

ヒト内皮細胞内において炎症反応を誘発する リポポリサッカリド (LPS:リポ多糖) に関するアラザイム (Arazyime) の効果

概要: アラザイムはアラニコ プロテオリチクス (*Aranicola proteolyticus*) によって分泌される新規細胞外メタロプロテアーゼ (metalloprotease) である。内皮細胞は多くの炎症性疾患の発生病因となっており、制御不能な細胞生存性を誘発し、サイトカイン (cytokine)、ケモカイン (chemokine)、細胞接着分子や活性酸素 (ROS) を含む種々の炎症仲介物質を発現する。本研究においては、リポポリサッカリド (LPS) 刺激に続くアラザイムの抗炎症効果を調査するために人の臍帯(さいたい) 静脈内皮細胞 (HUVEC) を使用した。アラザイムは LPS が原因の HUVEC のアポトーシス (細胞自殺メカニズム) を抑制した。LPS によって誘発される種々の炎症反応において、アラザイムは MCP-1 (単球走化性タンパク質:ケモカイン CCL2 の別名)、IL-6 (インターロキン-6: サイトカインの1つ)、VCAM-1 (血管細胞接着分子-1) や ICAM-1 (細胞接着分子-1) の分泌を抑制した。又、アラザイムは HUVEC 中の ROS の発生を抑制した。アラザイムの働きは HUVEC 中の NF- κ B 活動とは関係なかった。これらの結果はアラザイムが炎症を起こした内皮細胞中の抗炎症特性や恐らく内皮細胞に関わる炎症性疾患に対する治療薬として役立つことを示している。

序論: アラザイムはアラニコ プロテオリチクス (*Aranicola proteolyticus*) によって生じる新規細胞外メタロプロテアーゼ (metalloprotease) である (*Serratia proteamaculans* としても知られている。蜘蛛 (女郎蜘蛛: *Nephila clavata*) の腸から分離された Gram 陰性好気性共生菌)。先のレポートは、アラザイムが肝障害を誘発する四塩化炭素に対する肝臓保護活動性を持つこと及び SMP30 や抗酸化タンパク質の発現を増加させるメカニズムを含んでいることを示した。HUVEC (人臍帯静脈内皮細胞) は、血管新生 (angiogenesis)、アテローム性動脈硬化 (atherosclerosis) 及び炎症プロセスを含む様々な疾患の研究で使われている。とりわけ HUVEC は、炎症プロセス時の細胞遊走同様サイトカインやケモカインの放出に関与している。VCAM-1 や ICAM-1 の増加したレベルは炎症性疾患における内皮活性化や身体の器官障害の早期マーカーとなる。内皮細胞表面の細胞接着分子の活性化は白血球遊走を誘発し炎症に至る。炎症反応に伴い HUVEC は、LPS、腫瘍壊死因子 (TNF- α) 及び酸化低密度リポタンパク質 (oxLDL) を含む様々な炎症仲介物質を誘発する。LPS は細菌外膜の必須部分であり、炎症の顕著な刺激物である。LPS は活性酸素 (ROS) の発生を誘発し、HUVEC 内のサイトカイン、ケモカイン及び細胞接着分子を上方発現させる。これらのメカニズムは内皮機能不全に寄与し、疾患に関連する内皮細胞を呼び起こす。炎症反応や内皮細胞死から守る方法を見つけるため多くの研究が試みられてきた。本研究では、HUVEC 中の炎症反応を仲立ちさせる LPS のアラザイムの役割について調査してきた。

資料と方法

Reagent (試料):

Endothelial cell basal medium-2 (EBM-2), fetal bovine serum (FBS), recombinant human fibroblast growth factor (rhFGF), recombinant human epidermal growth factor (rhEGF), hydrocortisone, gentamicin sulfate, amphotericin-B (GA-1000), heparin, vascular endothelial growth factor (VEGF), ascorbic acid 及び long Rinsulin-like growth factor-1 (R³-IGF-1) を Lonza (Walkersville, MD, USA) から購入。Trypsin-EDTA を Life Technologies, Inc (Geithsburg, MD, USA) から購入。LPS を Sigma-Aldrich Korea (Soul, Korea) から購入。2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) と Alexa Fluor 488 chicken anti-mouse IgG を Molecular Probes (Eugene, OR, USA) から購入。Normal rabbit IgG, anti-VCAM-1 と anti-ICAM-1 antibodies は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA USA) から購入。

Enzyme purification (酵素精製):

酵素を以前述べられているように (資料②) 精製した。手短かに述べると、細胞外膜片を培地の遠心分離あるいは 0.2 μ m 濾紙 (Pall Life Science, Port Washington, NY, USA) を使用して濾過によって集めた。50mM potassium phosphate 緩衝剤 (pH7.6) を備えた DEAE-セルロースカラムにクロマトグラフを実施した。流速 400ml/h の 0.1-0.5M 塩化ナトリウム濃度でタンパク結合を溶出し、各断片は 10kD カセット・メンブレンに濃縮させた (Pall Life Sciences)。タンパク質溶液は流速 20ml で事前に 50mM potassium phosphate 緩衝剤 (pH7.8) で平衡にした Sephadex G-75 カラム (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA) に入れた。タンパク質分解活性を含む断片は 10kD カセット・メンブレンに集められ、-20°C で貯蔵した。

Cell culture (細胞培養):

HUVEC は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) から購入。細胞は 2%FBS, rhFGF, rhEGF,

hydrocortisone, GA-1000, heparin, VEGF, ascorbic acid 及び R3-IGF-1 を持った 0.2%のゼラチン塗膜のフラスコで培養した。HUVEC は 5%CO² 培養器中 37°Cで培養した。

MTT assay (MTT 試験) :

細胞の生存性を決定する為に MTT 試験を細胞増殖検出キット(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)で実施した。HUVEC は 5x10³ 細胞/100µl の濃縮で 96-well plate に入れられた。アラザイム処理に続き、プレートは 5% CO² 培養器中 37°Cで 24 時間培養された。次に、10µl の MTT 試薬が各溝(well)に加えられ、プレートを CO² 培養器の中で 4 時間培養した。可用性溶液の 100µl アリコート各溝に加えた。24 時間の培養後、ELISAリーダー(Bio-Tek Instruments Inc, Winooski, VT, USA)を使用し 50nm で吸光度を測定した。

Cell apoptosis (細胞自滅) :

アポトーシスを検出する為に Annexine V FITC アポトーシス検出キット(BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を使用。LPS 及びアラザイムを含む刺激物質で 24 時間処理に続き、HUVEC を Annexin V とラベルされた FITC と PI(核染色液)で 15 分間室温にて培養した。CellQuest ソフトウェア (BD Biosciences 社)を使用しているフローサイメトリーによってアポトーシス細胞を分析し、PI 有りあるいは PI 無しの Annexin V に対して陽性反応した正しい象限中の細胞として定義した。各サンプルに対して総数 1 万事例を集めた。

ELISA (Enzyme-Linked immunosorbent Assay: 酵素免疫測定法) :

HUVEC は 24 時間 LPS と一緒に処理され、上澄みを集めた。MCP-1 及び IL-6 の濃度を製造業者の指導に従ってサンドウィッチ ELISA 法(OptEIA Set human IL-6 and MCP-1; BD Biosciences 社) で細胞の上澄みで測定した。各タンパク質の濃度は標準曲線から計算した。

VCAM-1 と ICAM-1 の発現:

VCAM-1 及び ICAM-1 を含む細胞接着分子の表面での発現を検出 する為に HUVEC は、抗 VCAM-1 や抗 ICAM-1 で 24 時間培養された LPS で処理あるいは 30 分間 IgG 抗体をコントロールし、更に複合化された抗体の anti-mouse IgG FITC で処理する。サンプルは FACSCalibur flow cytometer の CellQuest software (BD Biosciences 社)で分析した。各実験に対し総数 1 万事例を集める。

Nuclear factor (NF)-κB p65 transcription factor assay.

LPS で 4 時間刺激後、HUVEC 中の NF-κB の DNA 結合活動を製造業者の指導の下 NF-κB に対する EZ-DetectTM Transcription Factor キット(Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA) を使って査定した。DNA 結合特異性を野生型あるいは変種の NF-κB oligonucleotides を使って査定した。化学発光検出を Luminometer (Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)を使って実施する。

ROS production(活性酸素の発生) :

24 時間の LPS 刺激後、予熱された PBS 中 1x10⁶ 細胞/ml の濃度で HUVEC を洗浄し再懸濁した。細胞内 ROS に標識を付けるために 5µM DCFDA に晒し、10 分間室温で培養した。標識を付けた細胞はフローサイメトリー(BD Biosciences 社)で即座に観察した。

Statistical analysis (統計分析) :

全てのデータは平均値の平均±標準偏差として表されている。データはスチューデントの t-test 及び SPSS 統計的ソフトウェアパッケージ,Version10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)で分析した。P<0.05 は統計的に顕著な差異を示していると考えられている。

結論

アラザイムは LPS によって誘発された HUVEC のアポトーシスを抑制する。HUVEC に関するアラザイムの効果を検証するに先立ち、細胞の生存性に関しアラザイムの効果を検証した。図(1)に示すように HUVEC の生存率は 1,5,10 or 20µg/ml 濃度でのアラザイム処理によって変わらない。このようにして 20µg/ml アラザイムが抗炎症効果を決めるために使われた。LPS がアポトーシスを誘発することによって内皮損傷を引き起こすので、アポトーシスを誘発する LPS に関しアラザイムの保護効果が決定された。図(2)に示すように、

10 μ g/ml LPS 処理は HUVEC 中のアポトーシスの強い誘発に導いている。アラザイムが HUVEC のアポトーシスを誘発する LPS を顕著にブロックしている。

Figure 1: アラザイムは HUVEC について細胞毒性はない。5x10³ 細胞/Well(溝)で 96-well plate に植え付けられた HUVEC が適切な培養物の中で培養され、24 時間濃度に比例してアラザイムで処理。生存率を MTT 試験で測定。データは未処理細胞の吸光率(100%に設定)に対する相対値として表されている。全てのデータは 3 つの独立した実験の平均の平均 \pm 標準偏差として表されている。HUVEC は human umbilical vein endothelial cells の略。

Figure 2: アラザイムは HUVEC アポトーシスを誘発する LPS を抑制する。HUVEC は 20 μ g/ml アラザイムで 1 時間及び 10 μ g/ml LPS で 24 時間前処理を行う。アポトーシスは Annexin V-fluorescein isothiocyanate の結合と flow cytometry による PI を測定することで分析した。CON(Control)グループは LPS 処理無しの細胞を含み、陰性コントロールを行う。アポトーシス細胞のパーセントは総数における全 Annexin-V 結合細胞のパーセントを表している。データは 3 つの個別の実験(図 A)の平均の平均 \pm 標準偏差として表されており、ドットプロットデータ(図 B)として代表されている。* P<0.05 及び ** P<0.01, 未処理グループ 対 LPS 処理グループ or LPS 処理グループ 対 アラザイム処理グループ。mHUVEC: human umbilical vein endothelial cells の略, LPS: lipopolysaccharide の略, PI: propidium iodide の略, con: control の略。

Arazyme decreases secretion of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and IL-6 in HUVEC

(アラザイムは HUVEC 中の MCP-1 と IL-6 の分泌を減少させる):

HUVEC からのサイトカイン放出に関しアラザイムの抑制効果を決定する為に、アラザイムの有り無しで 10 μ g/ml LPS で処理した HUVEC の上澄みの MCP-1 と IL-6 を ELISA で測定した。アラザイムは LPS で刺激された HUVEC 中の MCP-1 を可成り減らした(図 3 A)。HUVEC を刺激した LPS において IL-6 の放出はアラザイムによって抑制される傾向があったが、差異は顕著ではなかった(図 3 B)。これらの所見はアラザイムが HUVEC を刺激した LPS に関しサイトカイン放出を抑えることで抗炎症効果を持つことを示している。

Figure 3: アラザイムは HUVEC から MCP-1 と IL-6 を誘発した LPS の放出に関し抑制効果を持っている。HUVEC は 20 μ g/ml アラザイムの有り無しで 1 時間前処理した。細胞は 10 μ g/ml LPS で 24 時間処理された。上澄みを集めて ELISA 診断で MCP-1(図 A)と IL-6(図 B)を分析した。全てのデータは 3 つの個別の実験の平均の平均 \pm 標準偏差として表されている。** P<0.01, 未処理グループ 対 LPS 処理グループ or LPS 処理グループ 対 アラザイム処理グループ, LPS: lipopolysaccharide の略, MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1 の略, IL-6: interleukin-6 の略, HUVEC: human umbilical vein endothelial cells の略。

Arazyme inhibits expression of adhesion molecules in HUVEC (アラザイムは HUVEC 中の細胞接着分子の発現を抑制する)。

LPS は HUVEC 中の VCAM-1 及び ICAM-1 を含む細胞結合分子を増やす。アラザイムのその他の抗炎症効果を決定する為に LPS によって誘発された VCAM-1 や ICAM-1 の発現に関する効果を調査した。HUVEC は 10 μ g/ml アラザイムで 1 時間前処理され、その後 10 μ g/ml LPS で 24 時間処理された。LPS は VCAM-1 と ICAM-1 の表面発現を増やし、増加した発現はアラザイムの前処理で抑制された(図 4)。

Figure 4: アラザイムは HUVEC 中の LPS によって誘発される細胞接着分子の発現を抑制する。HUVEC は 20 μ g/ml アラザイムで 1 時間の前処理し、その後 10 μ g/ml LPS で 24 時間処理した。HUVEC 中の VCAM-1 (図 A)と ICAM-1(図 B)のタンパク質の発現を抗 VCAM-1 及び抗 ICAM-1 の抗体を使い flow cytometry で分析した。正常マウスの IgG での培養によってアイソタイプコントロールを分析した。データはアイソタイプコントロール(100%に設定)に比して代表されている。* P<0.05 と ** P<0.01, 未処理グループ 対 LPS 処理グループ or LPS 処理グループ 対 アラザイム処理グループ, HUVEC: human umbilical vein endothelial cells の略, LPS: lipopolysaccharide の略, VCAM-1: vascular cell adhesion molecules-1 の略, ICAM-1: intracellular adhesion molecule-1 の略。

Arazyme is not associated with NF-kB activation induced by LPS in HUVEC (アラザイムは HUVEC 中の LPS によって誘発される NF-kB の活性化には関係しない)。

NF-kB は様々な遺伝子の遺伝子名であり、HUVEC 中のケモカイン、サイトカイン及び細胞接着分子の発現を含む炎症反応に関わっている。LPS は NF-k B を活性化することで炎症タンパク質の発現を増やすので、サイトカインや細胞接着分子の発現に関しアラザイムの抑制効果が NF-k B 活性化を抑制することに関わっているかどうか調査した。図 5 に示すように、アラザイムは HUVEC 中の LPS によって誘発される NF-k B 活性化に関し無効果であった。この結果はアラザイムが HUVEC 中の炎症反応を加減しないことを示している。

Figure 5: アラザイムは HUVEC 中の NF-k B 活性化に関わっていない。HUVEC をアラザイムで 1 時間前処理の後、細胞を 10 μ g/ml LPS で 24 時間処理し、NF-k B 活性化を決定する為に集めた。細胞核断片を抽出し、NF-kB DNA 結合活動を EZ-Detect™ Transcription Factor kit を使って査定した。全てのデータは 3 つの個別の実験の平均の平均 \pm 標準偏差として表されている。** P<0.01, 未処理グループ 対 LPS 処理グループ or LPS 処理グループ 対 アラザイム処理グループ, NF-kB: nuclear factor-kB の略, HUVEC: human umbilical vein endothelial cells の略, LPS: lipopolysaccharide の略。

Arazyme inhibits LPS-induced ROS production in HUVEC (アラザイムはHUVEC中のLPS誘発のROS発生を抑制する)。

ROSの発生は炎症の重要な仲介物質であるため、HUVEC中のROS発生に関するアラザイムの抑制効果を調べた。図6で示すように、LPSはHUVEC中のROS発生の強力な誘導物質として機能した。アラザイムで前処理したHUVECはLPSに因るROS発生を抑制した。この結果はアラザイムが酸化ストレスを抑制することで抗炎症効果を生むことを示している。

検討

アラザイムは肝障害に対する保護効果を持っているが、炎症を含むその他の保護機能や治療機能はまだ報告されていない。以前の研究は *Ecklonia cava* 抽出やシロスタゾールのような内皮細胞中の炎症反応に対する新規抑制物質を見出した。現在の研究は、LPSによって誘発されたHUVEC中の炎症反応に関するアラザイムの効果を明確にすることに焦点を絞っている。サイトカインの放出は重要な炎症反応である。アラザイムはMCP-1やIL-6の分泌を抑制したが違った程度であった。MCP-1はCCL2であり、モノサイトを呼び込む走化因子として働く。以前の研究はMCP-1がneutrophils(好中球)中の自然発生的なアポトーシスを抑制することでneutrophilic inflammation(好中球性炎症)を誘発することを示した。IL-6は多能性サイトカインであり、B細胞や皮膚細胞を含む多くの細胞タイプの増殖分化を増やす。IL-6はアレルギー疾患にも見られる急性から慢性炎症へのシフトを誘発する。アラザイムはまたLPSによって増えたVCAM-1やICAM-1の発現を抑制した。VCAM-1やICAM-1は道筋を示す炎症の細胞接着分子や起始因子として機能する。これらの結果はアラザイムがHUVEC中で抗炎症剤として働くことを示している。ROSは炎症箇所でも発生し、細胞損傷や細胞死を引き起こす。HUVECは高分子の動きや血液から組織への免疫細胞の巡回を調節する。HUVEC中の増加した酸化ストレスは血管内皮透過性を誘発し、白血球粘着性を増強する。アラザイムはLPSに因るROSの発生を抑えるので、アラザイムは組織への炎症細胞移動の抑制物質として働くかもしれない。ROSの過剰発生は細胞毒性によって仲立ちされた細胞死を誘発し、アラザイムの抗アポトーシス効果がHUVEC中に仮定される。ROSと細胞死の直接的関係が無いにも拘らず、実験結果がこの仮説の妥当性を示しているかも知れない。LPSやROSを含む数々の炎症仲介物質がNF-κBを活性化し、細胞接着分子の増加やサイトカインとケモカインの分泌を誘発する。アラザイムのメカニズムを検証するために、NF-κBの活性化を評価した。しかしながら、アラザイムはLPSの刺激によって引き起こされたNF-κBの活性化を抑制しなかった。アラザイムの効果の下でのメカニズムは以前決められなかったが、アラザイムはメタロプロテナーゼなので抗アポトーシスと抗炎症効果に対する仮説のメカニズムが示唆される。アラザイムはプロテナーゼ活性受動体(PAR)、それはGタンパク質結合受動体、を通じてあるいは未確認の受動体を通じて、抗アポトーシスあるいは抗炎症機能を仲立ちするだろう。PARあるいは未知の仲介信号はLPSが誘発した信号を抑制すること関係があるかもしれない。第2にアラザイムは、ブラジキニンやヒスタミンを含む炎症誘発分子を加水分解するのでMCP-1、IL-6や細胞接着分子を含むサイトカインを直接切断するかもしれない。アラザイムの活動の正確なメカニズムは決定されるべく残っており、より複雑なメカニズムを調査するために更なる研究が続けられている。結論として、HUVEC中で細胞死、ROS発生、IL-6、MCP-1、VCAM-1及びICAM-1の抑制を含む抗炎症効果を持っている。アラザイムはアテローム硬化症や心筋梗塞疾患を含む疾患に関連した内皮機能障害を治療するために役立つ薬剤であるかもしれない。

以上