


2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

— 在留中国人研究者研究助成 —

2002年3月2日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名 華 見 
所属機関名 順天堂大学医学部生化学第二
指導責任者氏名 長岡 功
職 名 教授
所 在 地 〒113-8421 東京都文京区本郷 2-1-1
電 話 03-5802-1033 内線 3516

1. 研究テーマ

好酸球の成熟過程における活性酸素生成酵素の発現の検討

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における発表 有 ・ 無 (学会名・演題)

1. 華 見、岩渕和久、秋元智博、坂本廣司、長岡 功 好中球機能におよぼすグルコサミンの影響 第74回日本生化学会大会抄録集 1044, 京都, 2001.
2. 華 見、岩渕和久、秋元智博、坂本廣司、長岡 功 グルコサミンの好中球機能におよぼす影響の検討 第22回日本炎症・再生医学会プログラム予稿集 358, 東京 2001.
3. Nagaoka I., Hua J.(華 見), Iwabuchi K., Tsutsumi-Ishii Y., Niyonsaba F., Sakamoto K. Inhibitory actions of glucosamine, a therapeutic agent for osteoarthritis, on the functions of neutrophils. Society for leukocyte biology 35th Annual Meeting Maui, Hawaii, USA 2001
4. 長岡 功、華 見、坂本廣司 グルコサミンの好中球機能におよぼす影響 キチン・キトサン研究第15回シンポジウム特集 108-109, 米子 2001

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

1. Hua J.(華 見), Hasebe T., Someya A., Nakamura S., Sugimoto K., Nagaoka I.: Evaluation of the expression of NADPH oxidase components during maturation of HL-60 clone 15 cells to eosinophilic lineage. *Inflamm. Res.* 50, 156-167, 2001.
2. Hasebe T., Hua J.(華 見), Someya A., Morain P., Checler F., Nagaoka I.: Involvement of cytosolic prolyl endopeptidase in the degradation of a splice variant protein of p40-phox, an NADPH oxidase component, in myeloid cells. *J. Leukoc. Biol.* 69, 963-968, 2001.
3. 長岡 功、華 見、坂本廣司 グルコサミンの好中球機能抑制作用とそのメカニズム キチン・キトサン研究 7, 261-265, 2001.

3. 今後の研究計画

グルコサミンは、グルコサミノグリカン（ムコ多糖）の主成分として結合組織や軟骨組織に多く分布し、各器官の強度、柔軟性、弾力性に寄与している。そして、グルコサミンは変形性関節症の治療薬あるいは栄養補助食品として近年注目を集めている。一方、好中球は炎症反応において重要な役割を担っており、炎症反応が惹起されると、組織に浸潤し、活性酸素やプロテアーゼなどの種々の活性物質を放出して組織障害を引き起こすことが知られている。われわれは、グルコサミンが活性酸素生成能、貪食、遊走能、接着分子の発現、アクチンの重合、粘着能など好中球機能を影響するかどうかを検討する。さらに、グルコサミンには血流速度の改善効果があるので、グルコサミンが血小板凝集などの機能に影響するかどうかを検討する。


4. 指導責任者の意見

華見さんは上海第二医科大学を1987年に卒業した後、上海紡一病院で血液内科を9年間専攻してきました。1997年から一年間私どもの教室の研究生として、さらに、1998年からは大学院生として生化学の研究に従事してきました。

昨年、「2001年度日中医学協力事業・在留中国人研究助成」をいただいて、「好酸球の分化成熟過程における活性酸素生成酵素の研究」を行い、その成果を昨年生化学会に発表しました。その内容は昨年 *Inflammation Research* に掲載されるに至りました。

彼は研究熱心で、毎日研究室で朝早くから夜遅くまで自分の研究に没頭しています。大変優秀な研究者で、性格もまじめで、積極性があり、かつ身心ともに健康な人物です。

我々は今後の彼の学問的発展に大いに期待しているところです。

指導責任者氏名 長岡 功 

5. 研究報告書

別紙報告書作成要領により、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真を添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

好酸球の成熟過程における活性酸素生成酵素の発現の検討—

研究者氏名 華 見

中国所属機関 中国上海普陀区人民医院内科

日本研究機関 順天堂大学医学部生化学第二

指導責任者 教授 長岡 功

共同研究者 長谷部武, 中村眞二, 杉本耕一

要 旨

我々はこれまでに活性酸素生成酵素であるNADPHオキシダーゼが好中球成熟過程の骨髓球の段階で発現し、活性酸素生成能を獲得することを明らかにしている。しかし、好中球と同様、顆粒球の仲間であり、活性酸素生成能を持つ好酸球の成熟過程におけるNADPHオキシダーゼ構成成分(gp91phox, p22phox, p67phox, p47phox, p40phox, rac-2)の発現時期については全く調べられていない。そこで、今回我々は、ヒト前骨髓性白血病細胞HL-60 clone15をモデル系として用いて、好酸球系細胞への成熟過程におけるNADPHオキシダーゼ構成成分の発現を調べた。[方法と結果] HL-60 clone15細胞を0.5 mM butyrate存在下で培養して、好酸球へ成熟させたところ、major basic protein (MBP)が発現されることがわかった。そして、活性酸素生成能をニトロブルーテトラゾリウムで測定した結果、好酸球の成熟過程において、骨髓球の段階から活性酸素生成能が獲得されることがわかった。また、NADPHオキシダーゼ構成成分の発現をNorthern blot およびWestern blot法で解析したところ、gp91phox, p22phox, p67phox, p47phox, p40phox, rac-2の発現量が成熟に伴って増加することがわかった。さらに、これらのオキシダーゼ構成成分の発現を免疫組織染色で解析したところ、各構成成分が骨髓球以降の細胞で強く発現することがわかった。[結論] 好酸球成熟過程の骨髓球の段階でNADPHオキシダーゼ構成成分の発現量が増加し、活性酸素生成能が獲得されることがわかった。

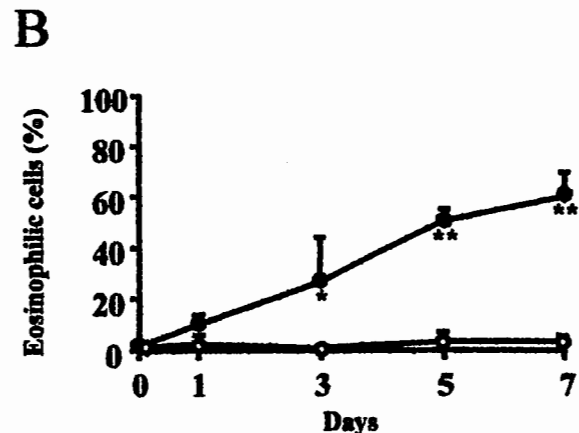
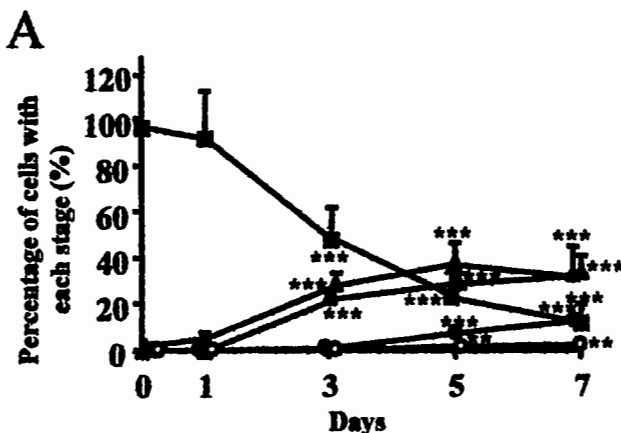
Key words: NADPHオキシダーゼ、活性酸素、好酸球、HL-60 clone 15株

緒 言

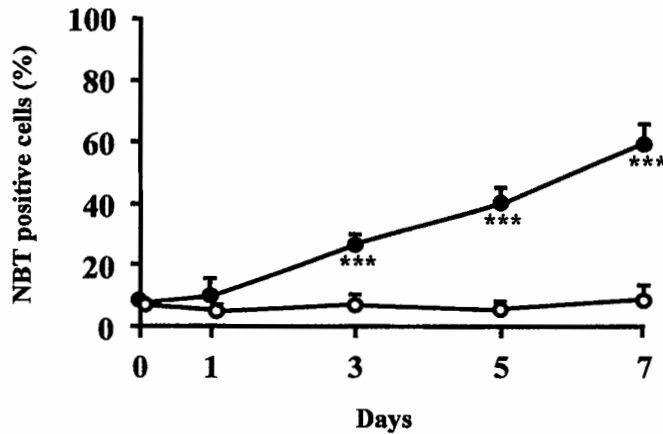
顆粒球の活性酸素は、NADPHオキシダーゼにより産生され、微生物や寄生虫に対する感性防御に重要な役割を担っている。NADPHオキシダーゼは膜タンパクシトクロムb558と細胞質因子から構成されている。そして、膜タンパクシトクロムb588はgp91phox, p22phoxから、細胞質因子はp47phox, p67phox, p40phoxおよびrac-1/2からなっており、顆粒球細胞が活性化されると、これらが会合して複合体が形成される。われわれはこれまでにNADPHオキシダーゼが好中球成熟過程の骨髓球の段階で発現し、活性酸素生成能を獲得することを明らかにしている(J. Leukoc. Biol. 68, 216-224, 2000)。しかし、好中球と同様、顆粒球の仲間であり、活性酸素生成能を持つ好酸球の成熟過程におけるオキシダーゼ構成成分の発現時期については全く調べられていない。そこで本研究では、ヒト前骨髓性白血病細胞HL-60 clone 15株をモデル系として用い、好酸球の成熟過程におけるNADPHオキシダーゼ構成成分の発現を調べた。

方法と結果

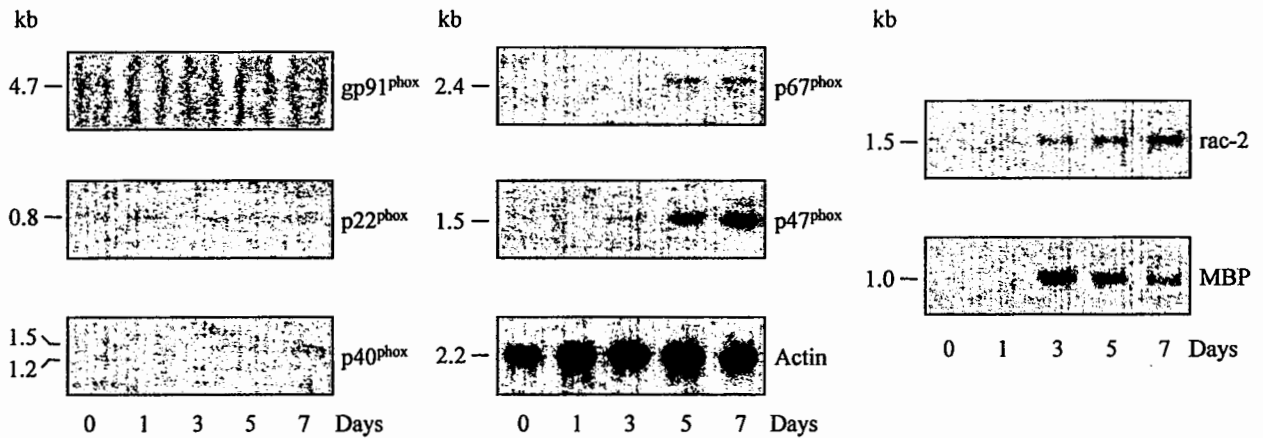
1) Butyrate (0.5 mM)存在下でHL-60 clone 15細胞を0-7日間処理して細胞を好酸球へ分化成熟させた後、May/Grünwald/Giemsa染色を行い、細胞の形態変化を顕微鏡で観察した。その結果、Butyrate処理によって前骨髓細胞は減少し、好酸球系細胞の増加が見られた。7日目の細胞は、前骨髓球(PM)が11.5%、好酸球系骨髓球(E-MC)が31.7%、好酸球系後骨髓球(E-MM)が33.2%、好酸球系桿状細胞(E-Band)が12%、好酸球系分葉細胞(E-Seg)が1.6%となった(A)。さらに、Discombe染色も合わせて行なった結果、7日目では約60%の細胞が好酸球系細胞に分化成熟していることがわかった(B)。



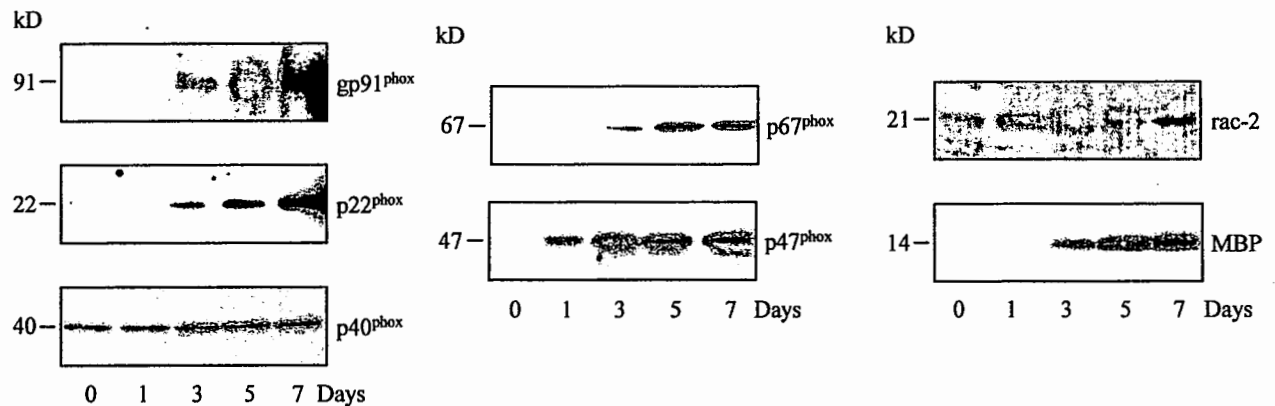
2) Butyrate処理したHL-60 clone 15細胞における活性酸素生成能の変化をNBT還元法で検討した。その結果、未誘導の細胞あるいはButyrate処理後1日の細胞はほとんど活性酸素を生成しなかったが(それぞれ7.3%, 9.5%)、それ以降、活性酸素生成細胞が徐々に増加し、7日目では57.6%になることがわかった。



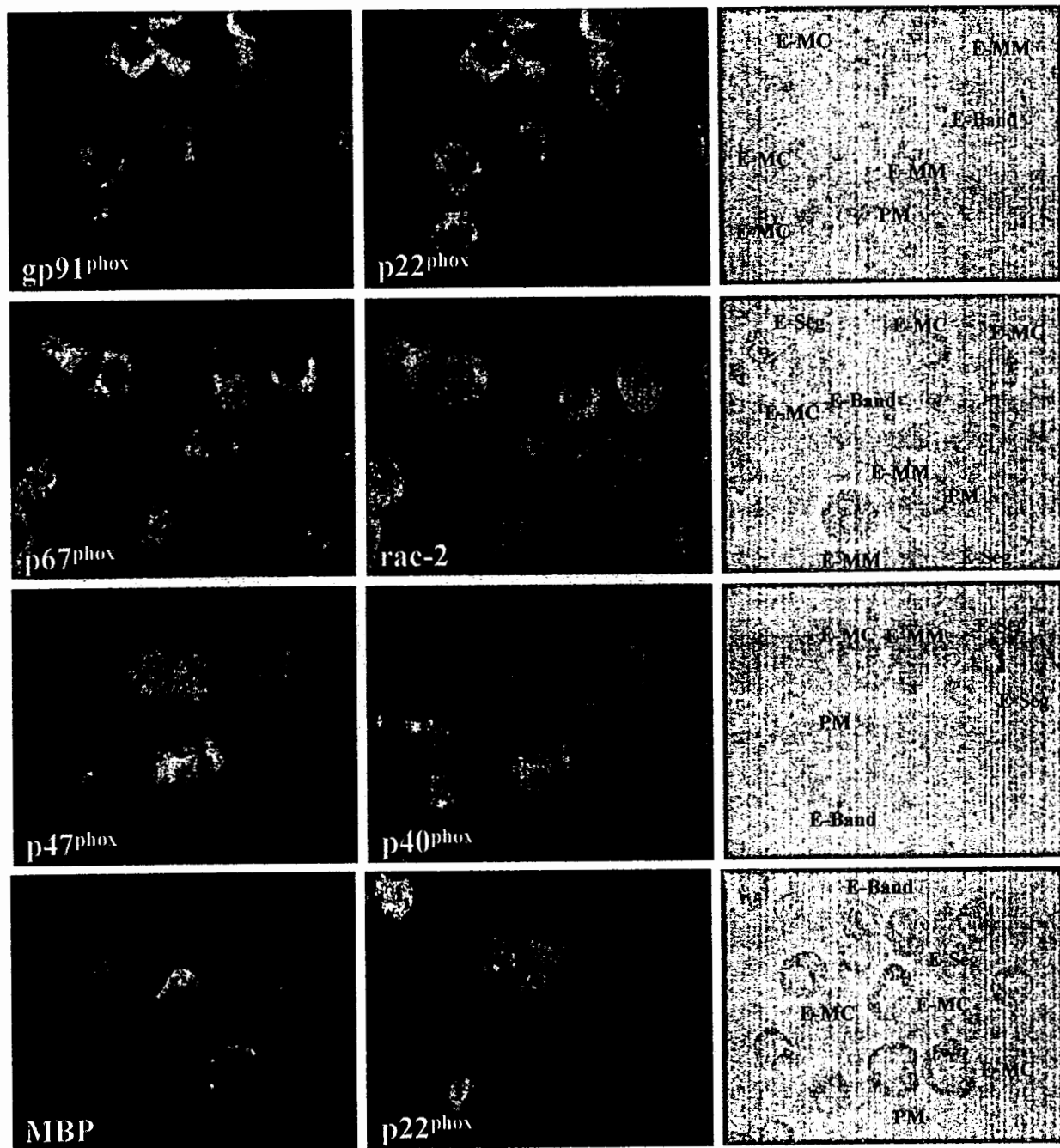
3) HL-60 clone 15細胞の好酸球成熟過程におけるNADPHオキシダーゼのmRNAの発現をNorthern blot法で解析した。その結果、p40phox, p22phox, rac-2は0日で少し発現し、それ以降、それらの発現量が増加することがわかった。一方、gp91phox, p67phox, p47phoxが0日で発現しなかったが、gp91phoxでは1日以降で、p67phox, p47phoxでは3日以降で発現量が増加することがわかった。なお、好酸球の顆粒タンパク質であるMajor Basic Protein (MBP)のmRNAの発現量はButyrate処理によって増加することがみられた。



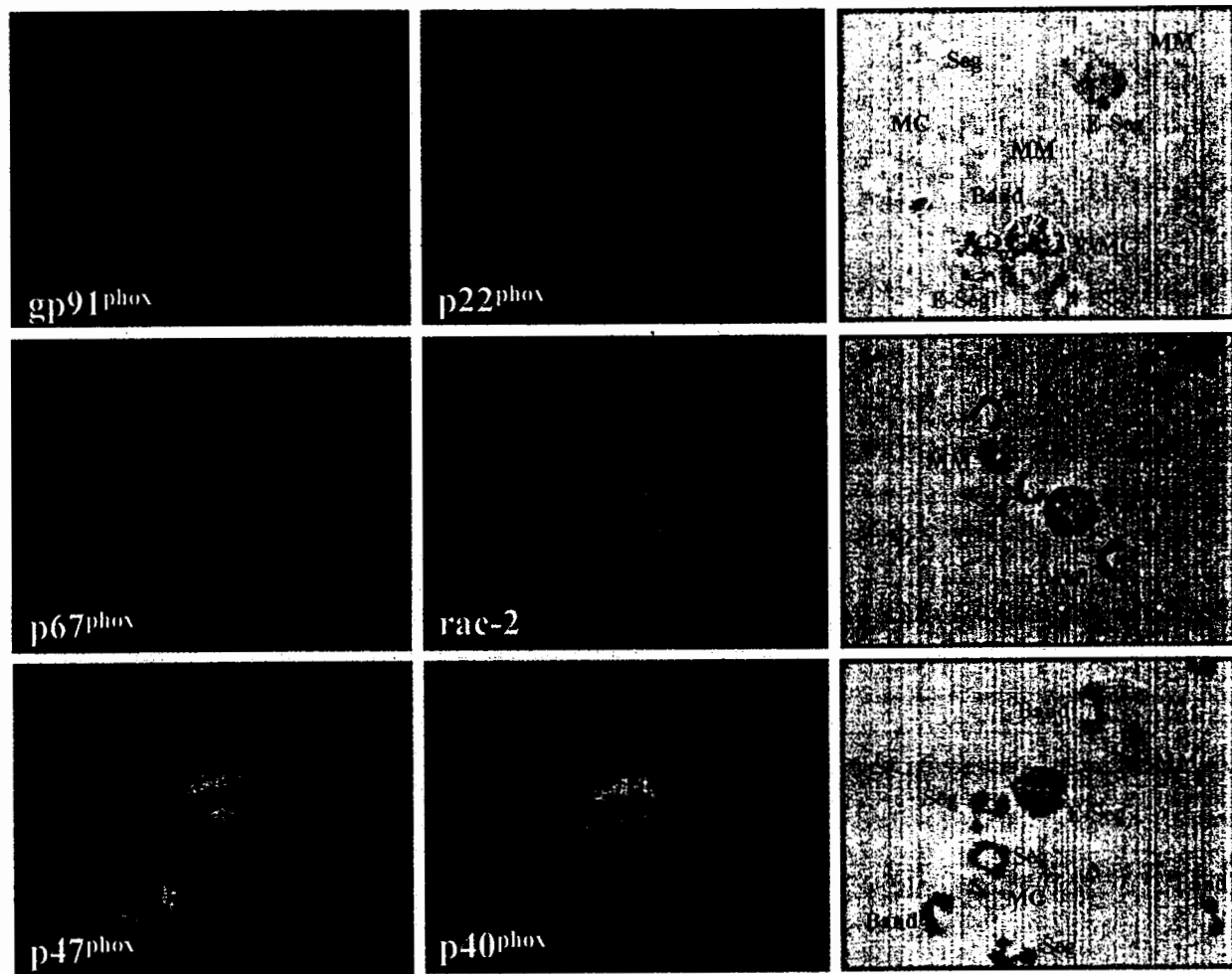
4) HL-60 clone 15細胞の好酸球成熟過程におけるNADPHオキシダーゼのタンパク質の発現をWestern blot法で解析した。その結果、p40phoxおよびrac-2は0日でも少量ながら発現がみられたが、分化成熟に伴って発現量が増加することがわかった。一方、gp91phox, p22phox, p67phox, p47phoxは0日において発現が見られなかったが、3日以降で発現が誘導され、その後さらに発現量が増加することがわかった。なお、MBPの発現量はButyrate処理によって増加することがみられた。



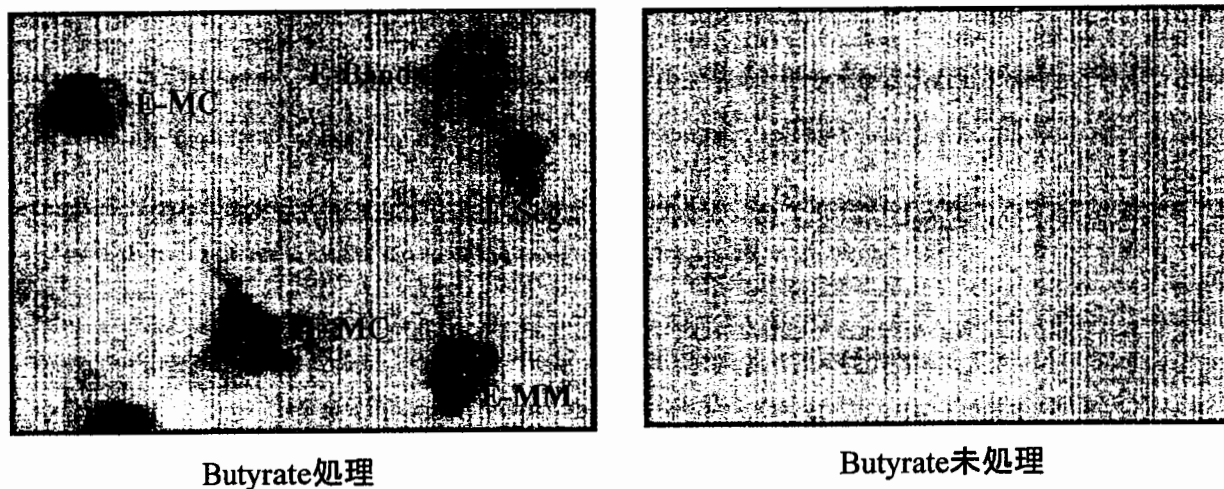
5) Butyrate処理したHL-60 clone 15細胞を免疫組織染色し、NADPHオキシダーゼ構成成分の発現を解析した。その結果、p40phox, rac-2は前骨髄球(PM)で発現していたが、gp91phox, p22phox, p67phox, p47phoxは前骨髄球(PM)で発現していないことがわかった。また、すべての構成成分(gp91phox, p22phox, p67phox, p47phox, p40phox, rac-2)が発現するのは、好酸球系骨髄球(E-MC)と後骨髄球(E-MM)および、好酸球系桿状細胞(E-Band)と分葉細胞(E-Seg)であることがわかった。なお、MBPの発現は好酸球系骨髄球(E-MC)以降で見られた。



6) ヒト骨髄細胞を用いて免疫組織染色でNADPHオキシダーゼ構成成分の発現を解析した。HL-60 clone 15細胞で得られた結果と同様に、p40phox, rac-2は前骨髄球(PM)で発現していたが、gp91phox, p22phox, p67phox, p47phoxは前骨髄球(PM)で発現していなかった。また、すべての構成成分(gp91phox, p22phox, p67phox, p47phox, p40phox, rac-2)が発現するのは、好酸球系骨髄球(E-MC)と後骨髄球(E-MM)および、好酸球系桿状細胞(E-Band)と分葉細胞(E-Seg)であることがわかった。なお、免疫組織染色で染色された細胞はHansel染色で好酸球系細胞であることが確認された。



7) Butyrate処理したHL-60 clone 15細胞を用いてNBT還元法で染色し、顕微鏡で観察した。活性酸素生成能は好酸球の成熟過程の骨髄球(E-MC)と後骨髄球(E-MM)および、好酸球系桿状細胞(E-Band)と分葉細胞(E-Seg)で現れることがわかった。



考 察

われわれはこれまでにNADPHオキシダーゼが好中球成熟過程の骨髓球の段階で発現し、活性酸素生成能を獲得することを明らかにしている (J. Leukoc. Biol. 68, 216-224, 2000)。

今回われわれは、好中球と同様、顆粒球の間であり、活性酸素生成能を持つ好酸球の成熟過程におけるNADPHオキシダーゼ構成成分(gp91phox, p22phox, p67phox, p47phox, p40phox, rac-2)の発現時期を調べるために、ヒト前骨髓性白血病細胞HL-60 clone15をモデル系として用いて、好酸球系細胞への成熟過程におけるNADPHオキシダーゼ構成成分の発現や活性酸素生成を検討した。

まず、Northern blot, Western blotおよび免疫組織染色の結果によって、gp91-phoxとp22phoxが好酸球成熟過程の骨髓球の段階で観察され、その後、その発現量は分化成熟に従って増加することがわかった。また、gp91-phoxとp22phox両方ともに細胞膜に局在し、gp91phoxやp22phoxの欠損患者ではgp91phoxとp22phoxの両方が発現しないことがわかっている。以上のことから、gp91-phoxとp22phoxともに好酸球成熟過程の骨髓球の段階で発現し、その後、その発現量は分化成熟に従って増加することが明らかになった。膜タンパク質gp91phoxとp22phoxのほかに、細胞質因子であるp67phoxとp47phoxも活性酸素生成に重要な役割を果たしている。

細胞系で顆粒球を活性化すると、p47phoxとp67phoxが膜に移行し、膜タンパク質 (gp91phoxとp22phox) と会合してNADPHオキシダーゼが活性化されることが報告されている。われわれのデータから、gp91phoxとp22phoxと同様に、p47phoxとp67phoxも好酸球成熟過程の骨髓球の段階で発現され、その後、その発現量は分化成熟に従って増加することが明らかになった。また、骨髓球の段階では、好酸球が活性酸素生成能を獲得することもわかった。

一方、細胞質因子rac-1とrac-2は低分子GTP-binding タンパク質であり、92%の相同性があることがわかっている。さらに、ヒトでは、rac-2のタンパク質はrac-1より96%以上多いこともわかっている。われわれの研究結果から、rac-2は未分化細胞から発現し、分化成熟にしたがって増加することが見出されたが、rac-1は分化成熟によって減少することがわかった(データは示していない)。したがって、ヒトでは、rac-2は好酸球の分化成熟にしたがってその発現量が増加することによって、活性酸素生成に関与していると考えている。また、同じ細胞因子であるp40phoxは、rac-2と同様に未分化細胞で発現し、分化成熟に従って増加しているから、NADPHオキシダーゼ構成成分に重要な因子になっていると考えられる。

以上のことから、好酸球のNADPHオキシダーゼ構成成分(gp91phox, p22phox, p67phox, p47phox, p40phox, rac-2)は、好中球と同様に、分化成熟過程において骨髓球の段階で発現量が増加し、活性酸素生成能が獲得されることがわかった

参考文献

1. Kita H, Adolphson CR, Gleich GJ. Biology of eosinophils. In: Middleton E Jr, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF Jr, Yunginger JW, Busse WW, editors. Allergy: principles and practice. 5th ed. St Louis: Mosby, 1998: 242-60.
2. Gleich GJ. J Allergy Clin Immunol 2000; 105: 651-63.
3. Segal AW, Garcia R, Goldstone AH, Cross AR, Jones OTG. Biochem J 1981; 196: 363-7.
4. Yazdanbakhsh M, Eckmann CM, Roos D. J Immunol 1985; 135: 1378-84.
5. Yamashita T, Someya A, Hara E. Arch Biochem Biophys 1985; 241: 447-52.
6. Bolscher BGM, Koenderman L, Tool ATJ, Stokman PM, Roos D. FEBS Lett 1990; 268: 269-73.
7. Someya A, Nishijima K, Nunoi H, Irie S, Nagaoka I. Arch Biochem Biophys 1997; 345: 207-13.
8. Deleo FR, Quinn MT. J Leukoc Biol 1996; 60: 677-91.
9. Babior BM. Blood 1999; 93: 1464-76.
10. Thrasher AJ, Keep NH, Wientjes F, Segal AW. 1994; 1227: 1-24.
11. Roos D, de Boer M, Kuribayashi F, Meischl C, Weening RS, Segal AW, et al. Blood 1996; 87: 1663-81.
12. Hua J, Hasebe T, Someya A, Nakamura S, Sugimoto K, Nagaoka I. J Leukoc Biol 2000; 68: 216-24.
13. Miyamoto D, Someya A, Nunoi H, Nagaoka I, Yamashita T. Biochim Biophys Acta 1994; 1224: 11-6.
14. Imajoh-Ohmi S, Tokita K, Ochiai H, Nakamura M, Kanegasaki S. J Biol Chem 1992; 267: 180-4.
15. Nakamura M, Murakami M, Koga T, Tanaka Y, Minakami S. Blood 1987; 69:1404-8.
16. Tsunawaki S, Kagara S, Yoshikawa K, Yoshida LS, Kuratsuji T, Namiki H. J Exp Med 1996; 184: 893-902.
17. Popken-Harris P, Checkel J, Loegering D, Madden B, Springett M, Kephart G, et al. Blood 1998; 92: 623-31.
18. Fischkoff SA. Leukemia Res 1988; 12: 679-86.
19. Fischkoff SA, Condon ME. Cancer Res 1985; 45: 2065-9.
20. Discombe G. Lancet 1946; 1: 195-6.
21. Bainton DF. Developmental biology of neutrophils and eosinophils. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, editors. Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. 2nd ed. New York: Raven Press, 1992: 303-24.
22. Lee NA, McGarry MP, Larson KA, Horton MA, Kristensen AB, Lee JJ. J Immunol 1997; 158: 1332-44.
23. Chomczynski P, Sacchi N. Anal Biochem 1987; 162: 156-9.

24. Royer-Pokora B, Kunkel LM, Monaco AP, Goff SC, Newburger PE, Baehner RL, et al. *Nature* 1986; 322: 32-8.
25. Parkos CA, Dinauer MC, Walker LE, Allen RA, Jesaitis AJ, Orkin SH. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 3319-23.
26. Leto TL, Lomax KJ, Volpp BD, Nunoi H, Sechler JMG, Nauseef WM, et al. *Science* 1990; 248: 727-30.
27. Volpp BD, Nauseef WM, Donelson JE, Moser DR, Clark RA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 7195-9.
28. Hasebe T, Someya A, Nagaoka I. *FEBS Lett* 1999; 455: 257-61.
29. Didsbury J, Weber RF, Bokoch GM, Evans T, Snyderman R. *J Biol Chem* 1989; 264:16378-82.
30. Li M, Sun L, Satoh T, Fisher LM, Spry CJF. *Biochem J* 1995; 305: 921-7.
31. Filley WV, Ackerman SJ, Gleich GJ. *J Immunol Methods* 1981; 47: 227-38.
32. Gruart V, Truong MJ, Plumas J, Zandecki M, Kusnierz J, Prin L, et al. *Blood* 1992; 79: 2592-7.
33. Parkos CA, Dinauer MC, Jesaitis AJ, Orkin SH, Curnutte JT. *Blood* 1989; 73: 1416-20.
34. Heyworth PG, Bohl BP, Bokoch GM, Curnutte JT. *J Biol Chem* 1994; 269: 30749-52.
35. Quinn MT. *J Leukoc Biol* 1995; 58: 263-76.
36. Dorseuil O, Reibel L, Bokoch GM, Camonis J, Gacon G. *J Biol Chem* 1996; 271: 83-8.
37. Roberts AW, Kim C, Zhen L, Lowe JB, Kapur R, Petryniak B, et al. *Immunity* 1999; 10: 183-96.
38. Rinckel LA, Faris SL, Hiitt ND, Kleinberg ME. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 263: 118-22.
39. Rotrosen D, Yeung CL, Leto TL, Malech HL, Kwong CH. *Science* 1992; 256: 1459-62.
40. Abo A, Boyhan A, West I, Thrasher AJ, Segal AW. *J Biol Chem* 1992; 267: 16767-70.
41. Levy R, Rotrosen D, Nagauker O, Leto TL, Malech HL. *J Immunol* 1990; 145: 2595-601.
42. Someya A, Nagaoka I, Yamashita T. *FEBS Lett* 1993; 330: 215-8.
43. Wientjes FB, Hsuan JJ, Totty NF, Segal AW. *Biochem J* 1993; 296: 557-61.
44. Tsunawaki S, Mizunari H, Nagata M, Tatsuzawa O, Kuratsuji T. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199: 1378-87.
45. Someya A, Nagaoka I, Nunoi H, Yamashita T. 1996; 1277: 217-25.
46. Cross AR. *Biochem J* 2000; 349: 113-7.
47. Sathymoorthy M, de Mendez I, Adams AG, Leto TL. *J Biol Chem* 1997; 272: 9141-6.
48. Suzuki S, Kumatori A, Haagen I, Fujii Y, Sadat MA, Jun HL, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6085-90.
49. Ou X, Pollock J, Dinauer MC, Gharehbaghi-Schnell E, Skalnik DG. *DNA Cell Biol* 1999; 18: 253-63.
50. Zhan S, Vazquez N, Zhan S, Wientjes FB, Budarf ML, Schrock E, et al. *Blood* 1996; 88: 2714-21.
51. Yang D, Suzuki S, Hao LJ, Fujii Y, Yamauchi A, Yamamoto M, et al. *J Biol Chem* 2000; 275: 9425-32.

注：本研究は、「Inflammation Research」(2001年, Vol :50、 pages :156-167)に掲載

作成日：2002年3月2日