

[原著]

好中球エラスターゼ刺激によるヒト内臓脂肪細胞の Substance P 遺伝子発現とその意義

坂本 亜里紗 山口 類 山本 隆 敏
青木 学 山鹿 敏 臣 檜原 真 二
北野 正文 三村 孝 俊 菊池 亮
寺本 弘 二 松本 珠 美 亀山 広 喜
廣瀬 英 治 山口 康 雄

Substance P mRNA expression by human visceral adipocytes after stimulation with
neutrophil elastase

熊本保健科学大学保健科学部医学検査学科

Arisa SAKAMOTO, Rui YAMAGUCHI, Takatoshi YAMAMOTO, Manabu AOKI,
Toshitaka YAMAGA, Shinji NARAHARA, Masafumi KITANO, Takatoshi MIMURA,
Makoto KIKUCHI, Koji TERAMOTO, Tamami MATSUMOTO, Hiroki KAMEYAMA,
Eiji HIROSE, and Yasuo YAMAGUCHI

ヒト凍結内臓前駆脂肪細胞より成熟脂肪細胞を分化・誘導した。これらの成熟脂肪細胞には、脂肪細胞特有の adipokine mRNA の発現が確認された。更に、Oil Red O 染色にて中性脂肪の蓄積が認められた。Human neutrophil elastase (HNE) 刺激により成熟脂肪細胞に Substance P (SP) mRNA の発現が認められた。HNE に対する G 蛋白共役型プロテアーゼ受容体 (protease-activated receptor-2; PAR-2) の発現検索の結果、ヒト末梢血単球 (peripheral blood monocytes; PBMCs) 及び成熟脂肪細胞に PAR-2 mRNA の発現が認められ、成熟脂肪細胞では、HNE 刺激による PAR-2 を介した細胞内シグナル伝達系が存在することが示唆された。

また、PBMCs を SP で刺激すると、CC ケモカイン (RANTES), CXC ケモカイン (ENA-78), C ケモカイン (Lymphotactin β), CX3C ケモカイン (Fractalkine) などのケモカイン mRNA の発現が認められた。しかし、MCP-1 及び IL-8 mRNA の発現は認められなかった。以上より、活性化好中球から遊離されるエラスターゼにより成熟脂肪細胞から SP が産生・分泌される。更に、SP 刺激にて末梢血単球から各種ケモカインが誘導されることが示唆された。

キーワード：サブスタンス P、好中球エラスターゼ、ケモカイン、内臓脂肪細胞

I. 緒 言

サブスタンス P (Substance P; SP) は、11個のアミノ酸からなるペプチドである。また、タキキニン的一种で痛覚の伝達物質として知られている。また、嚥下反射や咳反射に関わる非常に重要な神経伝達物質である。慢性炎症では、血中 SP 濃度が上昇

することが報告されている¹⁾。しかし、末梢神経末端よりなぜ大量の SP が分泌されるのか、或いは他に産生臓器があるのか、などについては不明な点が多い。

内臓脂肪組織はサイトカインを含む種々の生理活性物質を産生することが判明しており、脂肪細胞は、もはや中性脂肪を蓄積する臓器ではなく、内分泌臓

器として位置づけられている。侵襲時には単球・マクロファージから大量のサイトカインが分泌され、高サイトカイン血症状態に至ることが報告され、このような高サイトカイン血症を呈する病態を全身性炎症反応症候群 (Systemic inflammatory response syndrome; SIRS) と提唱された²⁾。SIRS では、interleukin-8 (IL-8) などのサイトカインにより好中球が活性化される。その結果、活性化好中球のアズール顆粒から、エラスターゼ、カテプシン G, プロテナーゼ 3 などの蛋白分解酵素 (プロテアーゼ) が遊離する。致死率の高い重症急性膵炎の病態の本態は、膵炎によって惹起された全身性炎症反応症候群が遷延化・重症化し、種々のメディエータの活性化に起因することが報告されている。急性膵炎では、これらの蛋白分解酵素の中で特に、血中の好中球エラスターゼ濃度が上昇し、急性膵炎の重症化に重要な役割を演じていることが報告された³⁾。

本研究では、ヒト凍結内臓脂肪前駆細胞を分化誘導させた成熟脂肪細胞を用いて、好中球エラスターゼ刺激による SP mRNA の発現動態を検索し、産生される SP 刺激により末梢血単球より産生される各種ケモカインの mRNA の発現動態を検討することを目的とする。

II. 方 法

1. ヒト凍結内臓脂肪前駆細胞

単一ドナー由来のヒト凍結内臓脂肪前駆細胞 (DS Pharm Biomedical) から分化・誘導した成熟脂肪細胞を使用した。また、ドナーはすべて米国 FDA 認可のプログラムに従って管理されている。インフォームド・コンセント取得後に、採取された大網脂肪組織より visceral preadipocyte が分離された

(Zen-Bio, Inc, Research Triangle Park, NC)。使用したヒト凍結内臓前駆脂肪細胞のドナー情報を表 1 に示す。また、凍結後の細胞について、生存率、形態観察、分化能を確認済みである。

2. ヒト凍結内臓脂肪前駆細胞の分化・誘導

ヒト凍結内臓脂肪前駆細胞を、培養用培地を用いて融解した。1 × 10⁶ cells/vial を融解し、細胞密度を 4 × 10⁴ cells/cm² に調整した。内臓脂肪前駆細胞から成熟脂肪細胞への分化は、内臓脂肪分化培地及び内臓脂肪細胞培養用培地を用いて行った。分化・誘導された成熟脂肪細胞の adiponectin mRNA の発現及び Oil Red O 染色にて中性脂肪の存在を検索した。

3. 好中球エラスターゼ (HNE) 刺激

凍結乾燥好中球エラスターゼ (SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Germany) を pH5.5 の酢酸 Buffer を用いて 1 μg/ml となるように溶解した。成熟脂肪細胞を HNE 0, 1, 5 μg/ml で刺激し、6 時間培養を行った。その後、SP mRNA の発現を検索した。

4. ヒト末梢血単球の分離

健常非喫煙者から採血し、Ficoll-Hypaque 法にて末梢血単球 (PBMCs) を分離し、1 × 10⁶ cell/mL に調整した。

5. 各種遺伝子発現の検索

好中球エラスターゼ刺激による成熟脂肪細胞の SP 及び adiponectin mRNA の発現を検索した。また、末梢血単球及び成熟脂肪細胞における protease-activated receptor (PAR-2) mRNA の発

Lot No.	Age	BMI	Gender	Race	Smoker	Fasting Blood Glucose
OMMO7052A	28	29.6	M	C	N	U
OM04150B	38	40.2	F	C	N	U
OMO82207	50	49.8	F	AA	N	85
MM041508B	34	49.8	M	C	N	U
SLOM-6	38	43.3	F	C	N	U
SLOM-9	40	45.6	F	C/AA	N	U

C; Caucasian, AA; African American, U; unknown

表 1. ドナー情報

分類	Chemokine	受容体発現細胞
CC	MCP-1	単球, T細胞, 好塩基球
	RANTES	好酸球, 好塩基球, 単球, Th1細胞
CXC	ENA-78	好中球
	IL-8	好中球, CD ⁸ + T細胞, NK細胞
C	Lymphotactin β	リンパ球
CX3C	Fractalkine	T細胞, 単球, NK細胞

MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein-1

RANTES: Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted

ENA-78: Epithelial Cell-derived Neutrophil-activating Peptide

表2. ケモカインと受容体発現細胞

現を比較した。SP 刺激によるヒト末梢血単球における各種ケモカイン (CC, CXC, C, CX3C ケモカイン) (表2) の mRNA の発現を検討した。

6. RNA の抽出

培養上清を取り除き, ISOGEN (ニッポンジーン社) 1 ml を加え脂肪細胞を溶解させた。クロロホルムを 0.2 ml 加え, 12,000 g, 15 min, 4 °C にて遠心を行った。遠心後, 水層部分を別のエッペンチューブに移し, イソプロパノール 0.5 ml を加え, 12,000 g, 10 min, 4 °C で遠心を行った。RNA 沈殿以外を取り除き, 70 % エタノール 1 ml を加え混和後, 7,500 g, 5 min, 4 °C にて遠心を行った。70 %

エタノールを取り除き, 乾燥後 pH 8.0 TE Buffer 80 μ l にて溶解した。RNA の OD 比 (260/280) が 1.8 以上になることを確認した。

7. cDNA の作成と RT-PCR 法

TaKaRa PrimeScript RT-PCR Kit を用いて, SP, PAR-2, adiponectin, MCP-1, RANTES, IL-8, Lymphotactin β , Fractalkine の cDNA を作成した。Forward primer 及び Reverse primer の情報は表3に示す。

Primer	Sequence
β -actin	Sence: 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'
	Antisence: 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC-3'
adiponectin	Sence: 5'-AGACTGGGCTCCTGAATTT-3'
	Antisence: 5'-TG TTCAGAATTTAAA ACTGTAAGCAAA-3'
PAR-2	Sence: 5'-AGAAGCCTTATTGGTAAGGTT-3'
	Antisence: 5'-AACATCATGACAGGTGGTGAT-3'
IL-8	Sence: 5'-GCTTTCTGATGGAAGAGAGC-3'
	Antisence: 5'-GGCACAGTGGAACAAGGACT-3'
MCP-1	Sence: 5'-CAA ACTGAAGCTCGCACTC-3'
	Antisence: 5'-CATTTCCACAATAATATTTTAG-3'
Fractalkine	Sence: 5'-AGGAGAATGCTCCGTCTGAA-3'
	Antisence: 5'-AGAAGAGGAGGCCAAGGAAG-3'
RANTES	Sence: 5'-CTACTCGGGAGGCTAAGGCAGGAA-3'
	Antisence: 5'-GAGGGGTTGAGACGGCGGAAGC-3'
Lymphotactin β	Sence: 5'-TCTGCTCTCTCACTGCATAC-3'
	Antisence: 5'-CAGCTGTATTGGTCGATTGC-3'
ENA-78	Sence: 5'-ATCTCCGCTCCTCCACCCAGT-3'
	Antisence: 5'-TTCTTGTCTTCCCTGGGTTTCAGA-3'

表3. Forward primer 及び Reverse primer

Ⅲ. 結 果

ヒト凍結内臓前駆脂肪細胞の分化誘導により得られた成熟脂肪細胞では、RT-PCR法により adiponectin mRNA の発現が認められた (図1)。また、Oil Red O 染色にて中性脂肪の存在が確認された (図2)。末梢血単球及び成熟脂肪細胞には、protease-activated receptor-2 (PAR-2) の発現が確認された (図3)。好中球エラスターゼ刺激により、成熟脂肪細胞には SP mRNA の発現が用量依存性に認められた (図4)。SP 刺激により PBMCs には MCP-1, IL-8 などのケモカイン mRNA の発現が認められなかった。一方、SP 刺激により PBMCs の ENA-78, Lymphotoxin- β mRNA の発現増強が認められた。(図5)。

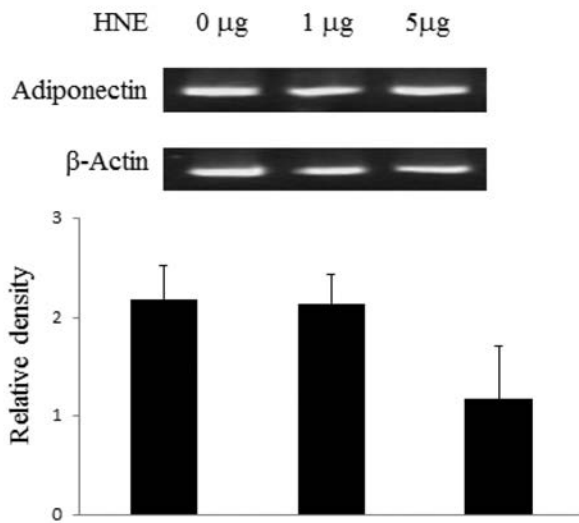


図1. ヒト凍結内臓脂肪前駆細胞の分化・誘導後の adiponectin mRNA の発現

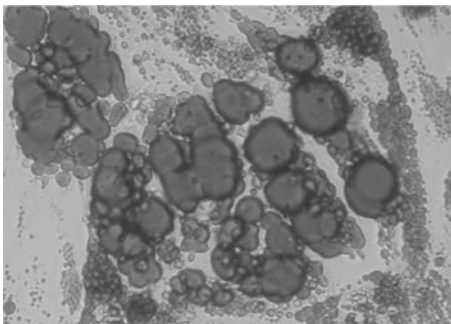


図2. ヒト凍結内臓脂肪前駆細胞の分化・誘導後の Oil Red O 染色

Ⅳ. 考 察

ヒト凍結内臓前駆脂肪細胞より分化・誘導した成熟脂肪細胞を HNE で刺激すると、SP mRNA の発現が認められた。蛋白分解酵素 (プロテアーゼ) である HNE の細胞内シグナル伝達機序として、G 蛋白共役型プロテアーゼ受容体 (protease-activated receptor-2; PAR-2) の細胞外構造の N 末端ペプチド鎖が特定部位で切断され、新しく作り出された N 末端構造が tethered ligand として受容体にシグナルを入力することが報告された⁴⁾。本研究では、ヒト末梢血単球や成熟脂肪細胞における PAR-2 mRNA の発現を検索した結果、その発現が確認され、HNE 刺激により細胞内シグナル伝達が起こる

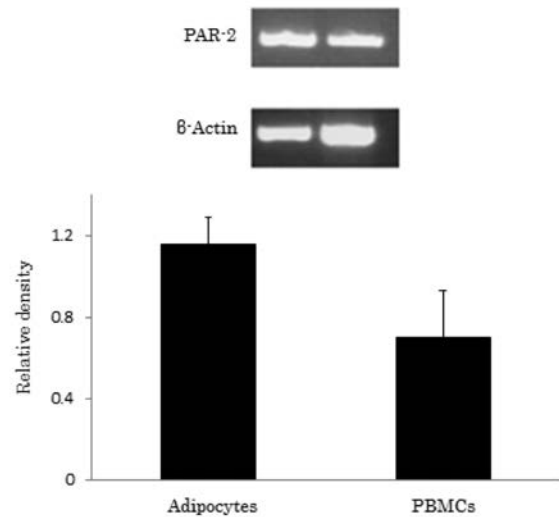


図3. ヒト末梢血単球及び脂肪細胞における PAR-2 mRNA の発現

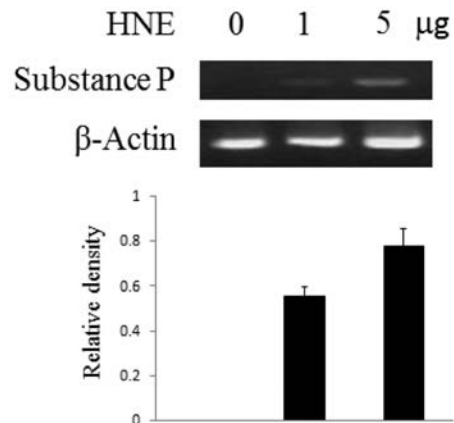


図4. 好中球エラスターゼ刺激による成熟脂肪細胞の Substance P mRNA の発現

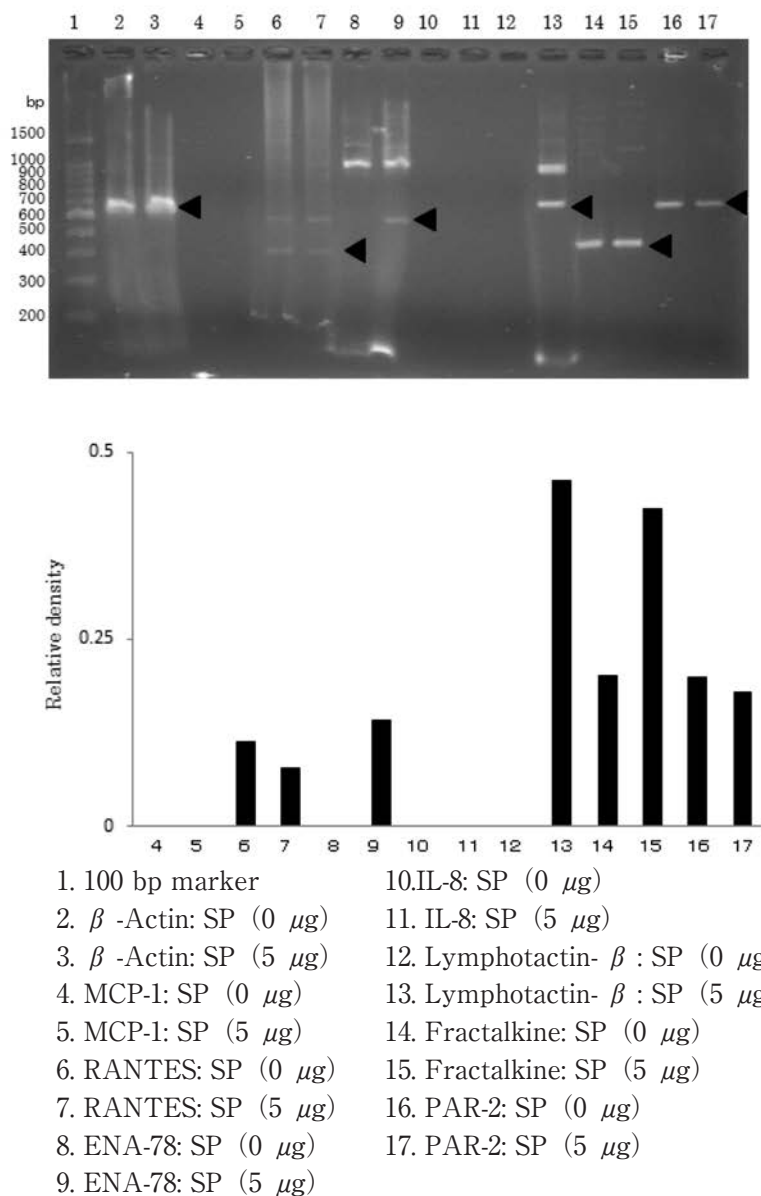


図5. Substance P 刺激によるヒト末梢血単球の各種ケモカイン mRNA の発現

ことが示唆された。急性膵炎では、血中 Substance P (SP) 濃度が上昇することが報告されている。本研究では、成熟脂肪細胞を HNE で刺激すると SP mRNA の発現が認められることより、脂肪細胞は急性膵炎時の SP 産生臓器のひとつである可能性が示唆された。

急性膵炎では、まず膵浮腫が発症することが報告されている⁵⁾。これは、ラットやマウスを用いたセルレイン膵炎モデルでは、感覚神経末梢より遊離された SP が、ニューロキニン受容体を介して血管内皮細胞に作用し、血管外滲出現象を起こすことによって膵浮腫が発症すると考えられている^{5, 6)}。一方、本研究では活性化好中球から遊離されるエラス

ターゼ刺激により、内臓脂肪細胞から神経伝達物質である SP が分泌・遊離されることが判明した。また、SP は膵腺房細胞を刺激し Chemokine を分泌することが報告されている⁷⁾。一方、本研究では末梢血単球を SP で刺激すると、各種 Chemokine mRNA が発現することが判明した。この結果から、Chemokine の分泌による炎症局所への末梢血単球の遊走・浸潤が更に病態を悪化させる要因となることが予測される。

ケモカイン (Chemokine) は、塩基性蛋白質で、細胞上の G 蛋白質共役受容体を介してその作用を発現するサイトカインの一群である。ケモカインは主に、炎症部位で大量に産生され、血管内から炎症

組織内への白血球の遊走をもたらす炎症反応の増悪に深く関与する。システイン残基 (C) に基づく一次構造の変化により, CC, CXC, C, CX3C の4種類に分類される。SP (5 μ g) でヒト末梢血単球を刺激すると, CCケモカインで単球に対して特異的な遊走活性を示す MCP-1 mRNA の発現は認められなかった。また, regulated on activation, normal T cell expressed and secrete (RANTES) は, 単球, CD4陽性 T 細胞及び好酸球の遊走因子である⁸⁾が, RNATES mRNA の発現増強は認められなかった。一方, CXCケモカインで強力な好中球遊走因子の一つである Epithelial neutrophil activating peptide-78(ENA-78)⁹⁾ の発現が軽度増強された。しかし, IL-8 mRNA の発現は全く認められなかった。Cケモカインである Lymphotactin は, 単球や好中球ではなくリンパ球に対する遊走因子として報告された¹⁰⁾。本研究では, SP 刺激により単球に Lymphotactin- β mRNA の発現が増強した。一方, CX3Cケモカインである Fractalkine は, 活性化した血管内皮細胞表面に結合した分子で, T細胞, 単球, NK細胞の強固な接着を誘導する。また, 樹状細胞の成熟に伴って細胞表面上で発現が増強することが報告された¹¹⁾。SP 刺激による単球の Fractalkine mRNA の発現増強は認められなかった。

V. 結 語

好中球エラストラーゼ刺激により内臓脂肪細胞で産生される SP は, 単球を刺激し, ENA-78及び Lymphotactin- β mRNA の発現増強を惹起し, 好中球やリンパ球の浸潤により炎症反応の増悪に深く関与している可能性が示唆された。

文 献

- 1) Mascetta G, di Mola FF, Tavano F, et al. Substance P and neprilysin in chronic pancreatitis. *Eur Surg Res* 48 : 131-138, 2012.
- 2) Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101 : 1644-1655, 1992.
- 3) Ikei S, Ogawa M, Yamaguchi Y. Blood concentrations of polymorphonuclear leucocyte elastase and interleukin-6 are indicators for the occurrence of multiple organ failures at the early stage of acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 13 : 1274-1283, 1998.
- 4) Ramachandran R, Mihara K, Chung H, et al. Neutrophil elastase acts as a biased agonist for proteinase-activated receptor-2 (PAR2). *J Biol Chem* 286 : 24638-24648, 2011.
- 5) Ito Y, Lugea A, Pandolfi SJ, McCuskey RS. Substance P mediates cerulein-induced pancreatic microcirculatory dysfunction in mice. *Pancreas* 34 : 138-143, 2007.
- 6) Grady EF, Yoshimi SK, Maa J, et al. Substance P mediates inflammatory edema in acute pancreatitis via activation of the neurokinin-1 receptor in rats and mice. *Br J Pharmacol* 130 : 505-512, 2000.
- 7) Ramnath RD, Sun J, Adhikari S, et al. Role of PKC-delta on substance P-induced chemokine synthesis in pancreatic acinar cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 294 : C683-692, 2008.
- 8) Alam R, Stafford S, Forsythe P, et al. RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. *J Immunol* 150 : 3442-3448, 1993.
- 9) Koch AE, Kunkel SL, Harlow LA, et al. Epithelial neutrophil activating peptide-78 : a novel chemotactic cytokine for neutrophils in arthritis. *J Clin Invest* 94 : 1012-1018, 1994.
- 10) Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, et al. Lymphotactin : a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 266 : 1395-1399, 1994.
- 11) Papadopoulos EJ, Sasseti C, Saeki H, et al. Fractalkine, a CX3C chemokine, is expressed by dendritic cells and is up-regulated upon dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 29 : 2551-2559, 1999.

(平成27年1月31日受理)

Substance P mRNA expression by human visceral adipocytes after stimulation with neutrophil elastase

Arisa SAKAMOTO, Rui YAMAGUCHI, Takatoshi YAMAMOTO,
Manabu AOKI, Toshitaka YAMAGA, Shinji NARAHARA,
Masafumi KITANO, Takatoshi MIMURA, Makoto KIKUCHI, Koji
TERAMOTO, Tamami MATSUMOTO, Hiroki KAMEYAMA,
Eiji HIROSE, and Yasuo YAMAGUCHI

Obesity is recognized as a low-grade chronic inflammatory state which involves a chemokine network contributing to a variety of diseases. Substance P (SP) is an 11-amino acid peptide that belongs to the tachykinin family of peptides. Tissue and serum levels of SP were increased in chronic pancreatitis. Human neutrophil elastase (HNE) has been implicated in the severity of acute pancreatitis. This study investigated SP mRNA expression by visceral adipocytes after stimulation with HNE. Human visceral preadipocytes are derived from human adipose tissue. These fibroblast-like precursor cells are cryopreserved at the end of primary culture and can be propagated two passages prior to differentiating into human adipocytes. HNE upregulated SP mRNA in visceral adipocytes. Obesity is recognized as a low-grade chronic inflammatory state which involves a chemokine network contributing to a variety of diseases. Chemokines have been classified into four main subfamilies including CXC, CC, CX3C and XC. Although human peripheral blood monocytes (PBMCs) showed Lymphotactin- β (XCL2) mRNA expression after stimulation with SP, neither MCP-1 (CCL2) nor IL-8 (CXCL8) mRNA was detected. Differential expression of chemokine genes by PBMCs after stimulation with SP strongly suggests an involvement of distinct chemokines in the initiation and perpetuation of obesity-related diseases.