

[原著]

All-Trans Retinoic Acid 誘導 HL-60細胞を用いた Neutrophil Extracellular Traps の実験モデル構築およびその分子機序の解明

河 田 仁^{1, 2}

Molecular Studies on All-Trans Retinoic Acid -Induced HL-60 Myeloid Leukemia Cell
Differentiation for Neutrophil Extracellular Traps
– A Model System for Analysis of Dynamic Nuclear and Chromatin Remodeling –

Jin KAWATA^{1, 2}

- 1 熊本保健科学大学 保健科学部 医学検査学科
2 熊本大学大学院 自然科学研究科 複合新領域科学

1 Department of Medical Technology, Kumamoto Health Science University
2 Department of New Frontier Sciences, Graduate School of Science and Technology,
Kumamoto University

Neutrophil (好中球) は分化の過程で、卵形から分葉化構造へと細いフィラメントで結合した 3–4 つの区画化したヘテロクロマチンを有する分葉核に核構造が変化する。また最近の研究で微生物感染時に形態的变化を誘導し、最終的には Neutrophil Extracellular Traps (NETs) と呼ばれる細胞外に DNA を放出する構造をとることが見出された。しかし、このような核の分葉化と NETs の形成は顕微鏡下で確認することはできるが、ダイナミックな核とクロマチンリモデリングの分子メカニズムについてはほとんど解明されていない。

そこで本研究では、All-Trans Retinoic Acid (ATRA) により細胞核を分葉核させたヒト前骨髄球性白血病細胞株 HL-60細胞 (dHL-60細胞) を用いて実験を行った。その結果、Diamide で処理した dHL-60細胞の一部が NETs に類似した形態をとることを見出した。しかしながら、NETs 形成を阻害することで知られている NAD (P) H オキシダーゼ阻害剤である Dibenzodolium Chloride (DPI) ではわずかしこ阻害できず、また Neutrophil と dHL-60細胞の NAD (P) H オキシダーゼサブユニットの発現量が違ったことから dHL-60細胞と Neutrophil の細胞機能は一部類似するものの、全く同じではないことを示す結果となった。しかしながら、今回のような培養細胞を使用した NETs 誘導の試みはあまり前例が無く、今後の Neutrophil の NETs 形成メカニズムを解明するのに役立つと考えられる。

キーワード : Neutrophil Extracellular Traps (NETs), Neutrophil, HL-60, All-Trans Retinoic Acid (ATRA), Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA), Diamide

I. 緒 言

近年、Neutrophil の新たな機能として Neutrophil Extracellular Traps (NETs) が報告されている¹⁾。これは Neutrophil が Lipopolysaccharide (LPS) などでは活性化されると、Mitogen-Activated Protein

Kinase (MAPK) カスケードを経て Reactive Oxygen Species (ROS) の産生、Peptidylarginine Deiminase 4 (PAD4) によるヒストンのシトルリン化やエラスターゼ等が働くことで細胞外にファイバー状の脱凝縮したクロマチンを放出し、微生物を捕獲、殺菌する機能である^{2) 3)}。

反面、この NETs が自己免疫疾患（関節リウマチや全身性エリテマトーデス）、重篤な血液疾患である深部静脈血栓症や敗血症と関わっていることが報告^{4) 5)}されており、検査法や治療法の確立が急がれている。しかしながら NETs については未だ不明な点が多い。また、現在 NETs の研究を行う際にヒト血液から精製分離した Neutrophil を使用しなければならない事が研究の発展を難しくしている大きな要因であると考えられており、培養細胞を用いた実験系の確立が必要であると考えられる。そこで本研究では Neutrophil の代わりに ATRA 誘導 HL-60 細胞 (dHL-60) に Diamide を用いて NETs を誘導する実験モデル系の確立について解析を行った。

Ⅱ. 方 法

1) 実験材料

Neutrophil と培養細胞を分化誘導させた細胞の 2 種類を使用した。Neutrophil は EDTA-2K 添加ヒト末梢血から比重の異なる 2 種類のフィコール液 1.077 (SIGMA) と 1.119 (ナカライテクス) を用いて密度勾配遠心法にて分離・精製し、また培養細胞は 5 % FBS 加 RPMI1640 (Wako) で培養した HL-60 細胞を $1 \times 10^6/\text{ml}$ あたり ATRA (Wako) の終濃度が $1 \mu\text{M}$ になるように添加した。

2) 顆粒球分化マーカー CD11b の発現解析

分化マーカーの経時変化 (0, 1, 2, 4 日) は Alexa488 標識 anti-ヒト CD11b 抗体 (BD) を使用し、FACSverse (BD) にて解析を行った。

3) 細菌貪食能の解析

$1 \times 10^6/\text{ml}$ に調整した Neutrophil および dHL-60 細胞に対し、enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) 発現 *Escherichia coli* (*E. Coli*) を添加し、その後貪食した細胞数を染色後蛍光顕微鏡 (Leica) で、メイギムザ染色 (武藤化学) したものは正立顕微鏡 (オリンパス CX31) で経時的 (0, 5, 10, 30 分) に解析した。

4) NETs 誘導

12 ウェルプレートの底にカバーガラスを置き、そこに細胞数を $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調整した細胞を播種し、NETs 誘導剤である PMA 50nM (Wako), Diamide 100 nM (Wako), NETs 阻害剤である DPI 100nM (Wako) をコンビネーションで添加後、37℃ の 5 % CO_2 インキュベータで 4 時間静置。その後カバーガラスに接着した細胞を 4 % パラホルムアルデヒド緩衝液 (ナカライテクス) で固定後、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 染色を行い蛍光顕微鏡 (Leica DM5000B) で NETs 誘導細胞を測定した。

5) NAD (P) H オキシダーゼ サブユニットの発現解析

細胞の RNA を ISOGEN (ニッポンジーン) で抽出し、Primescript RT-PCR kit (Takara) で cDNA を作製後、以下のプライマー配列および PCR 条件で NADPH オキシダーゼサブユニットの発現解析を RT-PCR で行った。

6) ROS の発現解析

dHL-60 細胞 ($1 \times 10^6/\text{ml}$) を Diamide で処理 (0, 30, 120, 240 分) 後、CellROX Deep Red Re agent (Invitrogen) を $5 \mu\text{M}$ 添加し、37℃ の 5 % CO_2 イン

遺伝子	Forward Primer	Reverse Promer
RAC1	ATGCAGGCCATCAAGTGTGT	TTACAACAGCAGGCATTTTC
RAC2	ATGCAGGCCATCAAGTGTGT	CTAGAGGAGGCTGTAGGCGC
NOX2	TCCTCCACCAAAACCATCCG	AAAACCGCACCAACCTCTCAC
p22PHOX	CTGCATCTCCTGCTCTCGGT	CTCGATGGGCGTCCACT
p47PHOX	GGACGAGGTGTCCCTGCTC	CTGTGACGTCGTCTTTCCTGATG
p67PHOX	ATGTCCCTGGTGGAGGCCAT	CTAGACTTCTCTCCGAGTGC
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTTC

PCR 条件

94℃ 3 分, (94℃ 30 秒, 58℃ 30 秒, 72℃ 30 秒) を 35 サイクル, 72℃ 3 分

キュベータで30分静置した。その後、細胞を回収し、FACSverse (BD) にて解析を行った。

Ⅲ. 結果および考察

1) 分化誘導 HL-60細胞 (dHL-60) の細胞機能

まず, ATRA による HL-60細胞の分化誘導確認を細胞形態以外に CD11b の発現で確認した。その結果, ATRA 添加後 2 日目には細胞全体の約50%, 3 日目には約90% に CD11b の発現が観察された。4 日目以降は CD11b の発現に変化が無かったため, ATRA 処理4日目の細胞 (以降はこれを dHL-60細胞と称する) を以降の実験に使用した (Fig. 1a)。

次に dHL-60細胞が細胞形態以外に Neutrophil

と同じ機能を有しているかを細菌貪食能で検討した。その結果, HL-60細胞に貪食能は無く, また dHL-60細胞は Neutrophil の半分程度の細菌貪食能を有している事が明らかになった (Fig. 1b, c)。

2) PMA による NETs の誘導

Neutrophil と dHL-60細胞を用いて NETs の誘導を行った。NETs 誘導剤には NETs 研究で最もよく使用されている Protein Kinase C の活性化剤である PMA を使用した。

その結果, Neutrophil は有意に NETs を誘導したが, dHL-60細胞では全く NETs の誘導されなかった (Fig. 2a, b)。

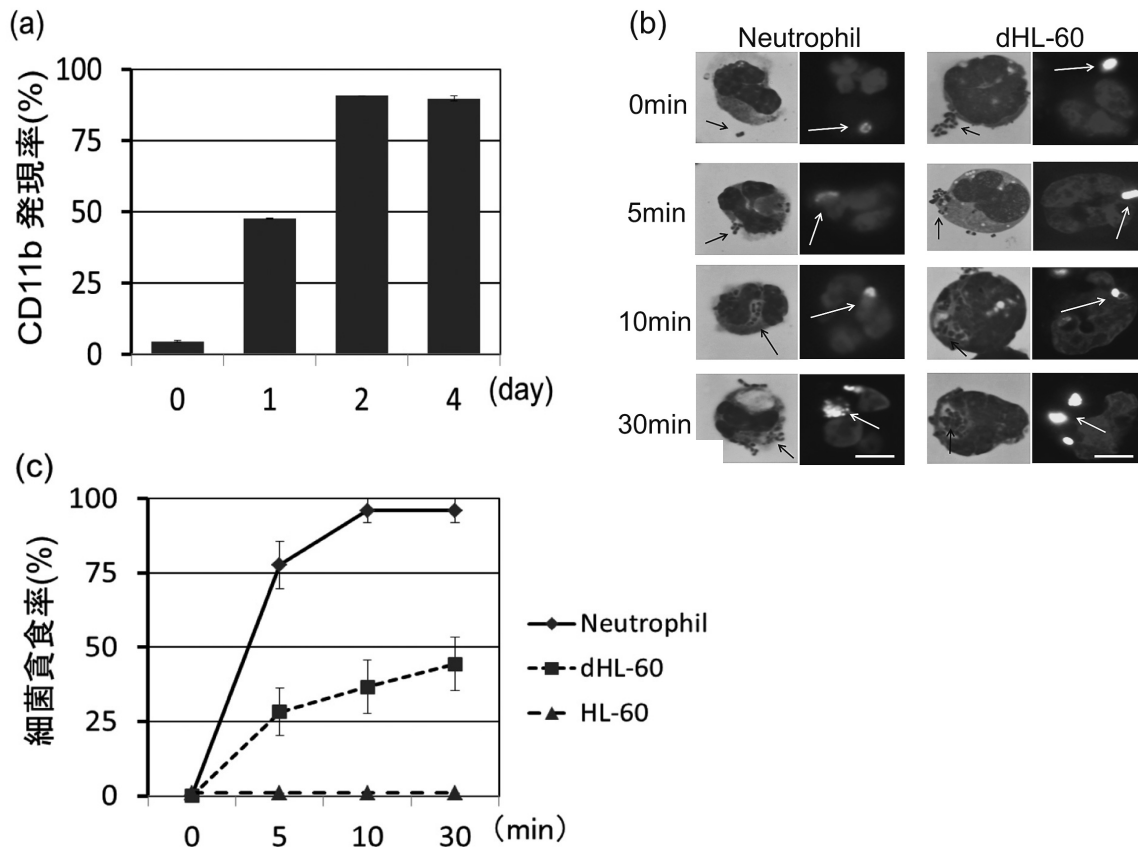


Fig. 1 分化誘導 HL-60細胞 (dHL-60) の CD11b 発現と細菌貪食能

(a) ATRA 処理 HL-60細胞の CD11b 発現細胞の経時変化。

(b) Neutrophil (左側の 2 列) と dHL-60細胞 (右側の 2 列) の細菌貪食能の画像。
各細胞像の左がギムザ染色像, 右が eGFP シグナル像。矢印は eGFP 発現 *E.coli*。
白線は 10 μ m を示している。

(c) Neutrophil, dHL-60細胞, HL-60細胞の細菌貪食率。

また, この解析結果については同様の実験を 3 回繰り返した時の平均 \pm 標準誤差を示している。

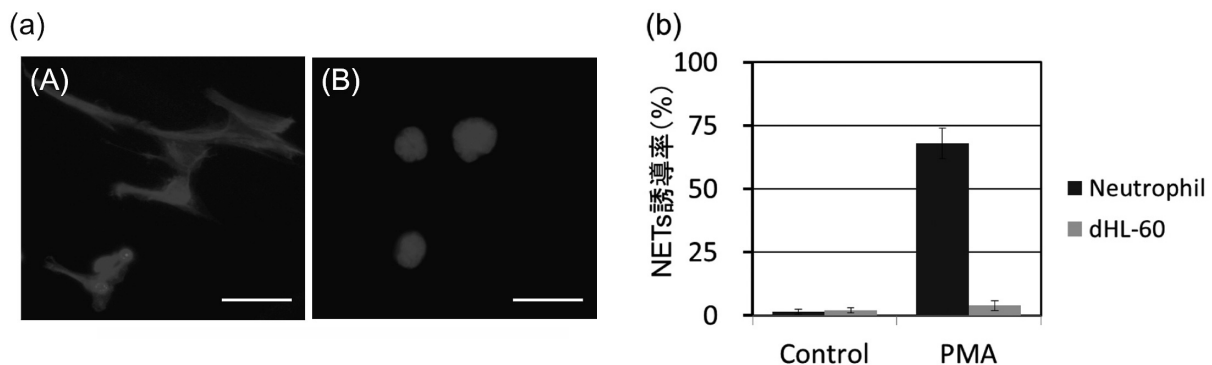


Fig. 2 Neutrophil と dHL-60細胞の NETs 誘導

(a) PMA (50nM) で 4 時間処理し, NETs を誘導したときの DAPI 染色像。(A) Neutrophil, (B) dHL-60細胞。白線は30 μm を示している。

(b) カバーガラス上の接着細胞中の NETs の割合を示している。

また, この解析結果については同様の実験を 3 回繰り返した時の平均 \pm 標準誤差を示している。

3) NAD (P) H オキシダーゼ サブユニットの発現解析

1) の結果より細菌貪食能の違いが明らかになったことから, NAD (P) H オキシダーゼの機能も Neutrophil よりも劣っているのではないかと推測した。NAD (P) H オキシダーゼは細胞内の ROS 産生に深く関わっており, また ROS は Neutrophil において細菌貪食後の殺菌および NETs 誘導のシグナル伝達として非常に重要な因子であることが分かっている。そこで実際に NAD (P) H オキシダーゼのサブユニットの発現解析を RT-PCR で行った

結果, Neutrophil に比べ, dHL-60細胞は NAD (P) H オキシダーゼのサブユニットである Nox2, p47PHOX, p67PHOX の発現が低かった。この結果からこれが PMA で NETs を誘導できなかった原因の1つだと推測された (Fig. 3a, b)。

4) Diamide による NETs の誘導

以上の結果から, dHL-60細胞内の ROS を増加させれば培養細胞でも NETs を誘導できるのではないかと考えた。通常, 細胞のエネルギー代謝時にはその副産物として ROS が産生される。また ROS

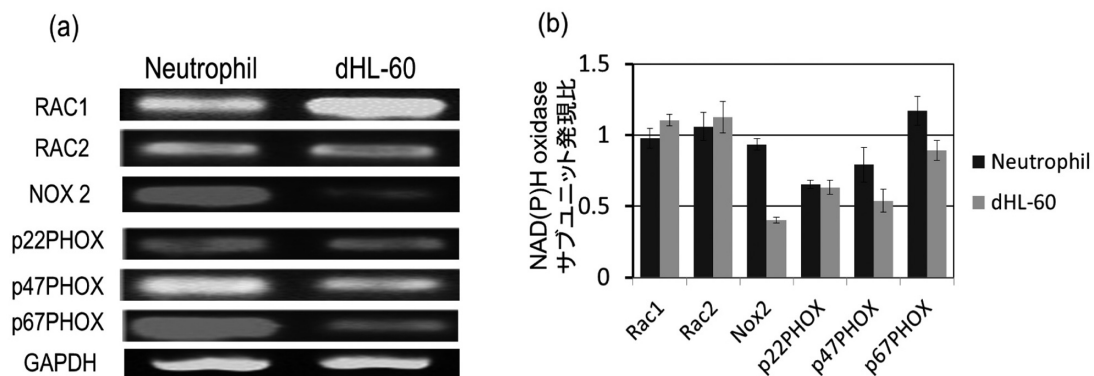


Fig. 3 NAD(P)H オキシダーゼサブユニットの遺伝子発現

(a) NADPH oxidase サブユニットの PCR 電気泳動像。

(b) ハウスキープ遺伝子に GAPDH を用いて補正した結果, Nox2, p22PHOX, p67PHOX の発現について違いが見られた。

また, この解析結果については同様の実験を 3 回繰り返した時の平均 \pm 標準誤差を示している。

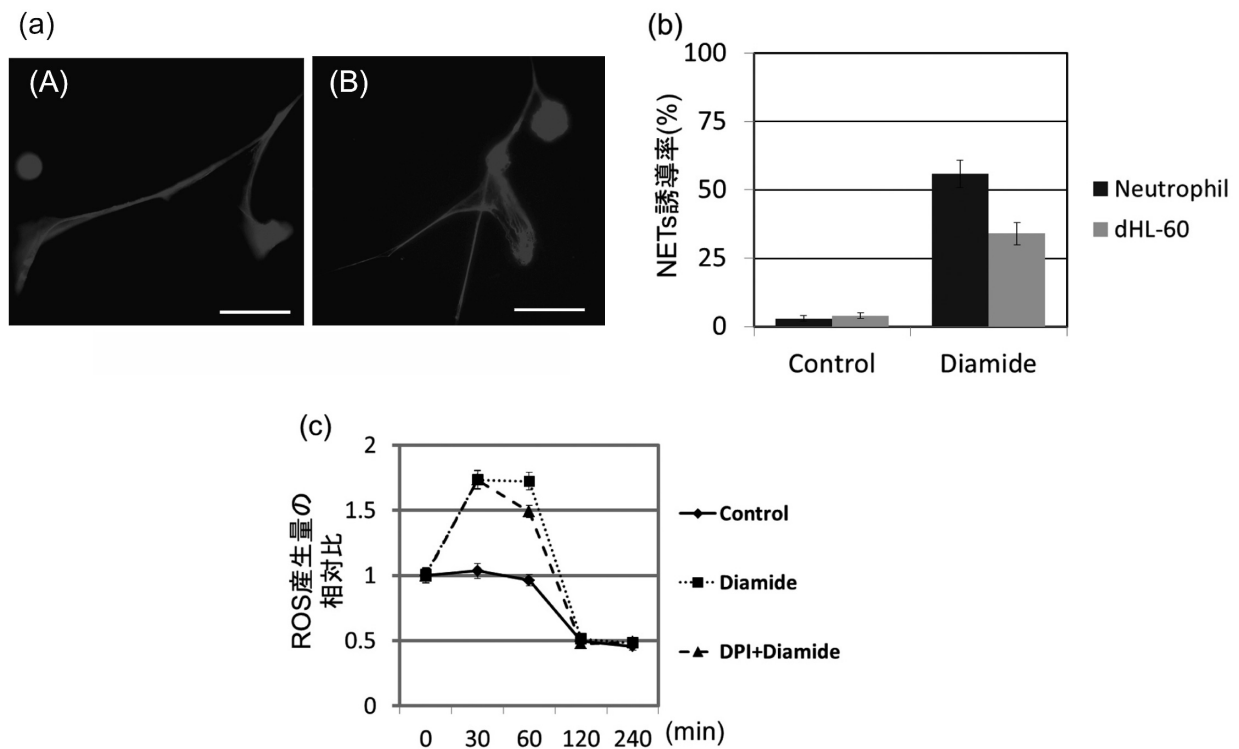


Fig. 4 Diamideを用いた NET 誘導と ROS 産生

- (a) Diamide (100nM) で 4 時間処理し, NETs を誘導したときの DAPI 染色像。(A) Neutrophil, (B) dHL-60細胞。白線は30 μ m を示している。
- (b) カバーガラス上に接着した細胞中の NETs 細胞数の割合を示している。
- (c) Diamide 刺激による dHL-60細胞内の ROS 産生量を Control (0 min) に対する相対比で示している。また、この解析結果については同様の実験を 3 回繰り返した時の平均 \pm 標準誤差を示している。

はグルタチオンと呼ばれる抗酸化物質などが働くことでその抑制や調節が行われている⁶⁾。

そこで、グルタチオンの機能を阻害することで細胞内の ROS を蓄積させることができればシグナルが入り, NETs を誘導できるのではないかと推測し、グルタチオンの阻害剤である Diamide を用いて検討した。その結果、Neutrophil では PMA 添加時の約 80% の NETs を誘導することができ、また dHL-60 細胞についても Neutrophil には劣るものの NETs を誘導することができた (Fig. 4a, b)。さらに Diamide が ROS 蓄積を誘導しているか dHL-60 細胞について解析を行ったところ、Control と比較して Diamide を加えたものは添加直後から細胞内の ROS 産生が増加し、添加後 1 時間で最高値に達しその後は低下していくことが明らかになった。この結果から Diamide 添加直後の急激な細胞内 ROS

の蓄積がこの現象を誘発しているのではないかと考えられた。また、NETs の阻害剤で用いられる NAD (P) H オキシダーゼ阻害剤の DPI ではこの現象をほとんど抑制できていないことから、通常の NETs 誘導シグナルとは異なる経路のシグナルで誘導されていることが推測された。

IV. 結語 (おわりに)

今回の結果より、培養細胞 (dHL-60) を用いても Diamide を用いることで NETs 細胞に類似した細胞形態を誘導することが可能だと判明し、また Diamide は Neutrophil に NETs を誘導する可能性を持った新規の NETs 誘導剤であることを明らかにした。

参考文献

- 1) Papayannopoulos V, Metzler KD et al (2010) Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 1;191 (3) : 677-691
- 2) Remijsen Q, Kuijpers TW et al (2011) Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ.* 18 (4) : 581-588
- 3) Hakkim A, Fuchs TA et al (2010) Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat Chem Biol.* 7 (2) : 75-77
- 4) Garcia-Romo GS, Caielli S et al (2011) Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med.* 3 (73) : 73ra20
- 5) Remijsen Q, Vanden Berghe T et al (2011) Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res.* 21 (2) : 290-304
- 6) Moriguchi T, Seres T et al (1996) Diamide primes neutrophils for enhanced release of superoxide anion: relationship to S-thiolation of cellular proteins. *J Leukoc Biol.* 60 (2) : 191-198

(平成26年 1 月31日受理)

Molecular Studies on ATRA-Induced HL-60 Myeloid Leukemia Cell Differentiation for Neutrophil Extracellular Traps – A Model System for Analysis of Dynamic Nuclear and Chromatin Remodeling –

Jin KAWATA^{1, 2}

¹ Department of Medical Technology, Kumamoto Health Science University

² Department of New Frontier Sciences, Graduate School of Science and Technology,
Kumamoto University

During neutrophil differentiation, the nucleus changes from an ovoid shape to a lobulated structure composed of 3-4 heterochromatic lobes joined by thin filaments. Microbial infection induces further morphological change that ultimately result in extracellular DNA structures called neutrophil extracellular traps (NETs). Although lobulation and NET formation are visible under a microscope, the molecular mechanisms of dynamic nuclear and chromatin remodeling during such processes are poorly understood. Here we show that, when exposed to All-Trans Retinoic Acid (ATRA), human promyelocytic HL-60 cells transform their nuclear structure from an ovoid to a lobulated shape containing heterochromatic dense materials. In addition, we find that the ATRA-differentiated HL-60 (dHL-60) cells are active with respect to phagocytosis of bacteria and that a substantial portion of dHL-60 cells extrude DNA from the cells when treated with Diamide. However, an NAD (P) H oxidase inhibitor DPI which has been demonstrated to inhibit NET formation, has negligible effect on inhibition of NET formation of dHL-60 cells. Given the differences in gene expression of NAD (P) H oxidase subunit mRNAs, these results indicate that dHL-60 cells mimic the characteristics of neutrophils but may not be identical to *in vivo* neutrophil differentiation. Based on our results, this treatment of dHL-60 cells to trigger global DNA structural alterations has not been reported before, and helps to elucidate the mechanisms of human neutrophil.