

[原著]

Myeloperoxidase 刺激によるマクロファージの interferon- γ 産生機序 : GAPDH の役割

坂本 亜里紗¹⁾ 山口 類²⁾ 山本 隆 敏¹⁾
榎原 真 二¹⁾ 杉内 博 幸¹⁾ 山口 康 雄²⁾

Mechanism of interferon-gamma production by GM-CSF dependent macrophages stimulated with myeloperoxidase: Role of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

Arisa SAKAMOTO, Rui YAMAGUCHI, Takatoshi YAMAMOTO, Shinji NARAHARA,
Hiroyuki SUGIUCHI, Yasuo YAMAGUCHI

- 1) 熊本保健科学大学保健科学部医学検査学科
- 2) 大学院研究科

Interferon γ (IFN- γ) は動脈硬化の病変には interferon- γ (IFN- γ) が強発現し、動脈硬化に重要な役割を演じている。Myeloperoxidase (MPO) は好中球に多量に含まれており、粥腫の脆弱性の指標であり、また、炎症と心血管病変を橋渡しをする重要な因子である。顆粒球・マクロファージ刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: GM-CSF) は動脈硬化の病因ともなる。本研究では、動脈硬化における好中球の活性との関連性を検討した。好中球から遊離される MPO は、マクロファージのマンノース受容体 (CD206) を介して細胞内へ取り込まれる。GM-CSF で単球から分化したマクロファージを MPO で刺激すると、IFN- γ の産生が増強した。しかし、CD206 siRNA 及び ERK2 siRNA を移入したマクロファージでは、MPO 刺激による IFN- γ の産生が有意に抑制された。また、GAPDH siRNA を移入したマクロファージでは MPO 刺激による IFN- γ の産生が有意に抑制された。GAPDH は遺伝子の AU-rich element に結合し mRNA の安定化作用を有しており、MPO 刺激による IFN- γ の産生維持に GAPDH の mRNA 安定化が寄与していることが示唆された。

キーワード : ミエロパーオキシダーゼ, インターフェロン- γ , GAPDH

I. 緒言

動脈硬化の発症・進展には好中球機能が深く関与している¹⁾。感染により活性化された好中球が自らの DNA や granule proteins を含む網目状の構造物を能動的に放出する現象が、neutrophil extracellular traps (NETs) として報告された²⁾。また、好中球はマクロファージを活性化し、炎症を増強し動脈硬化を増悪させる。NETs により活性化されたマクロファージは各種のサイトカインを産生し動脈硬化が進展する³⁾。また、産生されるサイトカインの中でも、interferon- γ が動脈硬化の主要因

の一つであると考えられている⁴⁾。NETs では elastase, proteinase-3, cathepsin G, myeloperoxidase などの大量の granule proteins が放出される。これらのタンパク分解酵素 (プロテアーゼ) の中でも、elastase は、核内へ浸透し、ヒストンの分解や chromatin decondensation を引き起こし NETs の誘発に重要な役割を演じている。また、myeloperoxidase はその相乗効果をもたらす⁵⁾。

また、myeloperoxidase と心臓血管病との密接な関連が報告された⁶⁾。動脈硬化は動脈壁へのマクロファージの遊走・浸潤に始まる進行性の病変であり⁷⁾、産生される Interferon (IFN)- γ は活性酸素の産生

を誘導し⁸⁾、活性酸素による動脈硬化を促進する⁹⁾。顆粒球・マクロファージ刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: GM-CSF) は動脈壁に過剰発現しており、動脈硬化の要因の一つであると考えられている¹⁰⁾。本研究では、GM-CSF 刺激により単球から分化したマクロファージにおける IFN- γ 産生機序について検討した。

II. 方法

1. ヒト末梢血単球の分離

健康成人ボランティアよりヘパリン加静脈血を採取した (熊本保健科学大学倫理審査: 2015-03)。Ficoll を用いた密度勾配遠心分離法で単核球分画を採取した¹¹⁾。

2. 末梢血単球の分化

Recombinant GM-CSF は Tocris Bioscience (Bristol, UK) より購入した。得られた末梢血単球分画に RPMI1640 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) を加えて、1500rpm で5分間遠心し上清を除去して RPMI1640 2mL を加えて、0.5% トリパンブルー溶液で染色し細胞数を計測した。単球分離後は RPMI1640 + 10% FCS を加えて、1時間培養した。培地を除去し、RPMI1640 + 10% FCS (Thermo Fischer Scientific) で2回洗浄を行った。RPMI1640 + 10% FCS + GM-CSF (10 ng/mL) を加えて培養した。3日目に培養液を除去し、新たな RPMI1640 + 10% FCS + GM-CSF (10 ng/mL) を添加した¹²⁾。培養9日目のマクロファージを GM-CSF-dependent macrophages (day 9) として実験に用いた。

3. Western blotting

細胞破砕液を e-PAGEL (5-20%) (ATTO corporation, Tokyo) を用いて、SDS-PAGE 電気泳動を行った。電気泳動条件 30 mA, 55 min とした。iBlot[®] 2 Dry Blotting System (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) を用いて Nitrocellulose membrane へ転写した。転写後、PBS (R & D systems, Minneapolis, MN) + 10% skim milk (Wako, Osaka) を用いて1時間振とうしてブロッキングを実施した。ブロッキング後、PBS + 10% skim milk を除いた後に、PBS (R & D systems,

Minneapolis, MN) + TweenR 20 (Promega, Madison, WI) で10分間振とうした。PBS (R & D systems, Minneapolis, MN) + TweenR 20を除去し洗浄を行った。この洗浄を三回繰り返した。洗浄後は1次抗体 mouse anti-human CD206 IgG (Santa Cruz Biotechnology) を PBS + 3% skim milk に希釈し、Nitrocellulose membrane と共に1時間振とうした。振とう後、上記と同様に洗浄した。洗浄後、2次抗体 guinea pig anti-mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology) を PBS + 3% skim milk で希釈し、Nitrocellulose membrane と共に1時間振とうした。振とう後は洗浄を行ったのちに蛍光発色試薬を用いて発色を確認した¹³⁾。

4. small interfering RNA (si RNA) の移入

GAPDH siRNA, ERK-1 siRNA 及び CD206 siRNA を Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX) より購入した。GM-CSF-dependent macrophages 培養7日目に、Lipofectamine ($2.0 \times 10^3 \mu\text{L/L}$) を用いて GAPDH siRNA (50 nM), ERK-1 siRNA (50 nM) 及び CD206 siRNA (50 nM) を細胞に移入した。同時に、Lipofectamine を単独投与し、細胞死がないことを確認した。

III. 結果

GM-CSF 刺激により単球から分化した GM-CSF-dependent macrophages (day 9) では mannose receptor (CD206) の発現が増強した (図1)。Myeloperoxidase (MPO) 刺激により GM-CSF-dependent macrophages (day 9) による IFN- γ が用量依存性に増加した (図2)。GAPDH siRNA, ERK1 siRNA, CD206 siRNA を移入した GM-CSF-dependent macrophages (day 9 day) を MPO で刺激すると、GAPDH siRNA 及び CD206 siRNA を移入したマクロファージでは IFN- γ 産生が有意に抑制された (図3)。次に、GAODH siRNA を移入した GM-CSF-dependent macrophages (day 9 day) を MPO 刺激して、tissue factor (TF) の産生量を検討した。その結果、INF- γ の産生とは異なり、GAPDH siRNA の移入による TF 産生の抑制は認められなかった (図4)。

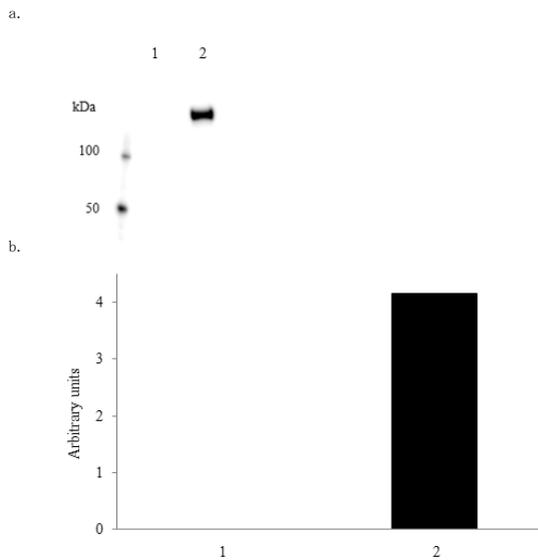


図 1. GM-CSF-dependent macrophages における mannose receptor (CD206) の発現

1. GM-CSF-dependent macrophages (0 day)
 2. GM-CSF-dependent macrophages (9 day)
- (a) Western blotting (b) Arbitrary units

IV. 考察

GM-CSF 刺激で単球より分化したマクロファージでは, mannose receptor (cluster of differentiation 206: CD206) の発現が増強することが判明した。マクロファージの mannose receptor は, 貪食細胞が, 直接病原体の表面を認識する細胞表面レセプターのひとつである。病原菌の表面にはマンノースや β -グルカンが存在し, マクロファージに存在する受容体と結合することができる。しかし, このマクロファージを myeloperoxidase (MPO) で刺激すると, interferon- γ (IFN- γ) の産生が用量依存性に増強した。マウスの実験では, 好中球から遊離された myeloperoxidase (MPO) の約75%は mannose receptor (CD206) に結合し, 胞体内へ取り込まれることが報告されている¹⁴⁾。本研究では, CD206の small interfering RNA を移入したマクロファージを MPO で刺激すると, IFN- γ の産生が有意に抑制された。このことより, MPO は CD206 を介して細胞内へシグナルを伝達していることが推察された。また, 細胞質において解糖系酵素として機能する

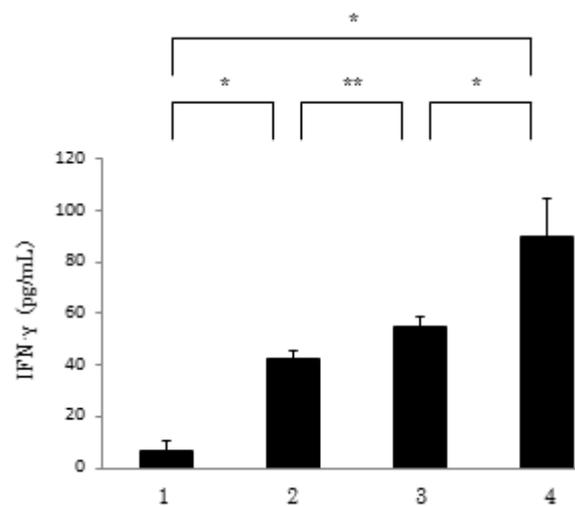


図 2. Myeloperoxidase 刺激によるマクロファージの interferon (IFN)- γ の産生

1. MPO (0×10^3 mU/L)
2. MPO (20×10^3 mU/L)
3. MPO (50×10^3 mU/L)
4. MPO (100×10^3 mU/L)

MPO: myeloperoxidase Data=mean \pm S.E. n=3

*P<0.01 **P<0.05

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) siRNA を移入したマクロファージを MPO で刺激すると, IFN- γ の産生が有意に抑制された。GAPDH は多くの組織や細胞中に共通して一定量発現する遺伝子, つまり, ハウスキーピング遺伝子で, 細胞の維持, 増殖に不可欠な遺伝子である。

AU-rich element (ARE) は, 主に mRNA の 3'-UTR に存在するアデニン (A) とウラシル (U) に富んだ領域である。endonuclease 活性を有する RNA 結合タンパク質 (RNA-binding protein: RBP) がこの領域に結合することで mRNA の分解が開始される。

サイトカインをコードする mRNA には, ARE が高頻度に存在することが知られている。この配列の存在の頻度と mRNA の不安定性とが相関することも報告されている。ARE を高頻度にもつ mRNA はより速く分解されると考えられている¹⁵⁾。一方, ある種の RBP は ARE に結合し, endonuclease のアクセスを阻害することで標的 mRNA の安定性を制御する¹⁶⁾。

GAPDH は, ARE の結合蛋白の一つであること

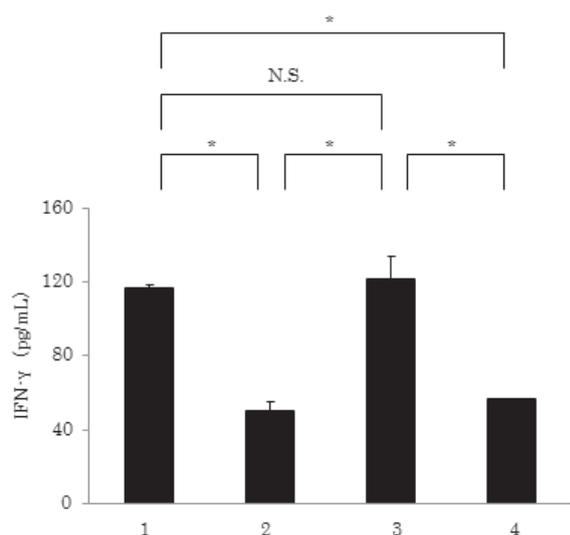


図 3. MPO 刺激による IFN- γ 産生と GAPDH siRNA, ERK-1 siRNA お及び CD206 siRNA の効果

1. Lipofectamine ($2.0 \times 10^3 \mu\text{l/L}$) + MPO ($50 \times 10^3 \text{mU/L}$)
2. Lipofectamine ($2.0 \times 10^3 \mu\text{l/L}$) + GAPDH siRNA (50nM) + MPO ($50 \times 10^3 \text{mU/L}$)
3. Lipofectamine ($2.0 \times 10^3 \mu\text{l/L}$) + ERK-1 siRNA (50nM) + MPO ($50 \times 10^3 \text{mU/L}$)
4. Lipofectamine ($2.0 \times 10^3 \mu\text{l/L}$) + CD206 siRNA (50nM) + MPO ($50 \times 10^3 \text{mU/L}$)

INF- γ : interferon-gamma

MPO: myeloperoxidase

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

ERK: Extracellular Signal-regulated Kinase

CD206: cluster of differentiation 206

Data=mean \pm S.E. n=3 *P<0.01

が報告され¹⁷⁾, GAPDH の多岐にわたる機能 (DNA 修復, RNA 結合活性, tRNA 輸送活性, mRNA 安定化) が明らかとなった。ARE とサイトカインの産生について検証した論文では, IFN- γ 遺伝子の ARE を欠損したノックアウトマウスでは, IFN- γ の慢性的な産生が起こり自己免疫疾患の発症やその進行に深く関与していることが報告されている¹⁸⁾。更に, GAPDH が colony-stimulating factor-1 (CSF-1) の ARE に結合して mRNA の安定化を促進していることが報告された¹⁹⁾。本研究では,

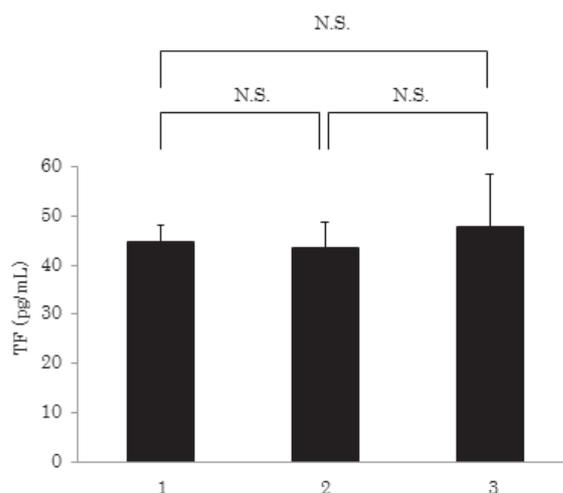


図 4. MPO 刺激による Tissue factor 産生と GAPDH siRNA 及び ERK-1 siRNA の効果

1. Lipofectamine ($2.0 \times 10^3 \mu\text{l/L}$) + MPO ($50 \times 10^3 \text{mU/L}$)
2. Lipofectamine ($2.0 \times 10^3 \mu\text{l/L}$) + GAPDH siRNA (50nM) + MPO ($50 \times 10^3 \text{mU/L}$)
3. Lipofectamine ($2.0 \times 10^3 \mu\text{l/L}$) + ERK-1 siRNA (50nM) + MPO ($50 \times 10^3 \text{mU/L}$)

INF- γ : interferon-gamma

MPO: myeloperoxidase

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

ERK: Extracellular Signal-regulated Kinase

TF: tissue factor

Data=mean \pm S.E. n=3 N.S.: not significant

GAPDH siRNA の移入により, MPO 刺激によるマクロファージの IFN- γ 産生が有意に減少することが判明し, IFN- γ mRNA の安定化に GAPDH が深く関与していることが示唆された。また, 動脈硬化病変部では, GAPDH が強く発現しており²⁰⁾, 動脈硬化部位に浸潤したマクロファージは mRNA の安定化に伴い IFN- γ を大量に産生し, 病変の進行・増悪に寄与していることが考えられた。

V. 結語

GM-CSF により単球から分化したマクロファージを MPO で刺激すると, INF- γ が産生される。しかし, GAPDH siRNA を移入したマクロファージ

では MPO 刺激による IFN- γ の産生は有意に抑制された。従って、GAPDH が IFN- γ mRNA の ARE に結合してその安定化の役割を演じていることが推察された。

謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導頂いた山口類先生 (Western blotting), 山本隆敏先生 (MPO 刺激), 榎原真二先生 (siRNA 導入), 杉内博幸先生 (統計処理), 山口康雄先生 (研究統括) に深謝致します。また、本研究は熊本保健科学大学研究費27-A-01により実施された。

本研究における利益相反は存在しない。

文献

- 1) Nahrendorf M, Swirski FK: Immunology. Neutrophil-macrophage communication in inflammation and atherosclerosis. *Science*, 349: 237-238, 2015.
- 2) Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al: Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303: 1532-1535, 2004.
- 2) Warnatsch A, Ioannou M, Wang Q, et al: Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science*, 349 : 316-320, 2015.
- 3) McLaren JE, Ramji DP: Interferon gamma: a master regulator of atherosclerosis. *Cytokine growth factor rev*, 20 : 125-135, 2009.
- 4) Soehnlein O, Weber C, Lindbom L: Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function. *Trends Immunol*, 30 : 538-546, 2009.
- 5) Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, et al: Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*, 191 : 677-691, 2010.
- 6) Nicholls SJ, Hazen SL: Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25 : 1102-1111, 2005
- 7) Ye D, Zhao Y, Hildebrand RB et al: The dynamics of macrophage infiltration into the arterial wall during atherosclerotic lesion development in low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Am J Pathol*, 178 : 413-422, 2011.
- 8) Watanabe Y, Suzuki O, Haruyama T, et al: Interferon-gamma induces reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress at the hepatic apoptosis. *J Cell Biochem*, 89 : 244-253, 2003.
- 9) Lim HS, Patel JV, Lip GY: Reactive oxygen species production by circulating monocytes: insights from pathophysiology to clinical hypertension. *J Hum Hypertens*, 20: 307-309, 2006.
- 10) Plenz G, Koenig C, Severs NJ, et al: Smooth muscle cells express granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the undiseased and atherosclerotic human coronary artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17 : 2489-2499, 1997.
- 11) Strieter RM, Remick DG, Lynch JP 3rd et al: Differential regulation of tumor necrosis factor-alpha in human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes: a cellular and molecular analysis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1: 57-63, 1989.
- 12) Aoki M, Yamaguchi R, Yamamoto T et al: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor primes interleukin-13 production by macrophages via protease-activated receptor-2. *Blood Cells Mol Dis*, 54 :353-359, 2015.
- 13) Yamaguchi R, Yamamoto T, Sakamoto A et al: Mechanism of interleukin-13 production by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent macrophages via protease-activated receptor-2. *Blood Cells Mol Dis*, 55: 21-26, 2015.
- 14) Shepherd VL, Hoidal JR: Clearance of neutrophil-derived myeloperoxidase by the macrophage mannose receptor. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2: 335-340, 1990.
- 15) Hao S, Baltimore D: The stability of mRNA influences the temporal order of the induction

- of genes encoding inflammatory molecules. *Nat Immunol*, 10: 281-288, 2009.
- 16) Brennan CM, Steitz JA: HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci*, 58: 266-277, 2001.
- 17) Nagy E, Rigby WF: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase selectively binds AU-rich RNA in the NAD (+) -binding region (Rossmann fold) . *J Biol Chem*, 270:2755-2763, 1995.
- 18) Hodge DL, Berthet C, Coppola V et al: IFN-gamma AU-rich element removal promotes chronic IFN-gamma expression and autoimmunity in mice. *J Autoimmun*, 53: 33-45, 2014.
- 19) Zhou Y, Yi X, Stoffer JB, et al: The multifunctional protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is both regulated and controls colony-stimulating factor-1 messenger RNA stability in ovarian cancer. *Mol Cancer Res*, 6: 1375-1384, 2008.
- 20) Perrotta I, Aquila S, Mazzulla S: Expression profile and subcellular localization of GAPDH in the smooth muscle cells of human atherosclerotic plaque: an immunohistochemical and ultrastructural study with biological therapeutic perspectives. *Microsc Microanal*, 20: 1145-1157, 2014.

(平成28年 2月10日受理)

Mechanism of interferon-gamma production by GM-CSF dependent macrophages stimulated with myeloperoxidase: Role of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

Arisa SAKAMOTO, Rui YAMAGUCHI, Takatoshi YAMAMOTO,
Shinji NARAHARA, Hiroyuki SUGIUCHI, Yasuo YAMAGUCHI

Interferon (IFN)-gamma is highly expressed in atherosclerotic lesions and may have an important role in atherogenesis. Myeloperoxidase (MPO), the most abundant protein in neutrophils, is a marker of plaque vulnerability and a possible bridge between inflammation and cardiovascular disease. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) has also been implicated in the pathogenesis of atherosclerosis. The present study investigated the role of neutrophil activation in atherosclerosis. GM-CSF enhanced macrophage expression of the mannose receptor (CD206), which is involved in MPO uptake. MPO increased IFN-gamma production by GM-CSF-dependent macrophages in a concentration-dependent manner. Pretreatment of macrophages with small interfering RNA (siRNA) for CD206 or extracellular signal-regulated kinase (ERK)-2 attenuated IFN-gamma production, while siRNA for ERK-1 did not. Interestingly, pretreatment with siRNA for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) significantly reduced IFN-gamma production. GAPDH stabilizes IFN-gamma mRNA by binding to the adenylate/uridylate-rich element.