから、当然単球が多量に含まれることになる。また、MenzelらはEpstein-Barr (EB) ウイルスにより形質転換したB細胞もHO-1産生細胞として用いており、リンパ球によるHO-1産生の証拠として示している。末梢血B細胞と異なり、EBウイルスにより形質転換された細胞株においてはHO-1産生が強く誘導されることを著者らはすでに報告しており¹⁾、末梢血リンパ球と株化した細胞との性質の違いを反映していると考えられる。したがって、生体内での酸化ストレス暴露の指標としてHO-1産生を検討する場合には、今回の研究で示した様に単球におけるHO-1産生を検討することが簡便で鋭敏な方法となると考えられる。

単球においては種々の酸化ストレスによりHO-1産生が強く誘導されると同時に、長時間のヘミン暴露により容易に細胞傷害が誘導された。このような細胞傷害はHO活性抑制剤であるSnPPの添加により著明に増強することから、単球がヘミン暴露に極めて感受性が高いこと、さらにHO-1のみならず構成的に発現するHO-2が単球の生存に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。これまでに細胞の種類によるヘミン感受性やHO依存性を比較検討した研究はなく、このようなリンパ球と単球のヘミン感受性やHO依存性の著しい差異はHO-1産生量の差だけでは説明が困難である。腫瘍細胞株を用いてHO産生の差異を検討した研究は散見されるが^{19)~22)}、細胞系統の差異によりどのようなHO-1遺伝子発現調節機構の差が存在するのか全く不明であり、今後の研究の課題である。

HO-1欠損症例では患児末梢血単球の形態異常の他に、単球表面CD36抗原発現の著明な低下が観察された。このようなCD36発現の低下は試験管内で数時間培養することにより速やかに正常レベルに回復することから、遺伝的に規定された一次的な異常ではなく、HO-1欠損症に続発する二次的な異常と考えられた。CD36は、トロンボスポンジン受容体、熱帯型マラリア感染赤血球受容体、酸化LDL受容体、ホスファチジルセリン (phosphatidyl serin) 受容体など多機能な受容体として機能することが知られており、^{9)~11), 23)~25)} 単球におけるCD36発現低下と本症例で観察された破碎赤血球や血小板の増加、高LDL血症との強い関連が示唆された。今回の検討では、100 μ Mのヘミン添加により数時間の内に単球表面CD36発現は著明に抑制され、患児末梢血中に蓄積したヘムが単球表面抗原の発現異常を惹起していた可能性が示唆された。興味深いことに、

ヘムの添加によりCD36抗原発現のみでなく、CD14、CD16およびCD11b抗原の発現も抑制された。CD14は、リポポリサッカライド (lipopolysaccharide, LPS) 受容体としてこれと高親和性に結合する。またグラム陰性桿菌がLPSを産生する際に中和作用をもたらす、エンドトキシンショックを防ぐ役割がある²⁶⁾。CD16は、Fc γ R IIIで、リガンドはIgG1とIgG3のFcである²⁷⁾²⁸⁾。また、単球・顆粒球では、CD16だけではなく、CD32 (Fc γ R II)²⁹⁾やCD64 (Fc γ R I)も関与してIgG-Fcに結合、貪食する。CD11bは別名MAC-1あるいはCR3 (complement receptor 3) として知られており、ICAM-1 (intercellular adhesion molecule -1)、フィブリノゲン、C3biまたはC3d/C3dgがIドメインに結合するとされている³⁰⁾³¹⁾。これらはC3の分解物で膜侵襲複合体となる経路をはずれて不活性化されているが、標的となる細菌、赤血球の膜に結合しているので、そこに単球・顆粒球が結合して貪食に結びつく。Yan³²⁾らが、網内系細胞における赤血球の貪食に関して、肝臓のKupffer細胞がオプソニン化された赤血球を貪食し、分解するためにCR3 (CD11b/CD18) の発現が重要であることを示している。特にFc γ 受容体としてのCD16や補体受容体としてのCD11b発現低下がオプソニン化赤血球の貪食に影響を与える可能性が予想される。このように多彩な単球表面抗原発現が抑制されたが、CD45発現やHLA-DR発現は全く抑制されていないこと、主として異物の貪食の関与する抗原が選択的に抑制されていることから、ヘミン添加による表面抗原発現抑制は特定の抗原に対する選択的発現抑制であると考えられる。しかし、このような表面抗原発現の抑制がどのレベルで調節されているのか詳細な検討はまだされておらず、今後の検討課題である。また、ヘミン添加の影響が表面抗原発現の抑制に留まるのか単球の他の機能にも影響があるのかについても検討されなければならない。

ヘミン暴露により主として貪食に深く関ると考えられる抗原の発現が抑制されたことから、このような抗原発現の低下が実際に貪食機能の低下を直接誘導するか否かを検討した。感作赤血球の貪食が細胞表面の特異的抗原を必要とするのに対して、ラテックス・ビーズの貪食は、膜表面の受容体発現に関係なく非特異的に貪食されると考えられている。蛍光標識ラテックス・ビーズは好中球貪食能の解析に頻用されるが、今回の検討では膜抗原非依存性に単球の貪食能を検討する指標として用いた。ヘミン添加により感作赤血球の貪食は著明に抑制され、SnPP添加により増強されたこと、ラテックス・ビーズの貪食がヘミン添加やSnPPの影響をほとんど受けていないことから、ヘミンによる表面抗原発現抑制との関連が強く示唆される。

今回の培養系、なかでも、ヘミンとSnPPの両方が加えられた培養系は、HO-1活性の欠損があり、かつヘムがビリルビンへと代謝されずその結果体内にヘムが蓄積している状態、つまり、HO-1欠損症患児に類似した状況である。実際のHO-1欠損症患児の単球に関しては、ヘムによる細胞傷害のため正常単球と比較し、空胞変性や大型化といった形態学的変化をともなっていた。また、患児単球では、今回のポリプロピレンチューブ内での実験系と異なり、CD36だけではなくHLA-DRの発現も正常対象者のそれと比較し、著しく低下していた。このような違いが生じた理由は今回の検討からは不明であるが、SnPPでHO-1活性を抑制していたとはいえ、今回用いた細胞がHO-1を少量でも産生できる細胞であることが関与しているのかもしれないし、また、HO-1欠損患児の単球は、生体内において長期

間へムに曝されていたことから、へムによる細胞傷害が関係している可能性もある。

感作赤血球を貪食している単球は、へミンでの刺激を受けた場合と同等に高率にHO-1を発現している。同様にBraggins³³⁾らは、ラットの脾臓での赤血球貪食で赤血球から放出されるヘモグロビンが脾臓マクロファージのHO-1の活性を誘導していることを示している。脾臓に限らず、体内の網内系細胞は老朽赤血球を貪食する可能性を有しており、例えば、脾摘出術を施行された場合には、他臓器の網内系細胞が、代償的に赤血球を貪食すると考えられる。したがって、老朽赤血球を貪食した網内系細胞ならびにへムに常時暴露される細胞にとってHO-1の発現は、へムを代謝し、へムによる細胞傷害を防御するために不可欠と考えられる^{25) 34) 35)}。これに関連してClerget³⁶⁾らは、HO-1を含む熱ショック蛋白の産生がU937での赤血球貪食において保護的な作用をしていることを示している。さらに、Raley³⁷⁾らはマクロファージの貪食に酸化ストレスが加わったときにマクロファージの機能低下が認められるが、赤血球貪食でみられるマクロファージの機能不全は酸化ストレスのみでは誘導されず、FcγRの発現低下によるものとしている。

以上より、末梢血単核球のうち単球が選択的にHO-1を産生する事実は、老朽赤血球の貪食に伴う酸化ストレスに暴露される頻度の高い単球が、ヘモグロビンをすみやかに代謝し、さらにへムによる細胞傷害を抑制する機能的特異性と密接に関連していると考えられる。また、へムの刺激による表面抗原の発現低下が網内系細胞の貪食を抑制することも示された。今後、HO-1の欠損と単球機能を中心とした免疫能に関する検討される必要があると思われる。

結 論

末梢血単核球によるHO-1産生を比較した。また単球におけるHO-1発現の機能的意義を検討し、以下の結果を得た。

- 1) 末梢血単核球においては、へム暴露により単球に特異的にHO-1産生が誘導された。それに対して、リンパ球各亜群によるHO-1産生はごくわずかのみ検出可能であった。
- 2) へミンは単球を特異的に傷害し、その細胞傷害はHO活性の抑制により増強した。一方、リンパ球はへミン暴露によっても傷害されず、HO活性抑制の影響はほとんど認められなかった。
- 3) へミン暴露により単球表面抗原のうち、特に異物認識に関与するCD11b, CD14, CD16, CD36の発現が抑制された。一方、CD45やHLA-DRの発現は全く影響を受けなかった。
- 4) これらの単球表面抗原発現の低下を反映して、へミン暴露により感作赤血球貪食が特異的に抑制されたが、ラテックス・ビーズ貪食の抑制は極めてわずかであった。
- 5) 感作赤血球の貪食により、単球では著明なHO-1産生が誘導された。非貪食単球ではHO-1産生は全く認められず、HO-1産生誘導がオプソニン化赤血球との単純な接触ではなく、血球貪食刺激により惹起されたと考えられた。
- 6) 以上の結果より、末梢血単核球の内、単球が選択的にHO-1を産生すること、そのへム暴露環境下ではその細胞保護と機能維持にHO-1が重要な働きを果たすことが示された。さらにHO-1欠損症では、これまで知られていた鉄再利用傷害、内皮細胞傷害、尿管管傷害の他に単球機能障害により惹起される症状が病態形成に深く関与している可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終るに臨み、御指導と御校閲を賜りました金沢大学大学院医学系研究科循環医学専攻血管発生発達病態学講座 小泉晶一教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究を直接御指導、御教示賜りました金沢大学医学部保健学科医学検査講座 谷内江昭宏教授に心から謝意を表します。また、本研究の遂行に貴重な御助言をいただきました東馬智子先生に厚く御礼申し上げます。さらに、多大なる御協力をいただきました金沢大学医学部小児科学講座の皆様にも心から感謝申し上げます。本研究の一部は第29回日本免疫学会総会・学術集会(京都 1999)において発表された。

文 献

- 1) Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T, Ohta K, Kasahara Y, Koizumi S. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest* 103: 129-135, 1999
- 2) 金田 尚. ヘムオキシゲナーゼ1欠損症1家系における遺伝子異常ならびに細胞傷害機構の解析. *十全医学会雑誌* 108: 91-102, 1999
- 3) Ohta K, Yachie A, Fujimoto K, Kaneda H, Wada T, Toma T, Seno A, Kasahara Y, Yokoyama H, Seki H, Koizumi S. Tubular injury as a cardinal pathologic feature in human heme oxygenase-1 deficiency. *Am J Kidney Dis* 35: 863-870, 2000
- 4) Saikawa Y, Kaneda H, Yue L, Shimura S, Toma T, Kasahara Y, Yachie A, Koizumi S. Structural evidence of genomic exon-deletion mediated by Alu-Alu recombination in a human case with heme oxygenase-1 deficiency. *Hum Mutat* 16: 178-179, 2000
- 5) Mahin MD. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J* 2: 2557-2568, 1998
- 6) Taketani S, Kohno H, Yoshinaga T, Tokunaga R. The human 32-kDa stress protein induced by exposure to arsenite and cadmium ions is heme oxygenase. *FEBS Lett* 245: 173-176, 1989
- 7) Elibirt KK, Bonkovsky HL. Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role. *Proc Assoc Am Physicians* 111: 438-447, 1999
- 8) Lewis M, Yesner LM, Huh HY, Pearce SF, Silverstein RL. Regulation of monocyte CD36 and thrombospondin-1 expression by soluble mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16: 1019-1025, 1996
- 9) Daviet L, McGregor JL. Vascular biology of CD36: roles of this new adhesion molecule family in different disease states. *Thromb Haemost* 78: 65-69, 1997
- 10) Han J, Hajjar DP, Febbraio M, Nicholson AC. Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36. *J Biol Chem* 272: 21654-21659, 1997
- 11) Maxeiner H, Husemann J, Thomas CA, Loike JD, Khoury JE, Silverstein SC. Complementary roles for scavenger receptor A and CD36 of human monocyte-derived macrophages in adhesion to surfaces coated with oxidized low-density lipoproteins and in secretion of H₂O₂. *J Exp Med* 188: 2257-2265, 1998
- 12) 内藤 眞. マクロファージの分布と形態. 生命を支えるマクロファージ(高橋 潔, 内藤 眞, 竹屋元裕編), 第1版, 13-24頁, 文光堂, 東京, 2001

- 13) Goda N, Suzuki K, Naito M, Takeoka S, Tsuchida E, Ishimura Y, Tamatani T, Suematsu M. Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver. Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. *J Clin Invest* 101: 604-612, 1998
- 14) Willis D, Moore AR, Frederick R, Willoughby DA. Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat Med* 2: 87-90, 1996
- 15) Marini M, Frabetti F, Musiani D, Franceschi C. Oxygen radicals induce stress proteins and tolerance to oxidative stress in human lymphocytes. *Int J Radiat Biol* 70: 337-350, 1996
- 16) Bornman L, Baladi S, Richard MJ, Tyrrell RM, Polla BS. Differential regulation and expression of stress proteins and ferritin in human monocytes. *J Cell Physiol* 178: 1-8, 1999
- 17) Yamada N, Yamaya M, Okinaga S, Lie R, Suzuki T, Nakayama K, Takeda A, Yamaguchi T, Itoyama Y, Sekizawa K, Sasaki H. Protective effects of heme oxygenase-1 against oxidant-induced injury in the cultured human tracheal epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21: 428-435, 1999
- 18) Menzel DB, Rasmussen RE, Lee E, Meacher DM, Said B, Hamadeh H, Vargas M, Greene H, Roth RN. Human Lymphocyte Heme Oxygenase 1 as a Response Biomarker to Inorganic Arsenic. *Biochem Biophys Res Commun* 250: 653-656, 1998
- 19) Takeda K, Ishizawa S, Sato M, Yoshida T, Shibahara S. Identification of a cis-Acting Element That Is Responsible for Cadmium-mediated Induction of the Human Heme Oxygenase Gene. *J Biol Chem* 269: 22858-22867, 1994
- 20) Menzel DB, Hamadeh HK, Lee E, Meacher DM, Said V, Rasmussen RE, Greene H, Roth RN. Arsenic binding proteins from human lymphoblastoid cells. *Toxicol Lett* 105: 89-101, 1999
- 21) Masuya Y, Hioki K, Tokunaga R, Taketani S. Involvement of Tyrosine Phosphorylation Pathway in Induction of Human Heme Oxygenase-1 by Hemin, Sodium Arsenite, and Cadmium Chloride. *J Biochem* 124: 628-633, 1998
- 22) Keyse SM, Tyrrell RM. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 99-103, 1989
- 23) Person AM. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 8: 20-28, 1996
- 24) Suzuki H, Kurihara Y, Takeyama M. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 386: 292-296, 1997
- 25) Terpstra V, van Berkel TJ. Scavenger receptors on liver Kupffer cells mediate the in vivo uptake of oxidatively damaged red blood cells in mice. *Blood* 95: 2157-2163, 2000
- 26) Wright SD, Ramos RA, Tobias PS. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249: 1431-1433, 1990
- 27) Wirthueller U, Kurosaki T, Murakami MS. Signal transduction by Fc γ R II (CD16) is mediated through the γ chain. *J Exp Med* 175: 1381-1390, 1992
- 28) 右田俊介 CD16a, b. CD抗原ハンドブック 別冊 医学のあゆみ (右田俊介, 高橋信弘編), 140-143, 医歯薬出版, 東京, 1999
- 29) Wiener E, Dellow RA, Mawas F, Rodeck CH. Role of Fc gamma R II a (CD32) in IgG anti-RhD-mediated red cell phagocytosis in vitro. *Transfus Med* 6: 235-241, 1996
- 30) 右田俊介 CD11b, c. CD抗原ハンドブック 別冊 医学のあゆみ (右田俊介, 高橋信弘編), 124-128, 医歯薬出版, 東京, 1999
- 31) Schiff DE, Rae J, Martin TR, Davis BH, Curnutte JT. Increased phagocyte Fc γ R I expression and improved Fc γ -receptor-mediated phagocytosis after in vivo recombinant human interferon- γ treatment of normal human subjects. *Blood* 90: 3187-3194, 1997
- 32) Yan J, Vetvicka V, Xia Y, Hanikyrova M, Mayadas TN, Ross GD. Critical role of Kupffer cell CR3 (CD11b/CD18) in the clearance of IgM-opsonized erythrocytes or soluble β -glucan. *Immunopharmacology* 46: 39-54, 2000
- 33) Braggins PE, Trakshel GM, Kutty RK, Maines MD. Characterization of two heme oxygenase isoforms in rat spleen: comparison with the heme-in-induced and constitutive isoforms of the liver. *Biochem Biophys Res Commun* 141: 528-533, 1986
- 34) Balla J, Jacob HS, Balla G, Nath K, Vercellotti GM. Endothelial cell heme oxygenase and ferritin induction by heme proteins: a possible mechanism limiting shock damage. *Trans Assoc Am Physicians* 105: 1-6, 1992
- 35) Sears DA, Anderson PR, Foy AL, Williams HL, WH Crosby. Urinary iron excretion and renal metabolism of hemoglobin in hemolytic diseases. *Blood* 1966 28: 708-725.
- 36) Clerget M, Polla BS. Erythrophagocytosis induced heat shock protein synthesis by human monocyte-Macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1081-1085, 1990
- 37) Raley MJ, Loegering DJ. Role of an oxidative stress in the macrophage dysfunction caused by erythrophagocytosis. *Free Radic Biol Med* 27: 1455-1464, 1999

Selective Heme Oxygenase-1 Production by Circulating Monocytes and Its Functional Significance Shoetsu Shimura, Department of Pediatrics, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 – J. Juzen Med Soc., **110**, 327 – 338 (2001)

Key Words heme oxygenase-1, monocyte, oxidative stress, phagocytosis, cell injury

Abstract

Heme oxygenases (HO) are rate-limiting enzymes that catalyze the conversion of heme into biliverdin, free iron and carbon monoxide. They exist in three different isoforms, HO-1, -2 and -3. Recently, we have experienced the first known human case of HO-1 deficiency. We have already reported that the symptoms exhibited by the patient were the result of widespread cell damage, including to the vascular endothelial and renal tubular epithelial cells. In addition, morphological and phagocytic abnormalities of circulating monocytes in the blood were observed in the patient, suggesting same correlation between HO-1 activity and phagocytosis of the monocytes. In this study, the production of HO-1 by peripheral blood mononuclear cells and the functional significance of stimulation by various oxidative stresses including hemin were investigated. Among the different lymphocyte subpopulations and monocytes, monocytes alone responded rapidly to stress stimuli, resulting in the expression of HO-1 mRNA and production of HO-1 protein. Few cell injuries were induced in lymphocytes, even by high concentrations of hemin in combination with an HO inhibitor, SnPP. By contrast, significant cell injuries were induced in monocytes, with remarkable enhancement by SnPP. Short term exposure of monocytes to high concentration of hemin induced a significant reduction in the cell surface antigen CD36, CD11b and CD14. Furthermore, phagocytosis of IgG-opsonized erythrocytes by monocytes was markedly impaired and significant expression of HO-1 was observed. These results indicate that monocytes are preferentially sensitive to hemin exposure and that they have a mechanism of selective production of HO-1 to control hemin-induced cell injury. Taken together, these findings indicate that dysfunction of intracellular heme metabolism leads not only to cell damage, but also to impairment of the phagocytic function of monocytes due to a reduction in the expression of cell surface molecules. In conclusion, it is likely that, in addition to the vascular endothelial and renal tubular cell damage, a functional disturbance of the monocyte/macrophage system significantly contributed to the pathological findings observed in the HO-1 deficiency case.