

動脈硬化症進展抑制に向けた抗酸化酵素機能の制御  
に関する研究

牧 野 純 也

2016 年



## 目次

緒論	-1-
第1章 ヒト単球細胞のマクロファージへの分化過程における EC-SOD 発現調節機構	
第1節 緒言	-6-
第2節 実験材料及び方法	-8-
第3節 結果	-13-
第4節 考察	-25-
第2章 ヒト単球系細胞由来マクロファージの oxLDL 曝露による EC-SOD レベルの変動とその調節機構	
第1節 緒言	-29-
第2節 実験材料及び方法	-31-
第3節 結果	-39-
第4節 考察	-51-
第3章 ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞の分化に対するルテオリンの抑制効果	
第1節 緒言	-55-
第2節 実験材料及び方法	-57-
第3節 結果	-60-
第4節 考察	-67-

総括	-71-
----	------

謝辞	-76-
----	------

引用文献	-77-
------	------

略語表	-86-
-----	------

## 緒論

近年、日本において、長寿社会の到来や生活習慣の欧米化により糖尿病、高血圧症、脂質異常症などに代表される生活習慣病罹患患者は増加傾向にあり、国民病と呼ばれている。生活習慣病は動脈硬化症の重要なリスクファクターであり、日本人の死因の上位を占める脳血管疾患、心血管疾患などの重篤な病態に繋がるため、その予防および治療に向けてガイドラインの改訂などの社会的対策が進められている。

動脈硬化症は、動脈の内側に粥状（アテローム性）プラークの形成が認められる慢性炎症性疾患であり[1-3]、その病巣における特徴として、血管内皮細胞傷害、単球のマクロファージへの分化、酸化低密度リポタンパク質（oxidized low-density lipoprotein、oxLDL）などの修飾 LDL の取り込みによるマクロファージの泡沫化[4-6]、血管平滑筋細胞の異常増殖などが認められる[7,8]。これらの病態発症の一連の過程において、多量の活性酸素種（reactive oxygen species、ROS）が産生されることが報告されており[9]、その過剰産生が脂質の過酸化、タンパク質の変性、酵素の失活などを引き起こし、細胞内ホメオスタシスを破綻させることで種々の病態を誘引する[10,11]。また、過剰に産生された ROS を消去する機構の破綻が酸化ストレスに対する抵抗性を減弱させ、それがさらなる病態悪化を招くことが報告されており、生体内のレドックス恒常性を維持することが動脈硬化症を始めとした種々の疾患の発症・進展の抑制に繋がると考えられている。

ROS を消去する機構として、生体内に存在するスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼなどの抗酸化酵素が知られており、その活性発現がレドックス恒常性の維持に重要な働きを担ってい

る[12,13]。その中でも、SOD は全身の組織に発現している抗酸化酵素であり、多くの ROS 産生反応における一次産物であるスーパーオキシドを  $\text{H}_2\text{O}_2$  と  $\text{O}_2$  に効率よく不均化するにより、酸化ストレスから生体を防御していると考えられている。一般的に哺乳類の細胞には、copper and zinc containing-SOD (Cu,Zn-SOD 、 SOD1)、 manganese containing-SOD (Mn-SOD 、 SOD2)、 extracellular-SOD (EC-SOD、 SOD3) の 3 種の SOD アイソザイムの存在が報告されており、それぞれ Table 1 に示すような特徴を有していることが知られている[14-17]。Cu,Zn-SOD、 Mn-SOD はそれぞれ主に細胞内の細胞質、ミトコンドリアに存在しているのに対し、EC-SOD は SOD アイソザイムの中で唯一細胞外に局在する分泌型糖タンパク質として同定されている。

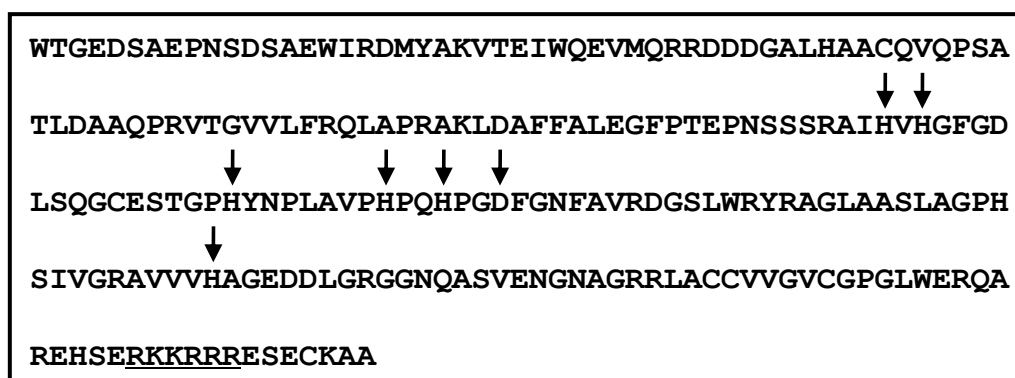
Table 1 Properties of human SOD isozymes.

	<b>Cu,Zn-SOD (SOD1)</b>	<b>Mn-SOD (SOD2)</b>	<b>EC-SOD (SOD3)</b>
<b>Molecular mass</b>	<b>32,000</b>	<b>85,000</b>	<b>135,000</b>
<b>Subunit</b>	<b>a2</b>	<b>a4</b>	<b>a4</b>
<b>Metal (atom/subunit)</b>	<b>1Cu, 1Zn</b>	<b>1Mn</b>	<b>1Cu, 1Zn</b>
<b>Rate constant (<math>\text{M}^{-1}\text{S}^{-1}</math>)</b>	<b><math>\sim 2 \times 10^9</math></b>	<b><math>1.25 \times 10^9</math></b>	<b><math>1.25 \times 10^9</math></b>
<b>Location</b>	<b>cytoplasm</b>	<b>mitochondria</b>	<b>extracell</b>
<b>Carbohydrate</b>	<b>—</b>	<b>—</b>	<b>+</b>
<b>Affinity for heparin</b>	<b>—</b>	<b>—</b>	<b>+</b>

Table 2 に EC-SOD のアミノ酸配列を示す。EC-SOD は Cu,Zn-SOD と同様に活性中心に銅および亜鉛原子を有しており、両 SOD のアミノ酸配列を比較しても金属原子に配位しているアミノ酸は同一であることが知られている。EC-SOD は C-末端側に塩基性アミノ酸であるアルギニン残基 (R) およびリジン残基 (K) が連結しているヘパリン結合ドメイン ( $^{-210}\text{RKKRRR}^{215}-$ ) を有するため、細胞表

面に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンやコンドロイチン硫酸プロテオグリカンなどのグリコサミノグリカン類に結合することで細胞表面に局在すると考えられている。EC-SOD は血管壁に広く分布すると同時に、血管腔に面した内皮細胞表面にも高濃度に分布していることが知られている[18]。そのため、血管内皮細胞の細胞膜に存在する NADPH oxidase (NOX) や内皮細胞表面に接着した白血球などから血管腔内に放出されるスーパーオキシドを効率よく消去することにより、血管系レドックス恒常性の維持に大きく寄与していると考えられている。

Table 2 Amino acid sequence of human EC-SOD. Arrows show the amino acids which bind copper or zinc atom. Under bar shows the sequence of heparin-binding domain.



近年、動脈硬化症の発症抑制および治療のターゲットとして単球やマクロファージ、平滑筋細胞など血管系細胞における抗酸化酵素の発現の制御が注目されている。現在までに、著者が所属する研究室では EC-SOD 発現が単球系細胞株 U937 細胞のマクロファージへの分化過程において低下することを報告しており、動脈硬化症進展過程における EC-SOD 発現と単球の分化との関連性を見出している[19]。生理学的な役割に関しても、EC-SOD ノックアウトマウスでは野生型マウスと比較して、高酸素分圧下での生存率が低下すること[20]、脳虚血

誘導実験において片側不全麻痺や梗塞部位が増大することが報告されている[21]。一方、EC-SOD を過剰発現させた実験動物においては、冠状動脈虚血後の梗塞部位の減少[22]、関節炎誘発モデルにおける関節腔中の腫瘍壊死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ ) を含む炎症性サイトカインレベルの低下が報告されている[23]。これらのことから、動脈硬化症の発症・進展において EC-SOD 発現の減少がその病態形成に大きく関与していると考えられる。

単球のマクロファージへの分化ならびにマクロファージや血管平滑筋細胞への oxLDL の取り込みに起因するレドックス恒常性の破綻が動脈硬化症を促進するという考え方が広まってきており、その予防策として ROS の消去を担う内因性の抗酸化酵素の活性化および食品などから摂取できる抗酸化物質などの適用が注目されている。近年、健康食品やサプリメントなどの摂取により、病気の発症を未然に防ぐ先制医療という考え方が広まってきており、多種多様な化合物の有用性が知られている。その中でも、天然由来化合物ルテオリンは、シソやエゴマなど多くの食物に含まれるフラボノイドの一種であり、抗酸化、抗炎症、抗がん、抗アレルギー作用など多くの作用が報告されている[24-28]。また、抗酸化作用が強く、体内で産生される ROS を効率良く消去することにより生体のレドックス恒常性の維持に貢献していることが知られている。しかし、フラボノイドなどの食品由来の抗酸化物質が動脈硬化巣において抗炎症作用を示すことは多数報告されているものの[29]、内因性抗酸化酵素の発現調節能に着目した報告はわずかである。細胞レベルでの抗酸化酵素、特に動脈硬化症の発症・進展に大きく関わる EC-SOD の発現変動を解明することは、動脈硬化症予防に向けた有用物質の探索に有益な情報を提供できると考えられる。

そこで本研究では、EC-SOD をターゲット分子として、動脈硬化症の発症および進展に大きく関わる単球 (ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞) のマクロファージ



への分化過程 (第 1 章)、THP-1 細胞由来マクロファージの oxLDL 取り込みによる泡沫化過程 (第 2 章) における本酵素の発現変動とその調節機構の解明ならびに動脈硬化症の発症・進展に対するルテオリンの抑制効果 (第 3 章) について検討した。以下に本研究で得られた知見を示す。

# 第 1 章 ヒト単球系細胞のマクロファージへの分化過程における EC-SOD 発現調節機構

## 第 1 節 緒言

近年、動脈硬化症の予防および治療ターゲットとして単球由来マクロファージが注目されている。血中の単球は、活性化された血管内皮細胞などから産生される monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) などの遊走性サイトカインなどの刺激を受け、血管内膜に浸潤し、マクロファージに分化する[30]。分化したマクロファージは、さらに oxLDL や他の修飾 LDL を取り込むことにより泡沫化し、TNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインを放出し、動脈硬化症を誘引することが知られている[31,32]。また、マクロファージから放出される ROS も血管系の恒常性破綻に関与することから、過剰に産生された ROS の消去が動脈硬化症の発症・進展の抑制に繋がることが期待される。

SOD アイソザイムの中で唯一細胞外に局在する EC-SOD は、血管系のレドックス制御に大きく関与していることが報告されている。例えば、EC-SOD が虚血後の組織傷害ならびに梗塞巣の拡大を抑制することが知られている[22,23,33]。さらに、EC-SOD は、窒素過酸化物質であるペルオキシナイトライト (ONOO<sup>-</sup>) の産生を抑制することで、窒素酸化物による血管拡張などの作用を調節していることも報告されている[34]。単球・マクロファージは血管系において、免疫応答や動脈硬化症など、様々な反応に関わっており、実際に、単球やマクロファージの集積が病巣で認められ、動脈硬化症の悪化を招いている[35,36]。

現在までに、当研究室では、単球系細胞株であるヒトリンパ腫由来細胞株 U937

細胞のマクロファージへの分化過程において、EC-SOD 発現が低下することを見出している[37]。これは、U937 細胞の分化過程において、過剰なスーパーオキシドなどにより細胞外レドックス恒常性の破綻が惹起されやすくなる危険性を示しており、単球・マクロファージにおける EC-SOD 発現を制御することの重要性を示唆している。また、ヒト急性単球性白血病由来細胞株 THP-1 細胞も U937 細胞と同様に単球系細胞であり、単球系細胞のモデルとして多くの研究に使用されている。しかしながら、EC-SOD 発現の細胞特異性の点に関しては未だ不明な点が多い。また、EC-SOD が血管系レドックスの恒常性維持に大きく寄与していることから、動脈硬化症の発症・進展過程における EC-SOD の発現変動を解明することは血管系疾患の抑制に向けて重要な情報の提供に繋がると考えられる。

そこで本章では、動脈硬化症と EC-SOD 発現変動との関連性を解明するために、ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞を用いて、マクロファージへの分化過程における EC-SOD の発現変動とその調節機構について検討した。

## 第2節 実験材料及び方法

### 第1項 試薬

RPMI1640 培地、リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline、PBS) は日水製薬株式会社、ペニシリン、ストレプトマイシンは明治製菓株式会社、ウシ胎児血清 (fetal calf serum、FCS)、TRIzol<sup>®</sup>試薬、M-MLV 逆転写酵素、Taq DNA polymerase、RNase 阻害剤、KOD Fx は東洋紡績株式会社、12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) は Sigma-Aldrich 社、mitogen-activated protein kinase (MAPK) 阻害剤である U0126 と PD98059、protein kinase C (PKC) 阻害剤である GF109203X、actinomycin D (ActD) は和光純薬工業株式会社、5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA) は Molecular Probes 社、NADPH oxidase (NOX) 阻害剤である apocynin と diphenyleneiodonium (DPI) はそれぞれ Calbiochem 社、Enzo Life Sciences 社、biotin-conjugated goat anti-rabbit or -mouse IgG (H+L) は Zymed Laboratories 社、THP-1 細胞は ATCC 社から購入した。その他の試薬は市販の特級品を用いた。

### 第2項 細胞培養

細胞は 10%非働化 FCS、100 units/mL ペニシリン、0.1 mg/mL ストレプトマイシンを含む RPMI1640 を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。THP-1 細胞を 3.5 cm dish に  $2.0 \times 10^6$  cells/dish となるように播種した後、100 nM TPA を添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下にて細胞を分化させた。分化後、細胞を掻き取り、PBS で洗浄した後、総 RNA の抽出、フローサイトメトリー、ウェスタンブロッティングを行った。PKC 阻害剤である GF109203X および MAPK 阻害剤である U0126、PD98059 は TPA 処理の 30 分前に、また、mRNA 合成阻害剤である ActD および

NOX 阻害剤である apocynin は TPA 処理の 1 時間前に添加した。

### 第 3 項 RT-PCR

THP-1 細胞を 3.5 cm dish に播種した後、第 2 項に示す方法で細胞を処理した。総 RNA の抽出は 1 mL TRIzol<sup>®</sup> 試薬を用いて行った。抽出した総 RNA 4 µg を用いて、200 units M-MLV 逆転写酵素、5 units RNase 阻害剤、10 mM dithiothreitol (DTT)、0.6 µg ランダムプライマー、0.5 mM dNTP を含む 20 µL の反応液中で、37°C、1 時間インキュベートして cDNA を作製した。

EC-SOD 遺伝子の増幅は上記の cDNA 1 µL を用いて、0.4 mM dNTP、12 pmol センスプライマー、12 pmol アンチセンスプライマー、0.4 unit KOD Fx polymerase を含む 20 µL の反応液中、94°C で 2 分間インキュベートした後、Table 3 に示す条件で PCR 反応を行った。

EC-SOD 以外の遺伝子の増幅は上記の cDNA 1 µL を用いて、0.2 mM dNTP、10 pmol センスプライマー、10 pmol アンチセンスプライマー、0.63 unit Taq polymerase を含む 25 µL の反応液中、94°C で 2 分間インキュベートした後、Table 3 に示す条件で PCR 反応を行った。

PCR 産物は、エチジウムブロマイドを加えた 2% (w/v) アガロースゲルで電気泳動した後、Multi Gauge (Fuji Film) を用いて画像解析を行った。

Table 3 The conditions of amplification of each gene.

Genes		Sequence (5' to 3')	Cycles	Annealing (s)	Elongation (s)
β-actin	sense primer	CAAGAGATGGCCACGGCTGCT	18	60°C (30)	72°C (30)
	antisense primer	TCCTTCTGCATCCTGTCGCA			
EC-SOD	sense primer	AGAAAGCTCTCTTGGAGGAG	35	60°C (30)	68°C (60)
	antisense primer	ACCGCGAAGTTGCCGAAGTC			
Cu,Zn-SOD	sense primer	GCGACGAAGGCCGTGTGCGTG	22	60°C (40)	72°C (60)
	antisense primer	TGTGCGGCCAATGATGCAATG			
Mn-SOD	sense primer	CGACCTGCCCTACGACTACGG	22	60°C (40)	72°C (60)
	antisense primer	CAAGCCAACCCCAACCTGAGC			
CD11b	sense primer	CCCCAGGTCACCTTCTCCG	32	60°C (60)	72°C (60)
	antisense primer	GCTCTGTCGGAAGGAGCCG			
CD14	sense primer	CGAGGACCTAAAGATAACCGGC	28	60°C (60)	72°C (60)
	antisense primer	GTTGCAGCTGAGATCGAGCAC			
CD36	sense primer	TGCCTCTCCAGTTGAAAACCC	25	60°C (60)	72°C (60)
	antisense primer	GCAACAAACATCACCAACCA			
NOX2	sense primer	GGAGTTTCAAGATGCGTGGAATA	25	60°C (30)	72°C (30)
	antisense primer	GCCAGACTCAGAGTTGGAGATGCT			
NOX4	sense primer	CTCAGCGGAATCAATCAGCTGTG	25	60°C (30)	72°C (30)
	antisense primer	AGAGGAACACGACAATCAGCCTTAG			

#### 第4項 ウェスタンブロッティング

THP-1 細胞を第2項に示す方法で処理した後、氷冷した PBS を用いて細胞を洗浄した。MAPK の検出には、1 mM EDTA、1 mM EGTA、1% (w/v) Triron X-100 を含む 20 mM Tris-HCl pH 7.4 (lysis buffer A) を用いて細胞を可溶化し、遠心分離 (10,000 × g、5 分) 後、得られた上清を用いた。リン酸化 PKC および p47<sup>phox</sup> の検出には、2 mM EDTA、10 mM EGTA、100 μg/ml ジギトニンを含む 20 mM Tris-HCl pH 7.5 (lysis buffer B) を用いて細胞を溶解した後、遠心分離 (12,000 × g、5 分) し、得られた上清を回収し、細胞質画分として用いた。また、沈渣物を 1% (w/v) Triton X-100 を含む lysis buffer B 中、超音波破碎した後、遠心分離 (12,000 × g、5 分) し、得られた上清を回収し、細胞膜画分として用いた。それぞれの操作で得られた細胞抽出液 (タンパク質量 20 μg) を 2% SDS、10% グリセロール、50 mM DTT、0.01% bromophenol blue を含む 62.5 mM Tris-HCl buffer pH 6.8 と混和し 5 分間煮沸した後、10% もしくは 12% (w/v) SDS ポリアクリルアミド電気泳動で分離し、

PVDF メンブランにブロッティングした。メンブランを 1% BSA を含む PBS で 1 時間ブロッキングした後、anti-phospho-PKC antibody (Cell Signaling、Cat. # 9371)、anti-phospho-MAPK/ERK kinase 1/2 (MEK1/2) antibody (Cell Signaling、Cat. # 9121)、anti-phospho-extracellular-regulated protein kinase 1/2 (ERK1/2) antibody (Cell Signaling、Cat. # 9106) または anti-p47<sup>phox</sup> antibody (Millipore、Cat. # 07-001) (いずれも 1,000 倍希釈) とメンブランを 4°C 条件下一晩反応させた。その後、0.1% Tween 20 を含む PBS (PBST) で 3 回洗浄した後、biotin-conjugated goat anti-rabbit or -mouse IgG (H+L) (1,000 倍希釈) とメンブランを室温下 1 時間反応させた。その後、PBST で 3 回洗浄した後、メンブランを ABC 試薬 (5,000 倍希釈) で、室温下 30 分反応させた。各種タンパクの検出は、SuperSignal<sup>®</sup> West Pico を用いた化学発光法にて行った。画像の解析は、Multi Gauge V3.0 を用いて行った。Actin、MEK1/2、ERK1/2 の検出は、メンブランのリプローブを行った後、それぞれ anti-actin antibody (Millipore、Cat. # MAB1501)、anti-MEK1/2 antibody (Cell Signaling、Cat. # 9122)、anti-ERK1/2 antibody (Cell Signaling、Cat. # 4695) (いずれも 1,000 倍希釈) を用いて同様に行った。

## 第 5 項 細胞内 ROS の産生量の測定

THP-1 細胞を第 2 項に示す方法で処理した後、37°C に加温した PBS で細胞を洗浄した。その後、細胞を 10  $\mu$ M carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA を含む 1% paraformaldehyde (PFA)-PBS で 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下において 20 分間処理した後、氷冷した PBS で 3 回洗浄し、1% PFA-PBS に再懸濁した。蛍光強度は FACSscan (Becton Dickinson 社) を用いて測定した。解析は、BD CellQuest Pro Software を用いて行った。

## 第 6 項 CD11b および CD14 の発現量の測定

THP-1 細胞を第 2 項に示す方法で処理した後、37°C 加温した PBS で細胞を洗浄した。その後、細胞を CD11b-PE antibody (BD Biosciences、Cat. # 555388) または CD14-FITC antibody (Miltenyi Biotec、Cat. # 130-080-701) を含む 1% PFA-PBS で 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下において 20 分間処理した後、氷冷した PBS で 3 回洗浄し、1% PFA-PBS に再懸濁した。蛍光強度は FACSscan (Becton Dickinson 社) を用いて測定した。解析は、BD CellQuest Pro Software を用いて行った。

## 第 7 項 統計学的解析

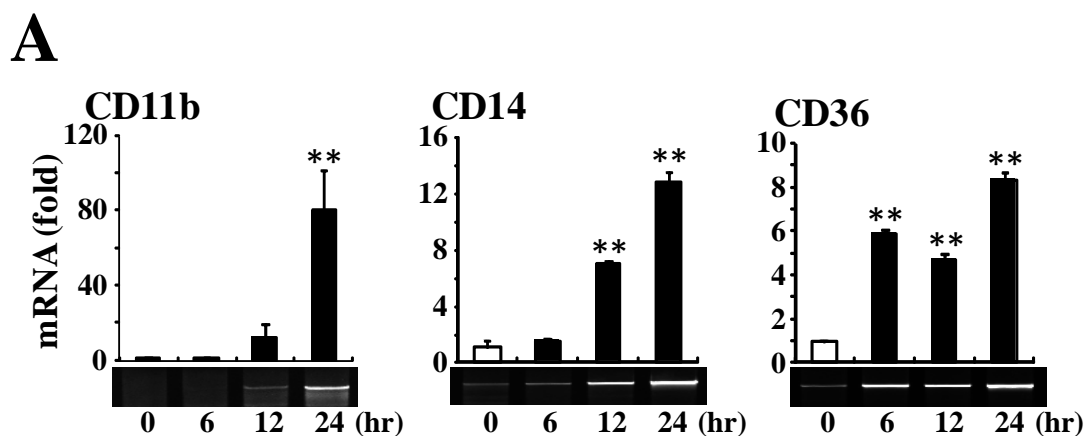
データは、それぞれの実験を 3 回独立して行い、平均 ± 標準誤差として表した。データ解析は、ANOVA および Bonferroni test にて行い、 $p < 0.05$  である場合に統計学的に有意であると判断した。



### 第3節 結果

#### 第1項 TPA 処理による THP-1 細胞のマクロファージへの分化誘導

THP-1 細胞は TPA 処理によりマクロファージ様細胞に分化することが知られており、細胞分化のモデルとして汎用されている[38]。Cluster of differentiation (CD) ファミリーである CD11b、CD14、CD36 はマクロファージへの分化マーカーとして知られており、これら CD ファミリーの発現増大の測定は単球からマクロファージへの分化の評価に有用である。そこで、THP-1 細胞の分化を評価するために、TPA 処理 24 時間後の CD11b、CD14、CD36 の mRNA 発現を RT-PCR 法、CD11b、CD14 タンパク発現量をフローサイトメトリーを用いて測定した。定常状態では CD ファミリーの発現はほとんど認められなかったが、TPA 処理により処理時間依存的に mRNA 発現が増大した (Fig. 1A)。さらに、CD11b および CD14 のタンパク発現レベルは、TPA 処理 24 時間後に有意に増大した (Fig. 1B)。以上の結果から、TPA 処理により THP-1 細胞はマクロファージ様細胞へ分化していると考えられた。



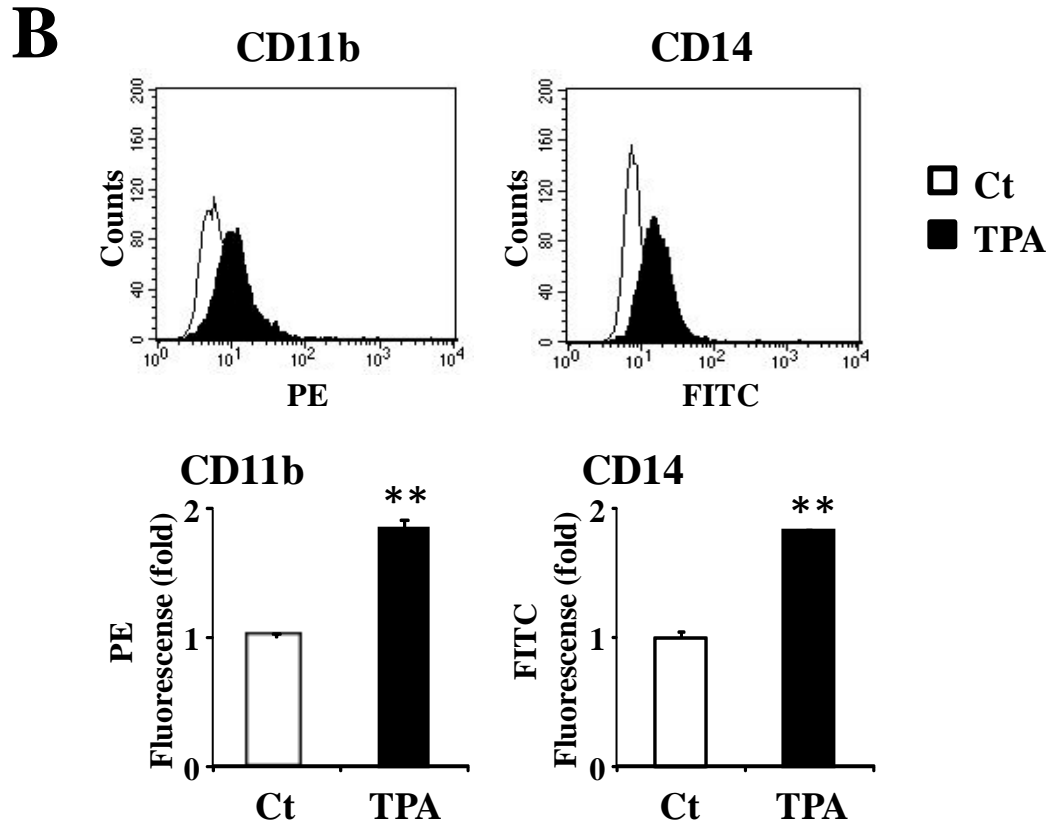


Fig. 1 Expression of CD families mRNA and protein during monocytic differentiation. (A) THP-1 cells were treated with 100 nM TPA for the indicated time. After the cells had been treated, RT-PCR was carried out. RT-PCR data were normalized using  $\beta$ -actin levels (\*\*  $p < 0.01$  vs. untreated cells). (B) The cells were treated with (closed histogram and column) or without (open histogram and column) 100 nM TPA for 24 h. After the cells had been treated, the expression levels of CD11b and CD14 were measured by flow cytometry (\*\* $p < 0.01$  vs untreated cells (Ct)).

## 第2項 分化過程における SOD アイソザイムの発現変動

これまでに、著者らは THP-1 細胞と同様の単球系細胞株である U937 細胞の TPA 誘導性のマクロファージへの分化過程において、各 SOD 発現量が調節を受けることを報告している[19]。そこで今回、THP-1 細胞の分化過程における SOD アイソザイムの発現の変動を RT-PCR 法を用いて測定した。EC-SOD の発現は定常状態ではほとんど認められなかったが、TPA 処理により著しく処理時間依存的に増大した (Fig. 2A)。一方で、Cu,Zn-SOD の発現は時間依存的に低下し、Mn-SOD の発現は12時間をピークに一過性に増大したが、その変動幅はEC-SOD に比べ小さかった (Fig. 2A)。さらに、mRNA 合成阻害剤である ActD にて細胞を前処理することにより、TPA 処理による EC-SOD mRNA の発現増大は有意に抑制されたため、EC-SOD 発現亢進は mRNA の合成促進に起因すると考えられた (Fig. 2B)。

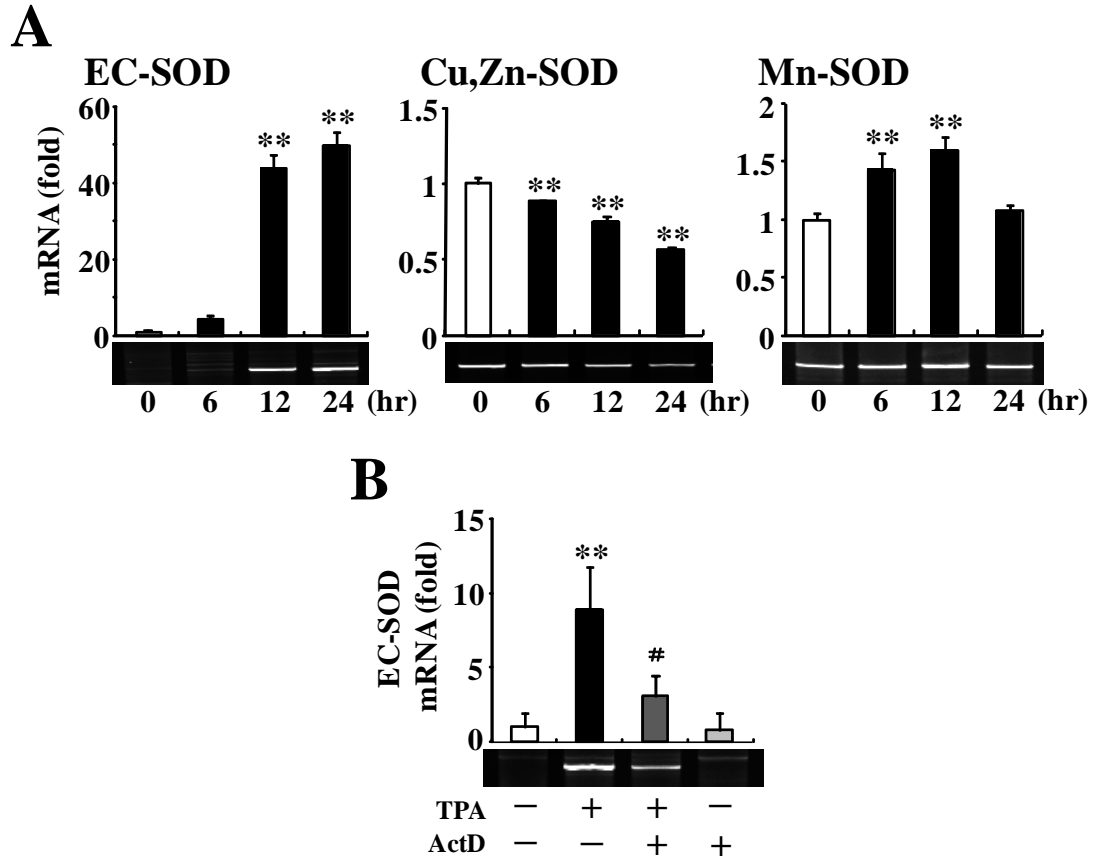


Fig. 2 Expression of SODs mRNA during monocytic differentiation. (A) THP-1 cells were treated with 100 nM TPA for the indicated time. (B) THP-1 cells were pretreated with (+) or without (-) 0.1  $\mu$ g/mL actinomycin D (ActD) for 1 h, and then the cells were treated with (+) or without (-) 100 nM TPA for 24 h. After the cells had been treated, RT-PCR was carried out. RT-PCR data were normalized using  $\beta$ -actin levels (\*\* $p$ <0.01 vs. untreated cells (A) or vehicle (B), # $p$ <0.05 vs. TPA-treated cells).

### 第3項 TPA 処理による EC-SOD 発現増大への PKC の関与

TPA が PKC のアクチベーターとして知られていることから[37]、次に、EC-SOD 発現亢進における PKC の関与を検討した。PKC は定常状態下においてリン酸化された状態で細胞質に存在しており、細胞膜に移行することで活性化し、MAPK などの細胞内シグナル伝達の活性化に大きく関与することが知られている[19]。初めに、TPA 処理による PKC の活性化を検討するために、ウェスタンブロット法にて PKC の膜移行を検討した。THP-1 細胞を TPA にて処理したところ、リン酸化 PKC の膜移行が認められた (Fig. 3A)。次に、TPA 処理による EC-SOD 発現増大への PKC の関与を検討した。PKC の阻害剤 GF109203X (GF) にて細胞を前処理することにより、TPA 処理による EC-SOD mRNA の発現増大がコントロールレベルまで有意に抑制された (Fig. 3B)。さらに、分化マーカーである CD11b mRNA の発現増大も同様に有意に抑制された (Fig. 3B)。以上の結果から、TPA 処理による EC-SOD mRNA 発現増大への PKC の関与が認められた。

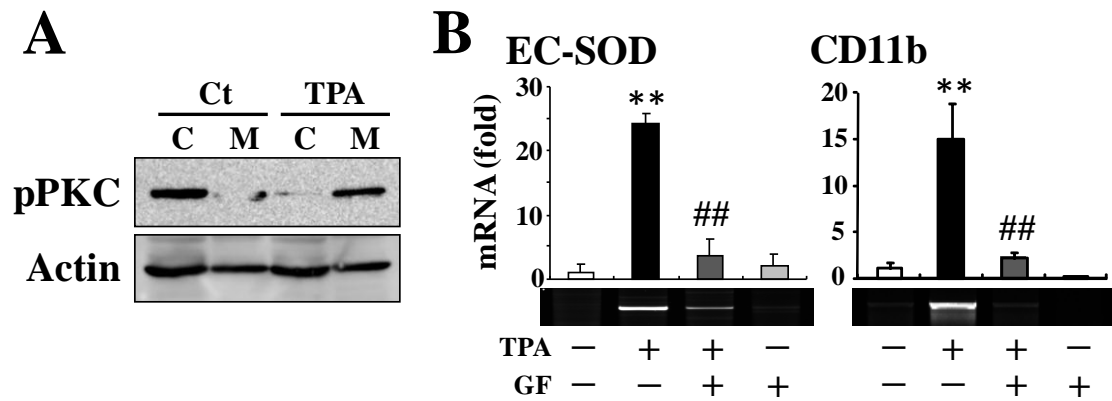


Fig. 3 Involvement of PKC in the TPA-triggered induction of EC-SOD. (A) THP-1 cells were treated with or without 100 nM TPA for 10 min. After the cells had been treated, the membrane translocation of phosphorylated PKC (pPKC) was determined by Western blotting (C: cytosolic fraction, M: membrane fraction). (B) The cells were pretreated with (+) or without (-) 5  $\mu$ M GF109203X (GF) for 30 min, and then treated with (+) or without (-) 100 nM TPA for 24 h. After the cells had been treated, RT-PCR was carried out. RT-PCR data were normalized using  $\beta$ -actin levels (\*\* $p$ <0.01 vs. vehicle, ## $p$ <0.01 vs. TPA-treated cells).

#### 第4項 TPA 処理による EC-SOD 発現増大への MEK1/2 および ERK1/2 の関与

著者らは以前、単球系細胞、平滑筋細胞および腎尿細管間質細胞における EC-SOD 発現調節機構への MAPK の関与を報告している[19,39,40]。そこで次に、TPA 処理による EC-SOD 発現増大に対する MAPK の関与を検討した。まず初めに、TPA 処理による MAPK の活性化をウエスタンブロッティング法にて検討した結果、MEK1/2 および ERK1/2 のリン酸化が認められた (Fig. 4A)。一方、TPA 処理による c-Jun N-terminal kinase (JNK) および p38-MAPK のリン酸化は認められなかった (data not shown)。次に、TPA 処理による EC-SOD 発現増大への MAPK の関与をそれらの阻害剤を用いて検討した。MEK 阻害剤である U0126 および PD98059 にて細胞を前処理したところ、TPA 処理による EC-SOD mRNA 発現増大がコントロールレベルまで有意に抑制された (Fig. 4B)。さらに、分化マーカーである CD11b mRNA の発現増大も同様に有意に抑制された (Fig. 4B)。次に、ERK1/2 の活性化への PKC の関与を検討するため、ウエスタンブロッティングを行った。PKC 阻害剤 GF109203X、MEK 阻害剤 U0126 および PD98059 にて細胞を前処理することにより、TPA 誘導性 ERK1/2 のリン酸化が抑制された (Fig. 4C)。以上の結果から、TPA 処理による EC-SOD mRNA 発現増大への PKC、MEK1/2 および ERK1/2 の関与が認められた。

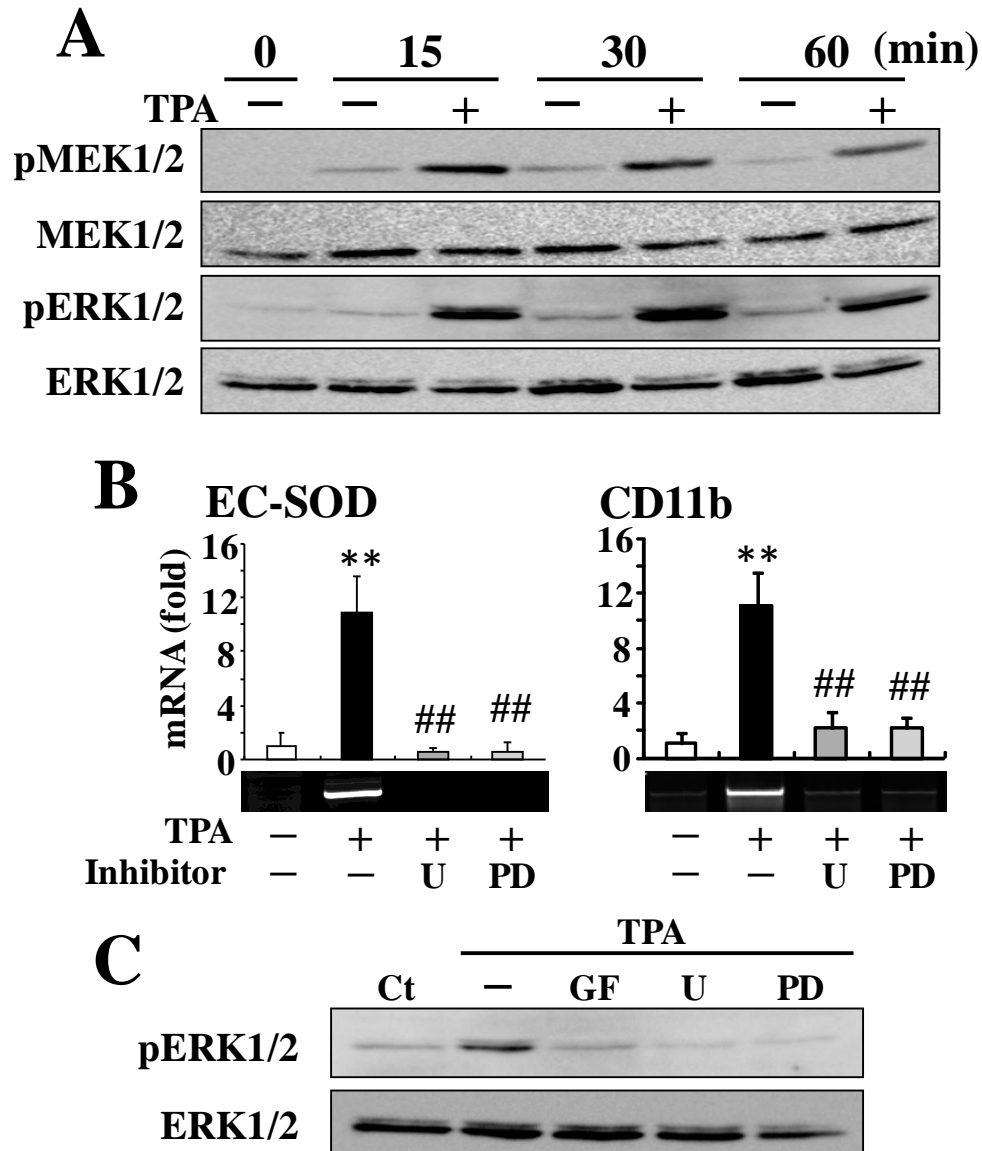


Fig. 4 Involvement of MAPK in the TPA-triggered induction of EC-SOD. (A) THP-1 cells were treated with (+) or without (-) 100 nM TPA for the indicated time. After the cells had been treated, phosphorylated and total MEK1/2 and ERK1/2 levels were determined by Western blotting. (B) The cells were pretreated with or without 5  $\mu$ M U0126 (U) or 50  $\mu$ M PD98059 (PD) for 30 min, and then treated with (+) or without (-) 100 nM TPA for 24 h. After the cells had been treated, RT-PCR was carried out. RT-PCR data were normalized using  $\beta$ -actin levels (\*\*  $p < 0.01$  vs. vehicle, ##  $p < 0.01$  vs. TPA-treated cells). (C) The cells were pretreated with or without 5  $\mu$ M GF109203X (GF), 5  $\mu$ M U0126 (U) or 50  $\mu$ M PD98059 (PD) for 30 min, and then treated with (+) or without (-) 100 nM TPA for 15 min. After the cells had been treated, phosphorylated and total ERK1/2 levels were determined by Western blotting.



## 第5項 TPA 処理による EC-SOD 発現増大への NOX2 由来 ROS の関与

単球のマクロファージへの分化過程において、スーパーオキシドの産生や  $\text{H}_2\text{O}_2$  の蓄積が増大することが知られている[41,42]。そこで次に、細胞内 ROS 産生をフローサイトメトリーにて測定した。THP-1 細胞を TPA にて処理することにより、24 時間後に細胞内 ROS 産生の亢進が認められた (Fig. 5A)。TPA 処理による ROS 産生亢進に、NOX の活性化が関与することが知られている。そこで次に、TPA 処理による NOX2 mRNA および NOX4 mRNA の発現変動を検討したところ、NOX2 mRNA の発現は処理時間依存的に有意に増大したが、NOX4 mRNA 発現レベルの変動は認められなかった (Fig. 5B)。したがって、TPA 処理による ROS 産生に NOX2 が関与することが示唆された。NOX2 の活性化には、細胞質に存在する  $\text{p40}^{\text{phox}}$ 、 $\text{p47}^{\text{phox}}$  および  $\text{p67}^{\text{phox}}$  の膜移行が必須であり、細胞膜に存在する NOX2 の本体である gp91 が  $\text{p22}^{\text{phox}}$  と複合体を形成することにより活性化され、酸素からスーパーオキシドを産生することが知られている[42,43]。 $\text{p47}^{\text{phox}}$  は、通常の状態では NOX2 への結合部位がマスクされているが、リン酸化によってその結合部位が露出することで NOX2 に結合し、その活性化に寄与している。そこで次に、TPA 処理による  $\text{p47}^{\text{phox}}$  の膜移行をウエスタンブロット法にて検討した結果、本分子の膜移行が認められた (Fig. 5C)。一方、MEK/ERK 阻害剤である U0126 および PD98059 にて細胞を前処理することにより、 $\text{p47}^{\text{phox}}$  の膜移行が抑制された。次に、MEK1/2、ERK1/2 と NOX2 との関係性を明らかにするため、NOX2 活性阻害剤である apocynin (Apo) の前処理による ERK1/2 の活性化をウエスタンブロット法にて検討した。しかし、THP-1 細胞を Apo にて前処理しても、TPA 処理による ERK1/2 のリン酸化は抑制されなかった (Fig. 5D)。この結果から、TPA 処理による NOX2 の活性化は、MEK1/2 および ERK1/2 の下流で起きることが示唆された。そこで次に、細胞内 ROS 産生への MEK1/2、

ERK1/2 および NOX2 の関与をフローサイトメトリーにて検討した。THP-1 細胞を MEK/ERK 阻害剤 U0126 および NOX2 阻害剤 Apo にて前処理することにより、TPA 処理による細胞内 ROS 産生が有意に抑制された (Fig. 5E)。また、次に TPA 処理による EC-SOD 発現増大への NOX2 の関与を RT-PCR 法にて検討した。THP-1 細胞を Apo にて前処理することにより、TPA 処理による EC-SOD 発現増大がコントロールレベルまで有意に抑制された (Fig. 5F)。以上の結果から、TPA 処理による EC-SOD 発現増大に NOX2 活性化による ROS 産生が関与することが示唆された。

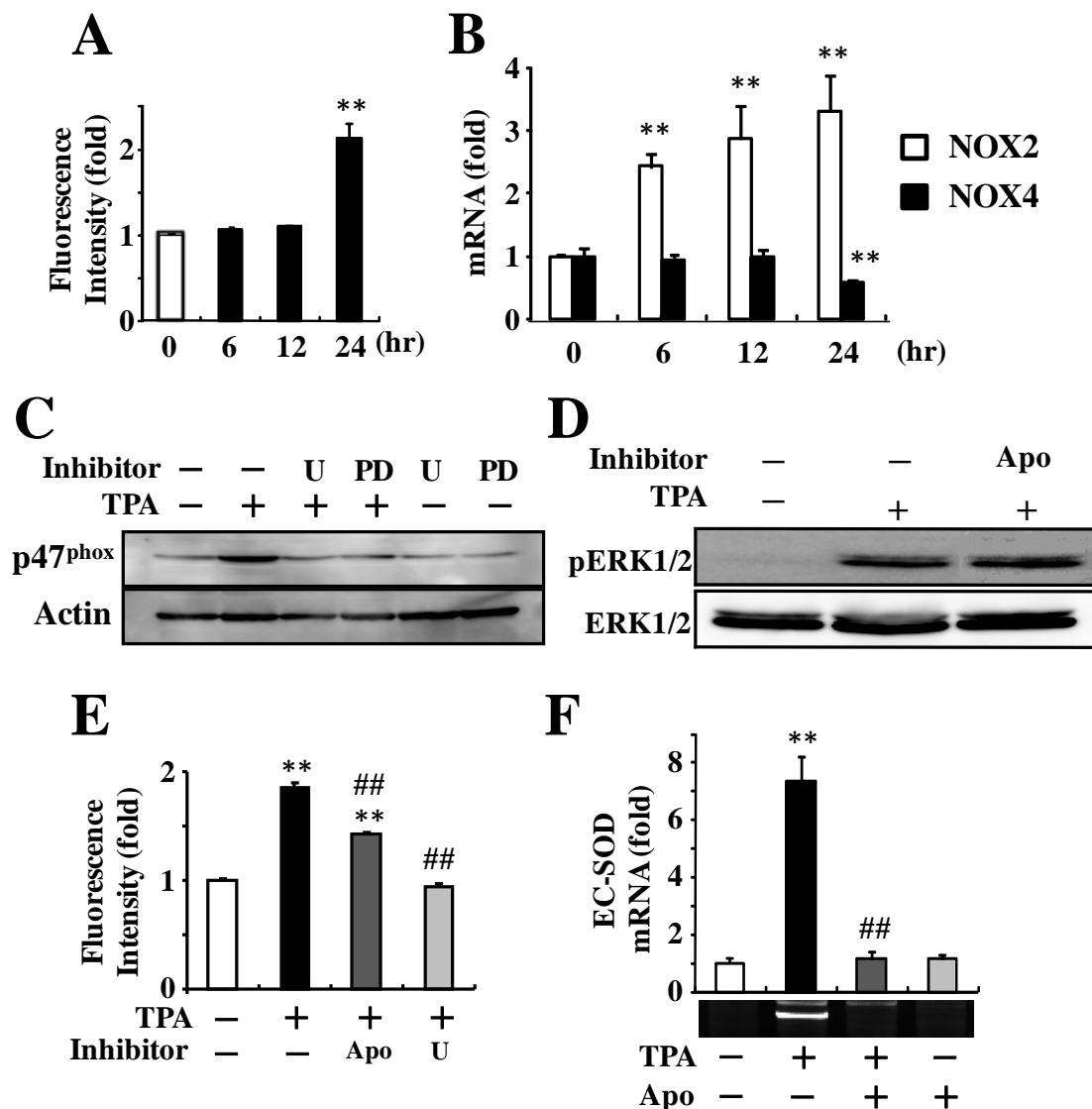


Fig. 5 Involvement of intracellular ROS in TPA-triggered induction of EC-SOD. (A) THP-1 cells were treated with or without 100 nM TPA for the indicated time. After the cells had been treated, intracellular ROS accumulation was measured by flow cytometry (\*\* $p < 0.01$  vs. untreated cells). (B) The cells were treated with 100 nM TPA for the indicated time. After the cells had been treated, NOX2 and NOX4 expression was measured by RT-PCR. RT-PCR data were normalized using  $\beta$ -actin levels (\*\* $p < 0.01$  vs. vehicle). (C) The cells were pretreated with or without (-) 5  $\mu$ M U0126 (U) or 50  $\mu$ M PD98059 (PD) for 30 min and then treated with (+) or without (-) 100 nM TPA for 12 h. After the cells had been treated, the membrane translocation of p47<sup>phox</sup> was determined by Western blotting (membrane fraction). (D) The cells were pretreated with (+) or without (-) 400  $\mu$ M apocynin (Apo) for 1 h and then treated with (+) or without (-) 100

nM TPA for 15 min. After the cells had been treated, phosphorylated and total ERK1/2 levels were determined by Western blotting. (E) The cells were pretreated with (+) or without (-) 400  $\mu$ M apocynin (Apo) for 1 h or 5  $\mu$ M U0126 (U) for 30 min and then treated with (+) or without (-) 100 nM TPA for 24 h. After the cells had been treated, intracellular ROS accumulation was measured by flow cytometry (\*\* $p$ <0.01 vs. untreated cells, ### $p$ <0.01 vs. TPA-treated cells). (F) The cells were pretreated with (+) or without (-) 400  $\mu$ M apocynin (Apo) for 1 h and then treated with (+) or without (-) 100 nM TPA for 24 h. After the cells had been treated, RT-PCR was then carried out. RT-PCR data were normalized using  $\beta$ -actin levels (\*\* $p$ <0.01 vs. untreated cells, ### $p$ <0.01 TPA-treated cells).

## 第4節 考察

単球のマクロファージへの分化は、動脈硬化症の初期に認められるプロセスであり、動脈硬化症の予防に向け介入すべき過程として近年注目を集めている[43]。THP-1、U937 および HL60 などの単球系細胞株は、TPA、*all-trans*-retinoic acid (ATRA) または 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> によってマクロファージに分化することが知られている[38,41]。単球がマクロファージに分化する過程において、CDファミリーの発現レベルが増大するとともに、浮遊細胞から接着細胞への形質変化が認められる。本研究においても、THP-1 細胞への TPA 処理により、CD11b、CD14 および CD36 発現が著しく増大しており (Fig. 1)、マクロファージへの分化が認められた[19,44-46]。

EC-SOD は、血管系に存在する主要な SOD アイソザイムの一つであり、スーパーオキシドや炎症性サイトカインの過剰産生に対して細胞保護的に働くことで、抗炎症・抗動脈硬化作用を示すことが知られている[47-49]。血管系細胞の恒常性維持において、EC-SOD が重要な役割を果たすにも関わらず、単球およびマクロファージにおける EC-SOD 発現およびその調節機構はほとんど知られていない。当研究室では、単球系細胞株である U937 細胞の分化過程において、EC-SOD 発現が低下することを報告しているが、THP-1 細胞の分化過程での変化は十分に解明されていない。本章では、THP-1 細胞の分化過程において、EC-SOD 発現が著しく増大すること、その発現増大は転写レベルで制御されていることを明らかにした (Fig. 2)。一方、Cu,Zn-SOD および Mn-SOD の発現は、U937 細胞の場合と同様の挙動を示した (Fig. 2)。これらの結果より、単球の分化過程において、細胞特異的に EC-SOD の発現が制御されていることが示唆された。EC-SOD の転写誘導は、EC-SOD プロモーター領域への Sp1 および Sp3 の結合に

より制御されることが報告されている[50]。したがって、TPA 処理による EC-SOD 発現増大には転写因子の関与も考えられる。

ホルボールエステルである TPA は、PKC のアクチベーターとして知られており[37]、MAPK や NF- $\kappa$ B などの下流のシグナルを活性化させる[51]。これらの中でも、特に MEK1/2 および ERK1/2 経路は分化過程に大きく関与している。また、種々の細胞において、EC-SOD の発現が MAPK により制御されることが報告されている[19,40,52-54]。本研究において、TPA 処理した場合 PKC の膜移行による活性化が認められ、PKC 阻害剤である GF109203X の前処理により、TPA 誘導性 EC-SOD 発現増大が抑制されることが明らかになった (Fig. 3)。TPA 処理により、Ras の高リン酸化が誘導されることが知られており、PKC の下流に存在する c-Raf が、TPA で誘導される細胞内シグナルを介して遺伝子発現を制御すると考えられている[55]。実際に、TPA 処理による ERK1/2 のリン酸化に PKC が関与することを確認しており (Fig. 4C)、PKC、MEK1/2 および ERK1/2 のシグナルが活性化されると考えられる。一方で、過去に著者らが報告した U937 細胞での EC-SOD 発現における NF- $\kappa$ B の関与は[19]、THP-1 細胞の分化過程においては認められなかった (data not shown)。

NOX2 は、単球およびマクロファージに多く発現している膜タンパク質であり、酸素からスーパーオキシドを産生することにより、細菌やウイルスなどから生体を防御している [56,57]。一方で、スーパーオキシドや過酸化水素などの細胞内 ROS 産生を抑制することにより、単球系細胞株のマクロファージへの分化やシクロオキシゲナーゼ-2 の発現が抑制されることが報告されている[58]。本研究では、PKC、MEK1/2 および ERK1/2 経路を介した NOX2 の活性化を明らかにした (Fig. 5)。さらに、PKC、MEK1/2、ERK1/2 および NOX2 由来 ROS が、TPA 処理による EC-SOD 発現調節に関与することを明らかにした (Fig. 5)。以上、本

研究の結果をまとめると、THP-1 細胞の TPA 処理による EC-SOD 発現増大は、Fig. 6 に示すシグナル伝達を介すると考えられる。

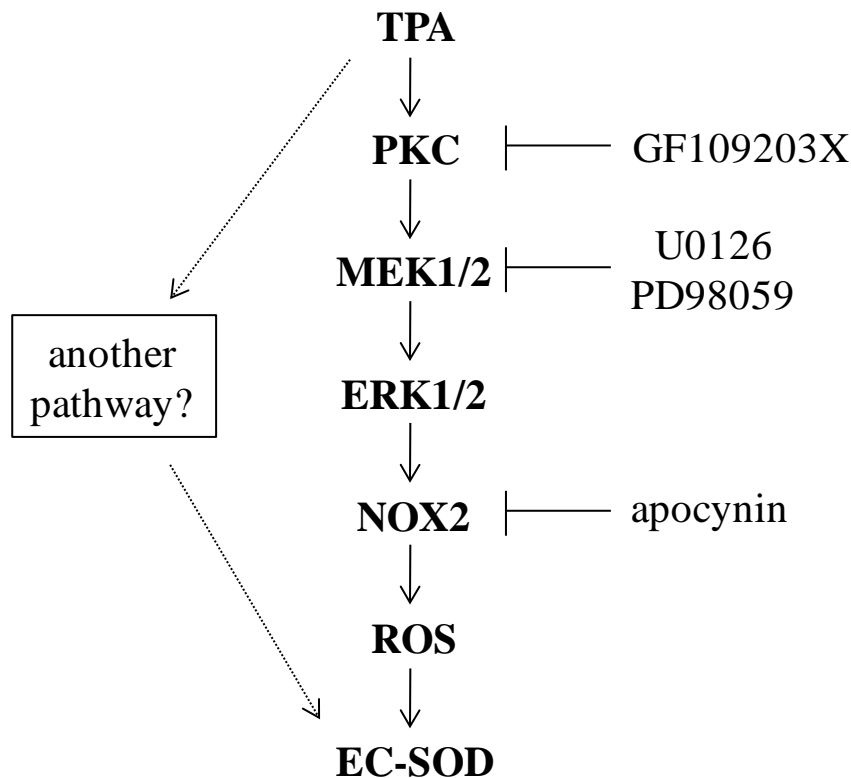


Fig. 6 Hypothesis of the mechanism of TPA-triggered EC-SOD induction. EC-SOD is induced during monocytic differentiation through PKC, MEK1/2, ERK1/2 and NOX2-derived ROS.

本研究では、定常状態で EC-SOD 発現がほとんど認められない THP-1 細胞 (成人由来細胞) の分化過程における EC-SOD 発現調節機構を解明したが、同じ単球系細胞株である U937 細胞 (1 歳男児由来細胞) では、定常状態で EC-SOD の発現が認められ、その違いの理由の一つに、増殖能や分化の特性の違いが考えられる。また、様々な環境因子が、DNA のメチル化などのエピジェネティックな機構を介して、組織形成を制御することが報告されており [59]、エピジェネティックな DNA 修飾が種々の病態の発症に関与することが知られている。著者らはすでに、THP-1 細胞および U937 細胞において、定常状態の EC-SOD 発現がエ

ピジェネティクスの制御を受けていることを報告しており[60]、今後、EC-SOD  
発現制御機構としてのエピジェネティクス制御に着目した研究は、動脈硬化症  
予防薬および治療薬探索に向けての新しい切り口になると考えられる。



## 第 2 章 ヒト単球系細胞由来マクロファージの oxLDL 曝露による EC-SOD レベルの変動とその調節機構

### 第 1 節 緒言

メタボリックシンドロームは、内臓脂肪型肥満を中心として高血糖、脂質代謝異常、高血圧を重複して有する病態であり、動脈硬化性疾患の前駆段階とされている。動脈硬化症が進行すると、血管の肥厚が認められ、最終的に血栓などにより脳梗塞や心筋梗塞が引き起こされる危険性がある。マクロファージは病態形成のすべてのステージに関わっており、硬化巣形成ならびに動脈硬化症の発症を促進させている[61]。LDL の細胞内への取り込みは動脈硬化症の発症に大きく関わっており、動脈硬化巣において修飾された LDL が認められる[3]。特に、oxLDL はスカベンジャー受容体 (scavenger receptors、SRs) に認識され、マクロファージに際限なく取り込まれることが知られていることから[1,2]、oxLDL 曝露による泡沫化形成を抑制することが動脈硬化症の発症予防に繋がると考えられる[62]。

この病態発症の一連の過程で産生される ROS が、更なる病態の悪化を招いている。一方で EC-SOD はこの ROS を効率良く消去することにより、病態の進行を抑えている[10,11,16,47-49,63-65]。第 1 章では、ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞の TPA 処理により、EC-SOD 発現が増大することが明らかになり[66]、単球のマクロファージへの分化後のレドックス恒常性維持に大きく寄与していることが考えられた。

近年、EC-SOD 発現が、エピジェネティクス制御を受けていることが報告され

ている[60,67,68]。エピジェネティクスとは、DNA 塩基配列の変化を伴わない後天的遺伝子発現制御の考え方であり、DNA のメチル化やヒストン修飾に大別され、遺伝子の転写を正または負に制御している。また、転写因子である Sp1/Sp3 が、EC-SOD の近位プロモーター配列に相互作用することにより、その発現を制御することも報告されている[50,69]。このように、これらの因子による遺伝子発現レベルでの制御が動脈硬化症の進展過程においても認められるかが注目されている。

緒論で述べたが、EC-SOD は細胞外の ROS を消去することにより、血管系レドックスの恒常性維持に働いており[22,70]、その発現の有無が *in vivo* において、動脈硬化巣の形成に影響を及ぼしている。また、EC-SOD の発現が LDL の酸化反応を抑制することが報告されている[71]。OxLDL の取り込みによるマクロファージの泡沫化は、NOX 活性化によるスーパーオキシドや過酸化水素などの ROS の産生を亢進させ、酸化ストレスに対する抵抗性を減弱させることにより、動脈硬化症の更なる悪化を招いている。したがって、病態進展過程における EC-SOD の発現を明らかにすることは、動脈硬化症の発症メカニズムの解明ならびに動脈硬化症の新規予防薬の開発に役立てられると考えられる。

そこで、本研究では、単球由来マクロファージの泡沫化と EC-SOD の発現変動との関連性を明らかにするため、マクロファージへの oxLDL 取り込みによる泡沫化過程における EC-SOD 発現変動を検討した。

## 第 2 節 実験材料及び方法

### 第 1 項 試薬

Lipofectamine<sup>®</sup> 3000、Lipofectamine<sup>®</sup> RNAiMAX は Invitrogen 社、Oil Red O は Sigma-Aldrich 社、臭化ナトリウム (NaBr) は Nacalai tesque 社、ビスンコニン酸 (bicinchoninic acid、BCA) は Thermo fisher scientific 社、12PC チューブは Hitachi Koki 社、透析膜 (分画分子量 12,000~14,000) は三光純薬株式会社、*Eco*RI、*Eco*RV および *Hind*III は Boehringer Mannheim 社、anti-acetyl-histone H3 rabbit polyclonal antibody (Cat. # 06-599), anti-acetyl-histone H4 rabbit polyclonal antibody (Cat. # 06-598) は Millipore 社、anti-Sp1 rabbit polyclonal antibody (Cat. # sc-59)、anti-Sp3 (Cat. # sc-644) rabbit polyclonal antibody は Santa Cruz Biotechnology 社、siCD36 (Cat. # AM16708, 105940) は ambion 社から購入した。その他の試薬は、第 1 章、第 2 節、第 1 項に示しており、市販の特級品を用いた。

### 第 2 項 細胞培養

第 1 章、第 2 節、第 2 項で示す方法で THP-1 細胞の培養を行った。THP-1 細胞を 3.5 cm dish に  $2.0 \times 10^6$  cells/dish となるように播種した後、100 nM TPA にて細胞を 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間処理し、細胞を分化させた。その後 PBS で 2 回洗浄し、100 µg/mL oxLDL にて 24、48 または 72 時間処理もしくは 100 µg/mL native LDL にて 72 時間処理した。細胞を掻き取り、PBS で洗浄した後、総 RNA の抽出、ウエスタンブロッティングを行った。mRNA 合成阻害剤である ActD は oxLDL と同時に添加した。

### 第 3 項 LDL の分画と oxLDL の作製

ヒト健常人より約 50mL の血液を採取し、4~5 時間室温で静置した後、遠心分離 (3,000 rpm、15 min) を 2 回行い約 25 mL の血清 (密度 1.006 g/mL) を得た。血清を 12PC チューブに各 4.5 mL 分注 (4 本) し、LDL の密度 (密度 1.019 ~ 1.063 g/mL) となるように NaBr で調製した比重液 A (1.032 g/mL) を等量加え全量を各 9 mL とした。その後、4°C 条件下で超遠心分離 (45,000 rpm、24 h) を行い、上層のキロミクロンおよび超低密度リポタンパク質 (VLDL) 4.5 mL を除去した。引き続き、比重液 B (1.107 g/mL) を等量加え、再度 4°C 条件下で超遠心分離 (45,000 rpm、24 h) を行い、LDL (上清) を分取した。得られた LDL から NaBr を除くため、LDL の 100 倍量の PBS に対し透析 (4°C、24 h) を 3 回行った。ここで得られた LDL を native LDL (nLDL) とし、BCA 法にてタンパク定量を行った。

LDL は 100 µg/mL のタンパク濃度に、Cu<sup>2+</sup>は 10 µM となるように PBS にて調製した後混和し、37°C 条件下で 4 時間インキュベートすることで oxLDL を作製した。その後 Cu<sup>2+</sup>を除くために、EDTA を 0.3 mM となるように加えた後、oxLDL のタンパク量を BCA 法にて測定した。

#### 第 4 項 Oil Red O 染色

TPA 誘導性 THP-1 細胞由来マクロファージを nLDL または oxLDL 100 µg/mL にて 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で処理した後、PBS で洗浄し、10% PFA にて 10 分間細胞を固定した後、Oil Red O で 20 分間染色を行った。細胞内への脂質の取り込みは光学顕微鏡にて観察した。

#### 第 5 項 細胞内コレステロール測定

細胞内コレステロール値は、EnzyChrom™ AF Cholesterol Assay Kit (BioAssay

Systems、Cat. # E2CH-100) を用いて測定した。TPA 誘導性 THP-1 細胞由来マクロファージを oxLDL 100  $\mu\text{g/mL}$  にて処理し、PBS で洗浄後、PBS 100  $\mu\text{L}$  に再懸濁し、超音波破碎機 (Vibra Cell™ VC100) を用いて細胞を破碎し (amplitude 30、1.5 s、3 回)、遠心分離 (14,000 rpm、10 min) 後、上清を回収しサンプルとし、プロトコールに従って測定した。

## 第 6 項 RT-PCR

THP-1 細胞を 3.5 cm dish に播種した後、第 2 項に示す方法で細胞を処理した。以下、第 1 章、第 2 節、第 3 項で示した方法で cDNA の作製および Table 4 で示す条件で PCR 反応を行った。

Table 4 The conditions of amplification of each gene.

Genes		Sequence (5' to 3')	Cycles	Annealing (s)	Elongation (s)
EC-SOD	sense primer	AGAAAGCTCTCTTGGAGGAG	35	60°C (30)	68°C (60)
	antisense primer	ACCGCGAAGTTGCCGAAGTC			
SR-A	sense primer	GCAGTTCTCATCCCTCTCTCAATTGGA	30	60°C (60)	72°C (60)
	antisense primer	ATTCCCATGTCCCTGTGGACTGAG			
CD36	sense primer	TGCCTCTCCAGTTGAAAACCC	25	60°C (60)	72°C (60)
	antisense primer	GCAACAAACATCACACACCA			
LOX-1	sense primer	CCTTGCTCGGAAGCTGAATG	30	60°C (60)	72°C (60)
	antisense primer	CAGCGCCTCGGACTC			
18S rRNA	sense primer	CGAGGACCTAAAGATAACCGGC	18	60°C (45)	72°C (45)
	antisense primer	GTTGCAGCTGAGATCGAGCAC			

## 第 7 項 ヒストン精製

THP-1 細胞を 3.5 cm dish に播種し、第 2 項に示す方法で細胞を処理した後、氷冷した PBS を用いて細胞を洗浄した。洗浄後、氷冷した histone 抽出 buffer (0.15 M NaCl、1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.65% NP-40、10 mM NaF、1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、20 mM  $\beta$ -glycerophosphate、1 mM DTT および 1 mM PMSF を含む 0.1 M Tris-HCl pH 7.5) を 100  $\mu\text{L}$  添加し、細胞を回収し、10 秒間 vortex mix を行った後、10 分間氷冷

した。さらに、10 秒間 vortex mix した後、遠心分離 (12,000 rpm、10 s) を行い、上清を除去した。次に、0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 μL を添加し vortex mix した後、遠心分離 (12,000 rpm、20 min) を行った。遠心後、100% トリクロロ酢酸 25 μL があらかじめ入った 1.5 mL チューブに上清を添加し vortex mix した後、遠心分離 (12,000 rpm、20 min) を行い、上清を除去した。次に、アセトン 500 μL を添加し転倒混和してから遠心分離 (12,000 rpm、5 min) を行い、上清を除去した。ペレットを室温で風乾後、1 × SDS buffer (2% SDS、6% 2-mercaptoethanol および 0.01% bromophenol blue を含む 0.05 M Tris-HCl pH 8.8) 100 μL を添加し、95°C にて、5 分間インキュベートした。

#### 第 8 項 ウェスタンブロッティング

第 7 項に示す方法で得られたサンプルを、第 1 章、第 2 節、第 4 項に示す方法で PVDF メンブランにブロッティングした。メンブランを 1% BSA を含む PBS で 1 時間ブロッキングした後、anti-acetyl-histone H3 rabbit polyclonal antibody もしくは anti-acetyl-histone H4 rabbit polyclonal antibody とメンブランを 4°C 条件下、一晩反応させた。その後、0.1% Tween 20 を含む PBS (PBST) で 3 回洗浄した後、biotin-conjugated goat anti-rabbit IgG (H+L) とメンブランを室温下 1 時間振盪し反応させた。次に、同項で示す方法にてタンパクの検出を行った。

#### 第 9 項 クロマチン免疫沈降法 (chromatin immunoprecipitation assay、ChIP 法)

THP-1 細胞を  $5 \times 10^6$  cells/dish となるように 9 cm dish に播種した後、第 2 項に示す方法で細胞を処理した。最終濃度が 1% となるように PFA を添加し 5 分間室温でインキュベートし細胞を固定した後、最終濃度が 500 mM となるようにグリシンを添加し 5 分間室温でインキュベートした。細胞を回収後、遠心分離 (1,200

rpm、3 min) を行い上清を除去し、次いで PBS にて細胞を洗浄した。その後、遠心分離 (1,200 rpm、3 min) を行い、同様に NP-40 buffer (10 mM NaCl、0.5% NP-40 を含む 10 mM Tris-HCl pH 8.0) 1 mL で細胞を可溶化した。その後、遠心分離 (3,000 rpm、3 min) を行い、上清を除去し、SDS 溶解 buffer (1% SDS、10 mM EDTA を含む 50 mM Tris-HCl pH 8.0) 100  $\mu$ L で細胞を懸濁後、ChIP 希釈 buffer (167 mM NaCl、1.1% Triton X-100、0.11% deoxycholic acid、10 mM NaF、1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、20 mM  $\beta$ -glycerophosphate、1 mM DTT、1 mM PMSF を含む 50 mM Tris-HCl pH 8.0) 400  $\mu$ L を添加した。その後、超音波破碎機 (Vibra Cell<sup>TM</sup> VC100) を用いて細胞を破碎し (amplitude 40、12 s、6 回)、遠心分離 (14,000 rpm、10 min) 後、上清を回収し ChIP 希釈 buffer を 500  $\mu$ L 添加した。超音波処理した DNA 断片について、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、150-800 bp 程度の大きさであることをアガロースゲル電気泳動にて確認した。確認後、0.6 mg Dynabeads<sup>®</sup> Protein G を PBS および RIPA buffer I (150 mM NaCl、1 mM EDTA、0.1% SDS、0.1% deoxycholic acid、proteinase inhibitors を含む 50 mM Tris-HCl pH 8.0) で洗浄した。超音波処理した DNA 断片 ( $1 \times 10^6$  cell 相当)、洗浄した Dynabeads<sup>®</sup> Protein G に対し、2  $\mu$ g の anti-acetyl-histone H3 rabbit polyclonal antibody、anti-acetyl-histone H4 rabbit polyclonal antibody、anti-Sp1 rabbit polyclonal antibody、anti-Sp3 rabbit polyclonal antibody もしくは normal rabbit IgG polyclonal antibody を 500  $\mu$ L の RIPA buffer I 中で、4°C 条件下、一晚攪拌した。その後、RIPA buffer I および RIPA buffer II (500 mM NaCl、1 mM EDTA、0.1% SDS、0.1% deoxycholic acid、proteinase inhibitors を含む 50 mM Tris-HCl、pH 8.0)、TE buffer (1 mM EDTA を含む 10 mM Tris-HCl pH 8.0) で Dynabeads<sup>®</sup> Protein G の洗浄を行った。洗浄した Dynabeads<sup>®</sup> Protein G および input として超音波処理した DNA ( $1 \times 10^4$  cell 相当) に ChIP 溶出 buffer (300 mM NaCl、5 mM EDTA、0.5% SDS を含む

10 mM Tris-HCl pH 8.0) 100  $\mu$ L および RNase A 1  $\mu$ g を添加し、37°C 条件下、30 分間インキュベートを行った。そこへ proteinase K 15.3  $\mu$ g を添加し、65°C 条件下、2 時間インキュベートを行った。各インキュベート中は 10 分毎に vortex mix を行った。その後、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、得られた沈殿物を TE buffer 20  $\mu$ L に溶解した。その後、Table 5 に示す条件で PCR 反応を行った。

Table 5 The conditions of amplification of each gene.

Genes		Sequence (5' to 3')	Cycles	Annealing (s)	Elongation (s)
EC-SOD	sense primer	GTGGAGGCGAAGCAATTCTA	35	60°C (60)	72°C (60)
	antisense primer	CTGTTAGCGCGAGTGCAGGA			

#### 第 10 項 RNA 干渉を用いた CD36 のノックダウン

THP-1 細胞を 3.5 cm dish に  $2 \times 10^6$  cells/dish になるよう播種し、TPA 処理 24 時間後に、control もしくは CD36 small interfering RNA (siRNA) (sense, 5'-GGAAUCCCUGUGUAUAGAUtt-3'; antisense, 5'-AUCUAUACACAGGGAUUCt-3') を Lipofectamine<sup>®</sup> RNAiMAX 試薬を用いてトランスフェクションし、48 時間インキュベートした。その後、PBS を用いて洗浄し、LDL および Act D にて処理した。

#### 第 11 項 プラスミド作製

EC-SOD または Cu,Zn-SOD 遺伝子はヒトゲノム DNA を鋳型として、PCR 法にて増幅させた。EC-SOD 3'-untranslated region (3'UTR) および Cu,Zn-SOD 3'UTR の作製は KOD-Fx polymerase を用いて、EC-SOD mRNA の 3'UTR を一部欠損させたプラスミド (EC-SOD  $\Delta$ 3'UTR) の作製は KOD -Plus- Mutagenesis Kit (Toyobo、



Osaka, Japan, Cat. # SMK-101) を用いた。EC-SOD 3'UTR、EC-SOD  $\Delta$ 3'UTR または Cu,Zn-SOD 3'UTR の DNA 断片は Table 6 に示すプライマーを用いて増幅させた。それぞれの DNA 断片は、pcDNA3.1 ベクター (Promega, Madison, WI, USA) をもとに作製した pcDNA FLAG vector の EcoRI/EcoRV、EcoRI/EcoRV および EcoRI/BamHI 部位にサブクローニングし、プラスミドを作製した。

Table 6 The conditions of amplification of each gene.

Genes		Sequence (5' to 3')	Cycles	Annealing (s)	Elongation (s)
EC-SOD 3'UTR	sense	TTGAATTCGGCCACCATGCTGGCGCTACTGTGTTC	40	60°C (30)	72°C (60)
	antisense	CCGATATCACTGAATTGCTGAATTTTA			
EC-SOD $\Delta$ 3'UTR	sense	TTGAATTCGGCCACCATGCTGGCGCTACTGTGTTC	12	60°C (30)	68°C (360)
	antisense	CCGATATCCGTCTCCTCTTCGAGTTTCC			
Cu,Zn-SOD 3'UTR	sense	TTGGATCCATGGCGACGAAGGCCGTGTG	40	62°C (30)	72°C (60)
	antisense	CCGAATTCTTATTGGGCGATCCCAATTA			

## 第 12 項 EC-SOD プラスミドのトランスフェクション

THP-1 細胞を 3.5 cm dish に  $2.0 \times 10^6$  cells/dish となるように播種した後、100 nM TPA にて 24 時間処理し細胞を分化させた。その後細胞を PBS で 2 回洗浄し、FCS、ペニシリン/ストレプトマイシンを含まない RPMI1640 を用いた培養条件下、Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 を用いて 2  $\mu$ g のプラスミドをトランスフェクションした。24 時間トランスフェクション後、PBS で 2 回洗浄し、100  $\mu$ g/mL oxLDL と 100  $\mu$ g/mL ActD にて 24 時間処理した。総 RNA の抽出は 1 mL TRIzol<sup>®</sup> 試薬を用いて行った。cDNA 作製には、EC-SOD  $\Delta$ 3'UTR 由来 mRNA 特異的なプライマーとして 5'-CAG AAC TGA GGG TAC ATG CTG CAG AGG AGA AGC TCA AAC G-3'を、上記以外のプラスミド由来 mRNA 特異的なプライマーとして 5'-CAG AAC TGA GGG TAC ATG CTA CTG AAT TGC TGA ATT TTT A-3'を用いた。

## 第 13 項 統計学的解析

データは、それぞれの実験を3回独立して行い、平均 ± 標準誤差として表した。データ解析は、ANOVA および Bonferroni test にて行い、 $p<0.05$  である場合に統計学的に有意であると判断した。

#### 第14項 倫理および法令等の遵守

OxLDL 作製には、岐阜薬科大学生命倫理委員会の承認を得た後、健常人ボランティアより採血した末梢血を使用した。

遺伝子組み換え実験は、岐阜薬科大学バイオセーフティー委員会の承認を得て行った。

### 第3節 結果

#### 第1項 THP-1細胞の分化過程におけるスカベンジャー受容体の発現と細胞内への脂質の取り込み

OxLDLは血管内腔においてマクロファージや血管平滑筋に取り込まれることにより、泡沫細胞の形成を惹起する。一方、oxLDLは細胞表面に存在するSRsに認識され、種々の細胞内シグナルの起点になることが知られている。SRsであるCD36、lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) およびSR-Aの発現は、単球のマクロファージへの分化や血管平滑筋細胞の分化において増大することが報告されており[4,7,8]、THP-1細胞由来マクロファージの泡沫化においても、SRsを介し取り込まれたoxLDLの影響を受けるものと考えられる。まず、TPA誘導性THP-1細胞の分化過程におけるSRs発現の変化を検討した結果、CD36、LOX-1およびSR-Aの発現が有意に増大した (Fig. 7A)。次に、oxLDL曝露によるSRsの発現変動を検討した結果、CD36およびLOX-1の発現がさらに有意に亢進し、SR-Aの発現も亢進する傾向にあった (Fig. 7A)。マクロファージにおいて、SRsに認識されたoxLDLは、細胞内に取り込まれることによって泡沫化を惹起することが報告されている [72,73]。そこで次に、泡沫化の指標として、マクロファージへの脂質の取り込みを検討した。OxLDL曝露後、Oil Red O染色を行った結果、細胞内への脂質の蓄積が認められた (data not shown)。また、細胞内コレステロールアッセイを行った結果、oxLDL曝露72時間後に細胞内への有意な脂質の蓄積が認められた (Fig. 7B)。この結果から、oxLDL曝露により、THP-1細胞由来マクロファージが脂質の取り込みを行っていることが確認された。

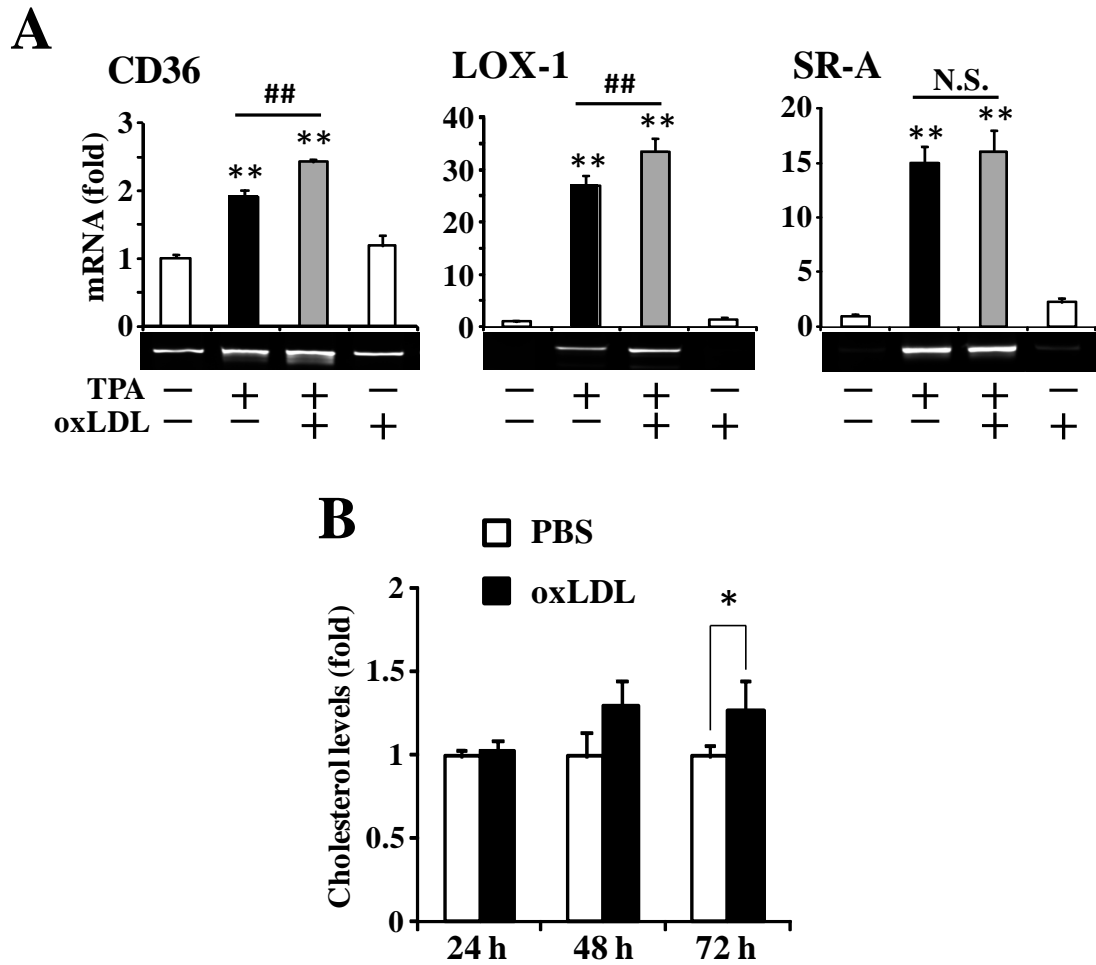


Fig. 7 Expression of SRs during monocytic differentiation and uptake of oxLDL during foam cell formation. THP-1 cells were treated with or without 100 nM TPA for 24 h and then washed twice with PBS (-). (A) After washing, the cells were treated with (+) or without (-) 100  $\mu$ g/mL oxLDL for 24 h. RT-PCR was then carried out. RT-PCR data were normalized using 18S rRNA levels (\*\* $p$ <0.01 vs. untreated cells; ## $p$ <0.01; N.S., not significant). (B) After washing, the cells were treated with or without 100  $\mu$ g/mL oxLDL for the indicated time and then cholesterol levels were detected (\* $p$ <0.05).

## 第2項 THP-1 細胞由来マクロファージへの oxLDL 曝露による CD36 を介した EC-SOD 発現低下

著者は、第1章において単球系細胞株 THP-1 細胞のマクロファージへの分化過程において、EC-SOD 発現が増大することを明らかにした[66]。そこで次に、その oxLDL 曝露による EC-SOD 発現変動を検討した結果、THP-1 細胞の分化過程において増大した EC-SOD 発現がその後の oxLDL 曝露によって曝露時間依存的に低下し、oxLDL 曝露 72 時間後にはコントロールレベルまで低下した (Fig. 8A)。また、この EC-SOD 発現低下が SRs を介しているかを検討するために、SRs に認識されない native LDL (nLDL) を用いて、比較検討を行った。その結果、oxLDL 曝露ではコントロールレベルまで発現が低下したにもかかわらず、nLDL 曝露による EC-SOD 発現低下は中程度であった (Fig. 8B)。また、脂質の取り込みを Oil Red O 染色で検討した結果、nLDL 曝露では脂質の取り込みほとんどが認められなかったのに対し、oxLDL では、その顕著な取り込みが認められた (Fig. 8C)。このことから、oxLDL 曝露による EC-SOD 発現低下は SRs を介して起きることが示唆された。

そこで次に、どの SRs を介するかを検討した。以前の報告から、THP-1 細胞由来マクロファージへのアクロレイン化 LDL の取り込みには、一部 CD36 の関与が報告されていることから[4]、CD36 を siRNA を用いてノックダウンし (Fig. 8D)、oxLDL 曝露による EC-SOD 発現低下に対する CD36 の関与を検討した。その結果、CD36 のノックダウンにより、negative control (NC) 群と比較し、oxLDL 曝露による EC-SOD 発現低下が有意に抑制された (Fig. 8E)。

以上の結果から、THP-1 細胞由来マクロファージへ oxLDL を曝露した場合、部分的に CD36 を介して oxLDL が取り込まれ EC-SOD 発現が低下することが示唆された。

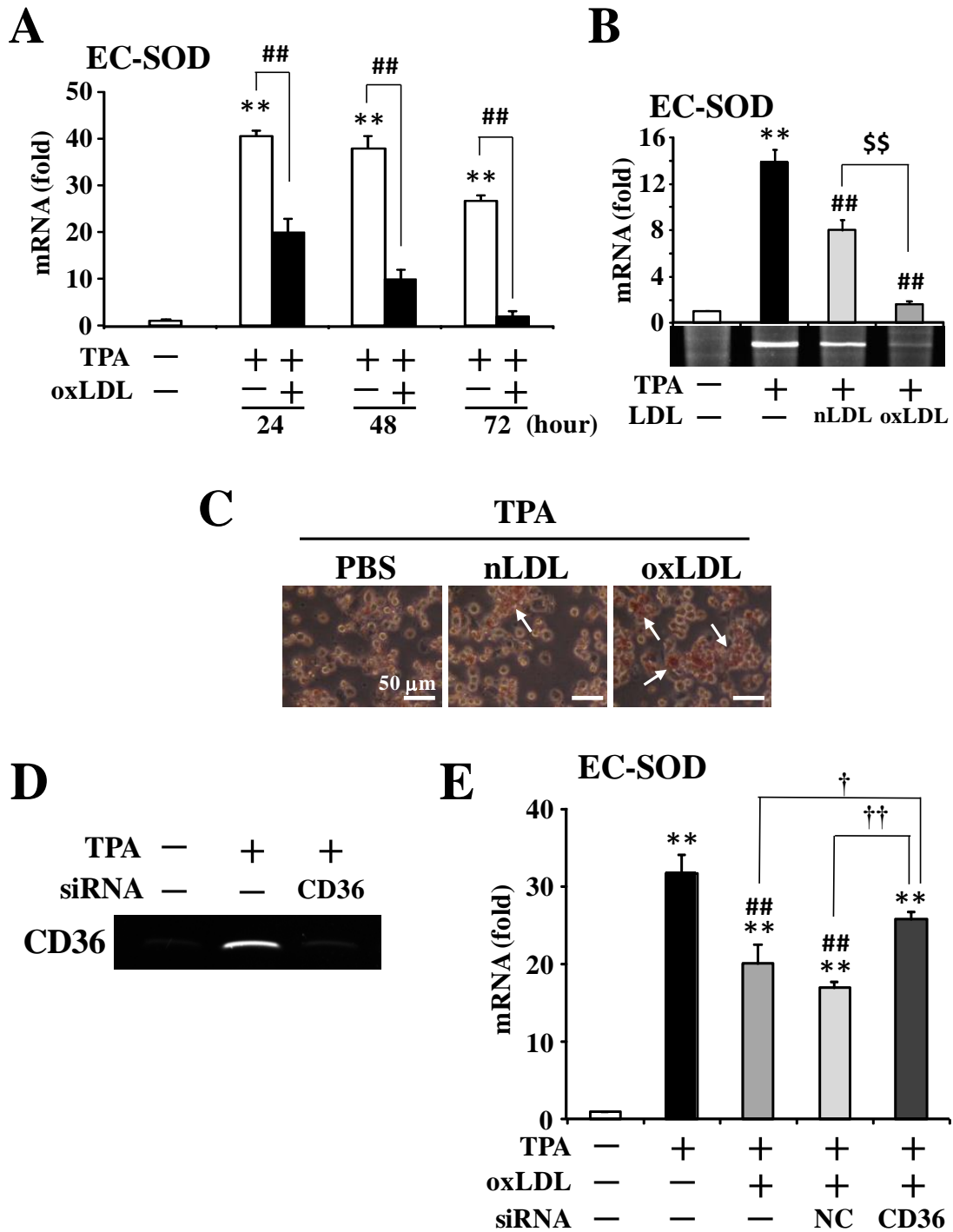


Fig. 8 Change of EC-SOD expression during foam cell formation. THP-1 cells were treated with or without 100 nM TPA for 24 h and then washed twice with PBS (-). (A and B) After washing, the cells were treated with (+) or without (-) 100  $\mu$ g/mL oxLDL for the indicated time (A) and were treated with or without 100  $\mu$ g/mL native LDL (nLDL) or 100  $\mu$ g/mL oxLDL 72 h (B). RT-PCR was then carried out. (C) After

washing, the cells were treated with 100 µg/mL nLDL or oxLDL for 72h, followed by Oil Red O staining (arrows show lipid uptake). (D) The cells were treated with 30 nM CD36 siRNA for 48 h, and CD36 expression was determined by RT-PCR. (E) The cells were treated with 30 nM CD36 siRNA or negative control (NC) for 48 h. After the cells were treated with siRNA for 48 h and washed twice with PBS, the cells were treated with 100 µg/mL oxLDL for 24 h. RT-PCR was then carried out (E). RT-PCR data were normalized using 18S rRNA levels (\*\* $p < 0.01$  vs. untreated cells; ## $p < 0.01$  vs. oxLDL-untreated cells; \$\$ $p < 0.01$  vs. nLDL-treated cells; † $p < 0.05$ , †† $p < 0.01$ ; N.S., not significant).

### 第3項 OxLDL 曝露による EC-SOD 発現低下へのヒストンアセチル化の影響

ヒストン修飾には、ヒストンアセチル化、メチル化およびリン酸化が知られており、エピジェネティックな遺伝子発現調節に大きく関与している[67,68]。以前、著者らは、THP-1 細胞の分化過程において、EC-SOD 発現がヒストンのアセチル化により制御されることを報告した[60]。そこで次に、oxLDL 曝露によるヒストンアセチル化と *EC-SOD* 遺伝子プロモーター領域付近におけるヒストンアセチル化レベルの変動を検討した。その結果、THP-1 細胞のマクロファージへの分化過程において、ヒストン H3 および H4 のアセチル化が認められた (Fig. 9A)。その後、oxLDL を曝露したが、ヒストンアセチル化レベルに変化は認められなかった (Fig. 9A)。また、*EC-SOD* 遺伝子プロモーター付近におけるヒストンアセチル化レベルを検討したところ、グローバルなヒストンアセチル化同様、有意な変化は認められなかった (Fig. 9B)。

以上の結果から、oxLDL 曝露による EC-SOD 発現低下はヒストン H3 および H4 のアセチル化レベルの変化によるものではないことが示唆された。



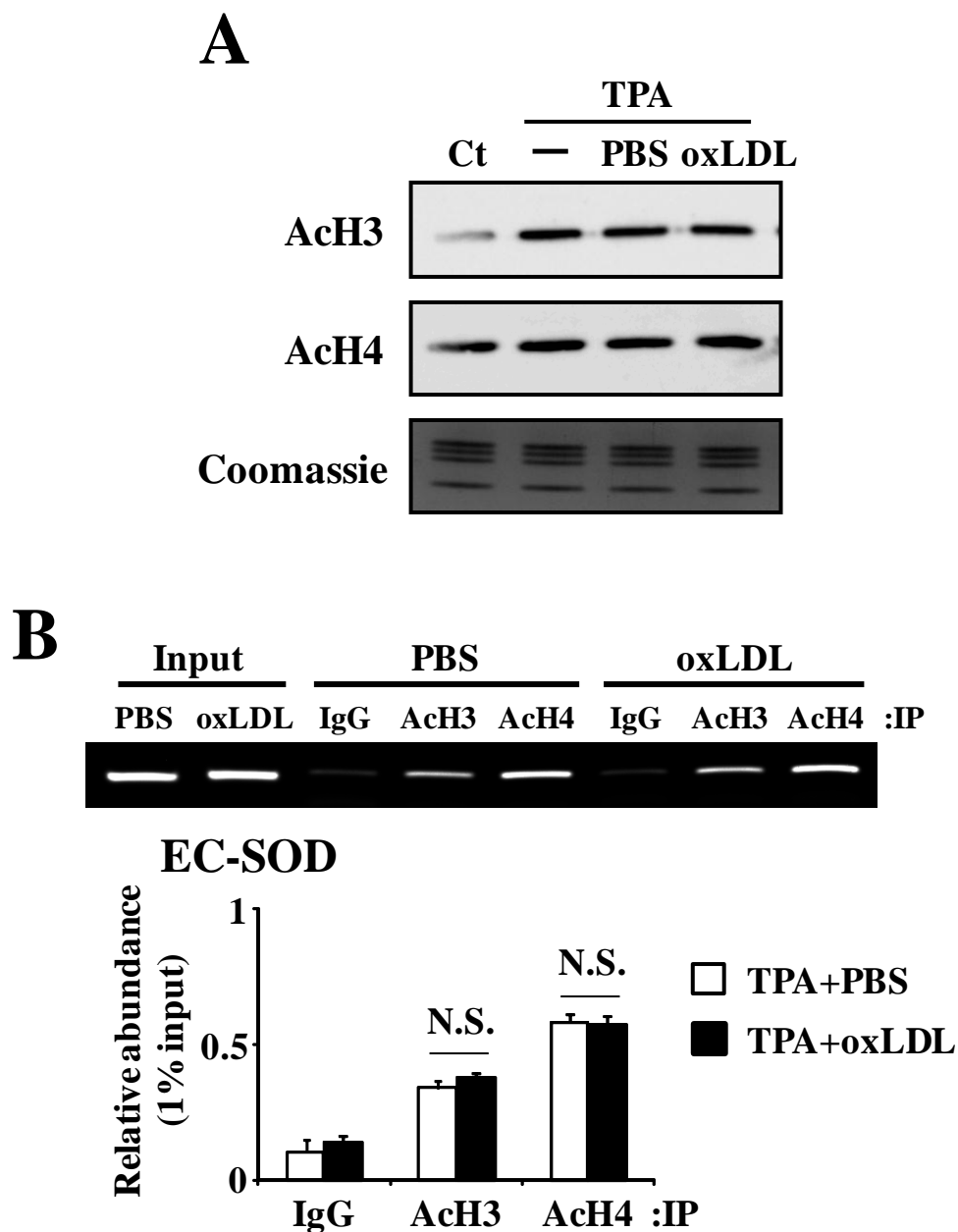


Fig. 9 No involvement of the acetylation of histone H3 or H4 in the expression of EC-SOD during foam cell formation. (A and B) THP-1 cells were treated with 100 nM TPA for 24 h and were then washed twice with PBS (-). After washing, the cells were treated with or without 100  $\mu$ g/mL oxLDL for 24 h. (A) After the treatment, acetylated histone H3 and H4 were determined by Western blotting. The loading of histone was monitored by Coomassie staining. (B) A ChIP assay was then carried out. Relative binding to the promoter region was expressed as the percentage amount over input (%) (N.S., not significant).

#### 第4項 OxLDL 曝露による EC-SOD 発現低下への Sp1 および Sp3 の関与

転写因子である Sp1 や Sp3 は、*EC-SOD* 遺伝子プロモーターの-195/-210 の領域に結合し、*EC-SOD* の発現に大きく関与することが報告されている[50,69,74]。そこで次に、oxLDL 曝露による *EC-SOD* 発現低下への Sp1 および Sp3 の関与を検討した。THP-1 細胞由来マクロファージを oxLDL に曝露させたが、*EC-SOD* プロモーター領域への Sp1 および Sp3 の結合に変化は認められなかった (Fig. 10)。

以上の結果から、oxLDL 曝露による *EC-SOD* 発現低下は転写因子 Sp1 および Sp3 の *EC-SOD* プロモーター領域への結合の変化によるものではないことが示唆された。

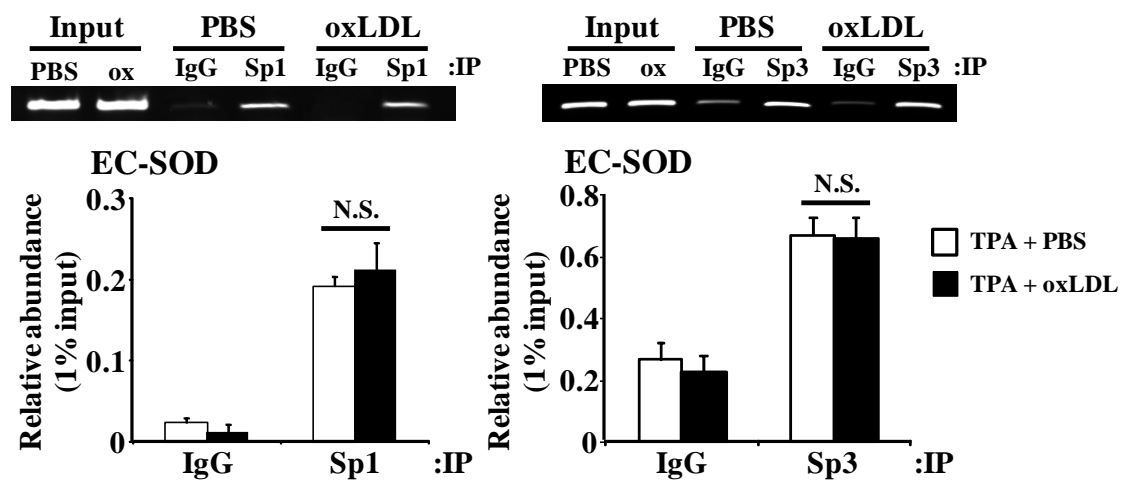


Fig. 10 No involvement of Sp1/3 in the expression of *EC-SOD* during foam cell formation. THP-1 cells were treated with 100 nM TPA for 24 h and were then washed twice with PBS (-). After washing, the cells were treated with or without 100  $\mu$ g/mL oxLDL (ox) for 24 h. A ChIP assay was then performed. Relative binding to the promoter region was expressed as the percentage amount over input (%) (N.S., not significant).

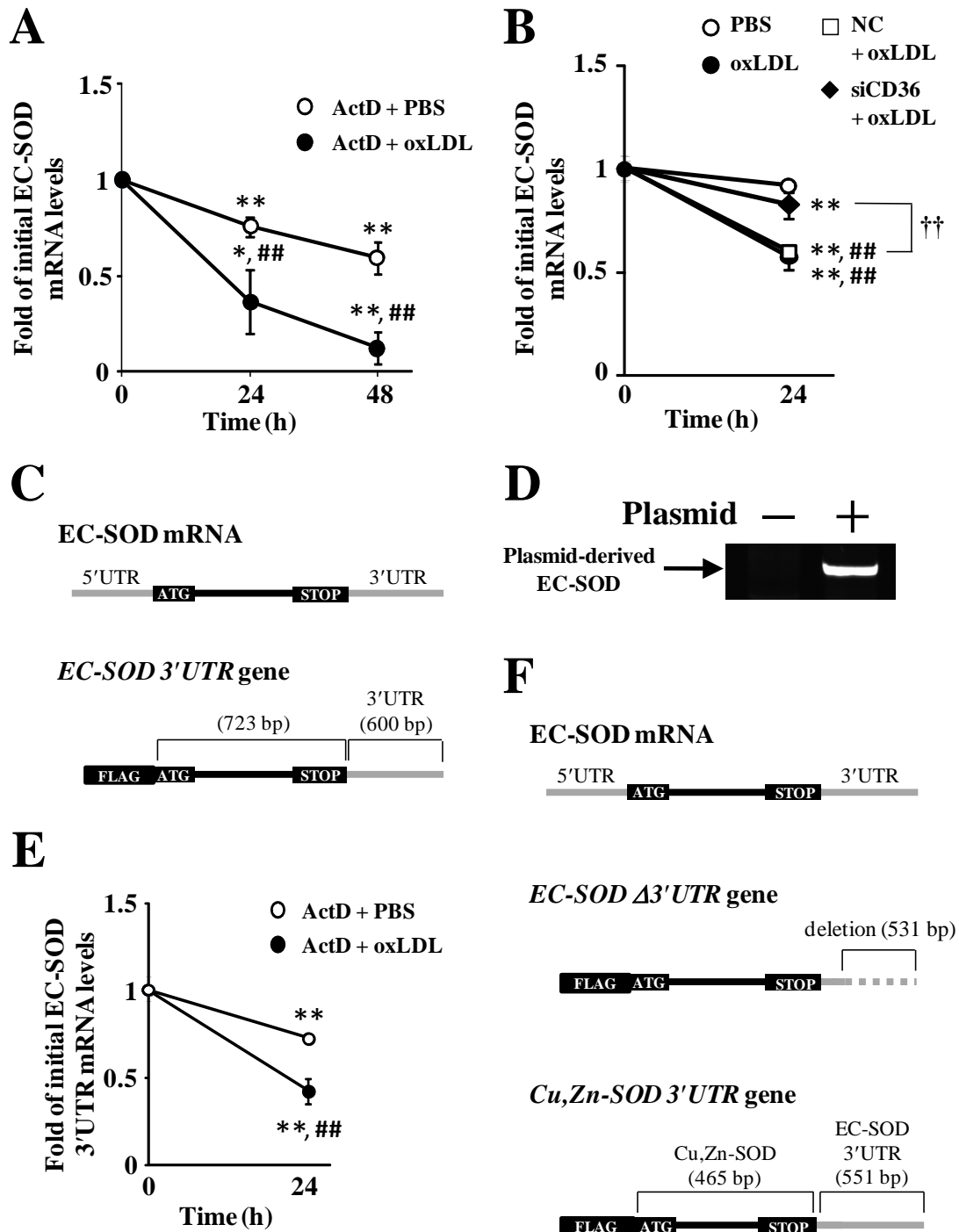
## 第5項 EC-SOD mRNA の安定性に対する oxLDL 曝露の影響

Fig. 9 および Fig. 10 の結果から、oxLDL 曝露による EC-SOD レベルの低下に転写段階での影響は認められなかった。そこで次に、EC-SOD mRNA の安定性に着目し、oxLDL 曝露により EC-SOD mRNA レベルが低下する可能性を検討した。まず、転写阻害剤である ActD を用いて、EC-SOD mRNA の安定性を評価した結果、oxLDL 曝露群では oxLDL 非曝露群と比較し、EC-SOD mRNA レベルが時間依存的に有意に低下した (Fig. 11A)。さらに、SRs である CD36 を siRNA を用いてノックダウンさせることにより、oxLDL 曝露による EC-SOD レベルの低下が有意に抑制された (Fig. 11B)。次に、*EC-SOD* 遺伝子の翻訳領域と 3'側非翻訳領域 3'UTR を含む *EC-SOD 3'UTR* 遺伝子を作製し (Fig. 11C および D)、THP-1 細胞由来マクロファージにプラスミドをトランスフェクションした後、oxLDL を曝露し、*EC-SOD 3'UTR* 遺伝子に由来する mRNA の安定性を検討した結果、oxLDL 曝露群では非曝露群と比較し、mRNA の安定性が有意に低下した (Fig. 11E)。したがって、oxLDL は EC-SOD mRNA の分解を促進している可能性が示唆された。

一般的に、mRNA の分解は、3'UTR のポリ A 鎖の分解から始まることが知られている [75,76]。mRNA の 3'UTR には、mRNA の安定性を制御する配列が存在しており、そのシスエレメントの配列によって、mRNA の安定性が大きく変化することが報告されている [75,76]。また、ポリ A 鎖の分解が、mRNA 分解の律速段階となっているため、著者は、3'UTR に EC-SOD mRNA の分解に関わる配列があると考えた。そこで次に、先ほどの *EC-SOD 3'UTR* 遺伝子の 3'UTR を欠損させた遺伝子 (*EC-SOD Δ3'UTR* 遺伝子、Fig. 11F) を作製し、oxLDL 曝露による EC-SOD Δ3'UTR mRNA の安定性低下への 3'UTR の関与を検討した。その結果、oxLDL 曝露による EC-SOD mRNA の安定性低下が抑制され、oxLDL 非曝露

群と mRNA レベルに差は認められなかった (Fig. 11G)。したがって、oxLDL 曝露による EC-SOD mRNA の安定性低下には、3'UTR が関与していることが示唆された。また、3'UTR の関与をさらに検討するために、SOD アイソザイムの一つである *Cu,Zn-SOD* 遺伝子の翻訳領域に *EC-SOD* 遺伝子の 3'UTR を挿入し、*Cu,Zn-SOD 3'UTR* 遺伝子 (Fig. 11F) を作製した。このプラスミドをトランスフェクション後、oxLDL 曝露による *Cu,Zn-SOD 3'UTR* 遺伝子由来 mRNA の安定性を検討したところ、oxLDL 曝露群では非曝露群と比較し、mRNA レベルが有意に低下した (Fig. 11H)。この結果から、oxLDL 曝露による EC-SOD mRNA の安定性低下に 3'UTR の関与が確認された。

以上の結果から、oxLDL 曝露による EC-SOD 発現低下は、mRNA の安定性低下に起因するものであり、その安定性低下には 3'UTR が大きく関与することが示唆された。



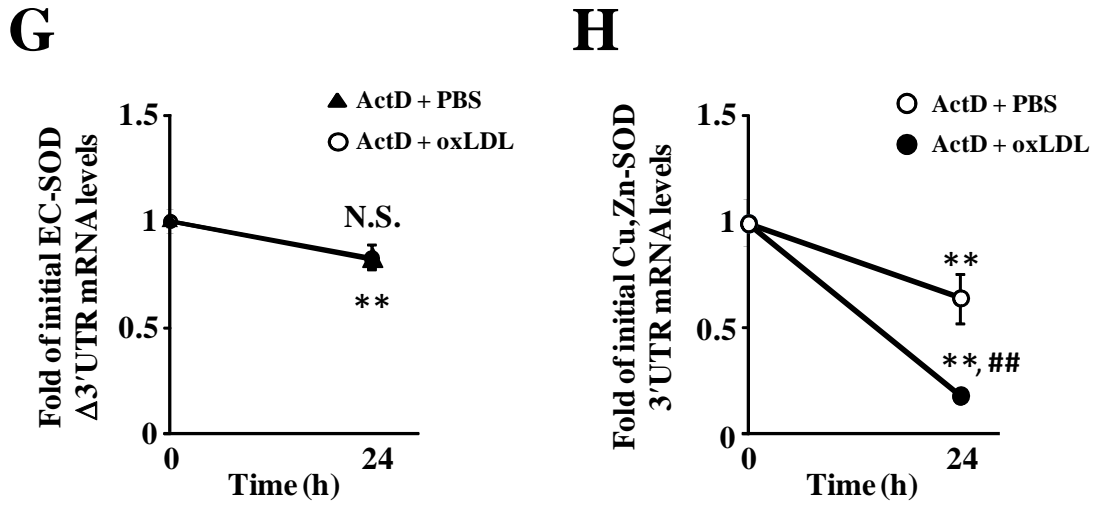


Fig. 11 Destabilization of EC-SOD mRNA by oxLDL and involvement of 3'UTR in the stability of EC-SOD. (A) THP-1 cells were treated with 100 nM TPA for 24 h and were then washed twice with PBS (-). After washing, the cells were treated with 100 ng/mL ActD in the presence or absence of 100  $\mu$ g/mL oxLDL for the indicated time. (B) After the cells had been treated with TPA, CD36 siRNA (siCD36) and negative control (NC) were transfected in THP-1-derived macrophages. After the cells were washed twice with PBS, cells were treated with 100 ng/mL ActD in the presence or absence of 100  $\mu$ g/mL oxLDL for 24 h. RT-PCR was then carried out. (C) Construction of the plasmid (*EC-SOD* 3'UTR gene). (D and E) After THP-1 cells had been treated with 100 nM TPA for 24 h, they were transfected with the plasmid for 24 h and RT-PCR was carried out (D). After being transfected, the cells were treated with 100 ng/mL ActD in the presence or absence of 100  $\mu$ g/mL oxLDL for 24 h (E). (F) Construction of the plasmid (*EC-SOD*  $\Delta$ 3'UTR gene, *Cu,Zn-SOD* 3'UTR gene). (G and H) THP-1 cells were treated with 100 nM TPA for 24 h and were then washed twice with PBS (-). After washing, the cells were transfected with the plasmid *EC-SOD*  $\Delta$ 3'UTR gene (G) or *Cu,Zn-SOD* 3'UTR gene (H), respectively and then treated with 100 ng/mL ActD in the presence or absence of 100  $\mu$ g/mL oxLDL for 24 h. RT-PCR data were normalized using 18S rRNA levels (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 vs. 0 h; ## $p$ <0.01 vs. oxLDL-untreated cells; †† $p$ <0.01; N.S., not significant).

## 第4節 考察

単球系細胞由来マクロファージの血管内腔への浸潤が動脈硬化症の発症・進展に大きく関与しており、ROS 産生の亢進とともに、CD ファミリーや炎症性サイトカインの発現増大が認められている[19,66]。また、マクロファージは SRs を介して oxLDL を取り込み、泡沫化することで、プラーク形成を促進していることが報告されている[2,77]。

EC-SOD は、反応性の高いスーパーオキシドを消去する主要な抗酸化酵素の一つであり、動脈硬化症を始めとする冠血管系疾患の発症を抑制することが知られている[22,39,47,70]。当研究室では、マウス 3T3-L1 分化脂肪細胞およびアフリカミドリザル由来 COS7 細胞において、酸化ストレス、小胞体ストレスおよび低酸素などの種々のストレスにより、EC-SOD 発現が Cu,Zn-SOD や Mn-SOD の発現に比べ大きく変動すること報告しており、さらに EC-SOD 発現変動が多くシグナル経路により制御されていることを明らかにしてきた[40,52]。したがって、EC-SOD は病態形成過程において、種々のストレスによって発現変動を受けやすい遺伝子であると考えられる。

OxLDL は、マクロファージにおいてコレステロールの細胞内への蓄積および炎症性サイトカインの発現などを促進させることが報告されており、この現象が慢性的に起きることにより、動脈硬化巣の形成が促進され心筋梗塞の発症リスクの増大に繋がると考えられている[61,78]。それゆえ本章では、ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞由来マクロファージを用いて、第1章で述べた単球のマクロファージへの分化過程において増大した EC-SOD レベルに対する oxLDL の影響を評価した。THP-1 細胞の分化過程における EC-SOD 発現増大は、ROS 産生による酸化ストレスから細胞を防御する働きがあると考えられ、EC-SOD 発現の維持

は、動脈硬化症の発症・進展予防に大きく貢献すると考えられる。本研究では、THP-1 細胞由来マクロファージに oxLDL を曝露することにより、EC-SOD mRNA レベルが時間依存的に低下することを見出した (Fig. 8A)。さらに、単球の分化過程およびマクロファージの泡沫化過程で増大するスカベンジャー受容体 CD36 が、oxLDL 曝露による EC-SOD 低下に関与することを見出した (Fig. 7A おとび 8E)。この CD36 を含む種々のスカベンジャー受容体への oxLDL の結合により、インターロイキン (interleukin、IL)-10、TNF- $\alpha$ 、IL-8 などのサイトカインの発現および分泌が調節されていることが報告されている[79,80]。さらに、nLDL と比較して、oxLDL は種々のスカベンジャー受容体を介して際限なく細胞に取り込まれ、nLDL 以上に動脈硬化症の発症に大きく影響することが報告されている。実際、本研究においても、nLDL 曝露では中程度の EC-SOD mRNA 低下および脂質の取り込みが認められたのに対し、oxLDL 曝露では、大きく EC-SOD mRNA レベルが低下し、脂質の取り込みも nLDL 曝露群と比較し多く認められた (Fig. 8B および C)。このことから、oxLDL 曝露による EC-SOD mRNA 低下には、oxLDL 認識受容体のうち CD36 の関与が大きいことが示唆された。

著者らは以前、EC-SOD 発現が、DNA のメチル化またはヒストン H3 および H4 のアセチル化などのエピジェネティクスの制御を受けることを報告した[60]。そこで、本研究では、oxLDL 曝露による EC-SOD 減少へのヒストン H3 および H4 のアセチル化の関与を検討したが、ヒストンアセチル化レベルには oxLDL 処理の影響は認められなかった (Fig. 9)。また、以前の報告より、Sp1 および Sp3 は、多くの遺伝子のプロモーターに存在する GC リッチな配列に結合する転写因子として知られている。ヒトの *EC-SOD* プロモーター領域には、一般的な遺伝子に認められる TATA ボックスが存在せず、代わりに CAAT ボックス配列が 2 か所存在する。これら EC-SOD などの遺伝子には、転写開始点の上流に Sp1/Sp3



結合領域が存在し、Sp1/Sp3 が TATA ボックス結合タンパク質 (TATA box binding protein、TBP) や RNA ポリメラーゼの他の構成要素と直接的に相互作用することで転写を活性化していることが知られている[81,82]。そこで、著者は、*EC-SOD* プロモーターへの Sp1 および Sp3 の結合の oxLDL 曝露による変動を ChIP 法にて検討したが、その結合度に変化は認められなかった (Fig. 10)。これらヒストンアセチル化および Sp1/Sp3 結合の結果から、oxLDL 曝露による *EC-SOD* 発現低下は転写レベルで制御されているのではなく、その他の要因があると考えられた。

そこで著者は、*EC-SOD* mRNA の安定性に着目した。*EC-SOD* mRNA の 3'UTR には GC リッチな配列が多く認められ、この配列が mRNA を安定化させていると考えられる。実際、TPA 処理にて増大した *EC-SOD* mRNA は、TPA 除去 72 時間後まで安定して発現している (Fig. 8A)。しかしながら、oxLDL に曝露した場合、*EC-SOD* mRNA レベルは oxLDL 非曝露群と比較して有意に低下し、曝露 72 時間後にはコントロールレベルにまで低下した。また、Fig. 11A および B に示すように、ActD 処理の後、oxLDL 曝露による *EC-SOD* mRNA が有意に低下し、その減少は CD36 をノックダウンすることにより抑制された結果から、CD36 を介して取り込まれた oxLDL が *EC-SOD* mRNA の安定性低下をもたらすと考えられた。

そこで次に、*EC-SOD* mRNA 安定性低下の要因を検討した。前述したとおり、*EC-SOD* mRNA は定常状態では安定性が高く、その要因として、3'UTR に GC リッチな配列が含まれている点が挙げられる。本研究では、3'UTR を欠損させた *EC-SOD* プラスミドを作製して検討したところ、3'UTR が *EC-SOD* mRNA の安定性に大きく関与していることを見出した (Fig. 11C、D、E、F、G および H)。したがって、oxLDL 曝露による *EC-SOD* 発現減少は、転写レベルでの変化では

なく、mRNA の分解促進に起因することが示唆された。

以上本章では、EC-SOD レベルに対する oxLDL の抑制作用が動脈硬化症の病態形成に大きく関与する可能性を示した。EC-SOD 発現低下が種々の病態に関与すると考えられるため、oxLDL 曝露による細胞内シグナル機構についてのさらに詳細な研究を進める必要がある。

## 第3章 ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞の分化に対するルテオリンの抑制効果

### 第1節 緒言

単球のマクロファージへの分化過程において、分化マーカーである CD ファミリー CD11b、CD14 および CD36 の発現増大が認められ、マクロファージが oxLDL やアポトーシス細胞などを取り込むことが、動脈硬化症の発症・進展に繋がると報告されている[83-85]。また、動脈硬化症においては、CD ファミリーの発現が亢進していると同時に、多量の細胞内および細胞外 ROS 産生が亢進していることが知られている[86,87]。そのため、単球のマクロファージへの分化や ROS 産生亢進を抑制することが、動脈硬化症の発症の予防に繋がると考えられる。

単球系細胞株である U937、THP-1 および HL60 細胞は、ホルボールエステルである TPA や ATRA 処理により、マクロファージに分化することが知られている [38,41,58]。単球の分化過程において、NOX の活性化により ROS が過剰産生され、酸化ストレスが引き起こされるため、これによって、細胞内シグナルや酵素活性の阻害などを介して細胞および組織の恒常性が破綻することが、病態の発症・進展を招いていると考えられる[10,11]。

近年、食品などから得られる天然由来化合物フラボノイドが生活習慣病の予防活性をもつとして注目されている。フラボノイドは多くの植物に含まれる色素成分であり、ポリフェノールの一つとして知られている。最近では、サプリメントとしても摂取でき、その抗酸化力が強いことから健康維持や疾病予防への有用性が注目されている [91,92]。その中でも、ルテオリンはシソやエゴマな

どに多く含まれるフラボノイドの一種であり、今までに抗酸化作用、抗炎症作用、抗がん作用や抗アレルギー作用など多くの薬理学的作用が報告されている[25-29]。また、その抗酸化・抗炎症作用の強さから、動脈硬化症を始めとする血管系疾患の予防および治療に向けての有用性が期待されている[88,89]。

そこで本研究では、ルテオリンの有用性を評価するため、ルテオリンならびにその類似化合物であるクリシン、アピゲニンおよびトリセチンを用いて、THP-1 細胞の分化に対する抑制効果を構造活性相関という観点から検討した。

## 第2節 実験材料及び方法

### 第1項 試薬

ルテオリン (Luteolin、>98.0%) は和光純薬工業株式会社、クリシン (Chrysin、>98.0%) は Cosmobio 社から購入した。アピゲニン (Apigenin)、トリセチン (Tricetin) は岐阜大学工学部生命機能材料工学科、瀬瀬守教授より供与された [90]。これら2種類の化合物の純度は、HPLC を用いて 95%以上であることが確認されている。4種類のフラボノイドは、2-phenylchromen-4-one を基本骨格 (フラボン骨格) とし、A 環を含む構造が同じであるが、B 環に付加しているヒドロキシ基の数の違いで、それぞれルテオリン、クリシン、アピゲニンおよびトリセチンと命名されている (Fig. 12)。

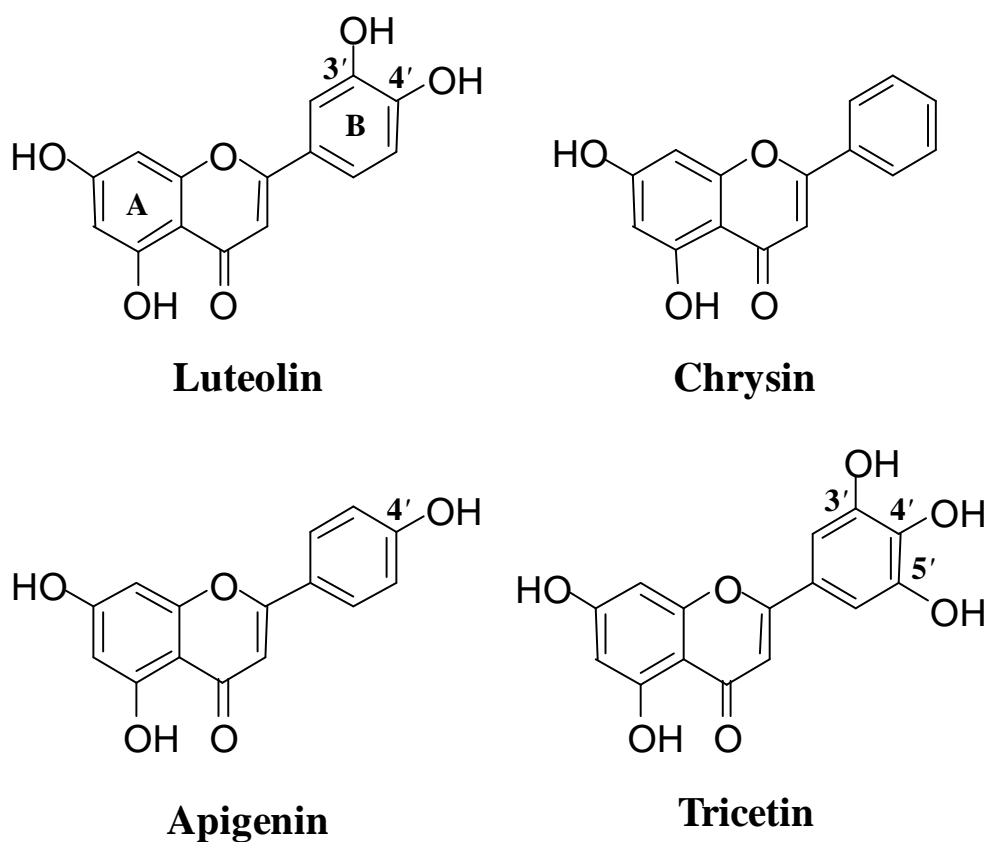


Fig. 12 The structure of four flavonoids, luteolin, chrysin, apigenin and tricetin.

その他の試薬は第 1 章、第 2 節、第 1 項および第 2 章、第 2 節、第 1 項に示しており、市販の特級品を用いた。

## 第 2 項 細胞培養

第 1 章、第 2 節、第 2 項で示す方法で THP-1 細胞を播種した後、20  $\mu$ M の各種フラボノイドおよび 100 nM TPA を添加した。刺激後、細胞を掻き取り、PBS で洗浄した後、総 RNA の抽出、フローサイトメトリー、ウエスタンブロッティングを行った。20  $\mu$ M ルテオリン、クリシン、アピゲニンおよびトリセチンは TPA 添加の 1 時間前に添加した。

## 第 3 項 RT-PCR

第 1 章、第 2 節、第 3 項で示す方法で cDNA 作製した後、Table 3 ならびに第 2 章、第 2 節、第 6 項の Table 4 で示す条件で PCR 反応を行った。

## 第 4 項 ウエスタンブロッティング

種々の条件で THP-1 細胞を処理した後、第 1 章、第 2 節、第 4 項に示す方法で各種タンパクを検出した。

## 第 5 項 細胞接着の観察

THP-1 細胞を 3.5 cm dish に播種した後、第 1 章、第 2 節、第 2 項に示す方法で細胞を処理した。分化後、氷冷した PBS で細胞を 3 回洗浄した。THP-1 細胞の dish への接着は光学顕微鏡にて観察した。

## 第 6 項 細胞内 ROS の産生量の測定

種々の条件で THP-1 細胞を処理した後、第 1 章、第 2 節、第 5 項で示す方法で細胞内 ROS 産生を測定した。

## 第 7 項 統計学的解析

データは、それぞれの実験を 3 回独立して行い、平均  $\pm$  標準誤差として表した。データ解析は、ANOVA および Bonferroni test にて行い、 $p < 0.05$  である場合に統計学的に有意であると判断した。

### 第3節 結果

#### 第1項 TPA 処理による THP-1 細胞の分化に対するフラボノイドの抑制効果

まず、TPA 処理による THP-1 細胞の分化に対するフラボノイドの抑制効果を検討した。TPA 処理による THP-1 細胞の分化に対するルテオリンの効果を検討した結果、20  $\mu$ M ルテオリン前処理により TPA 処理による CD11b、CD14、CD36 mRNA 発現増大がコントロールレベルにまで抑制された。一方、0.2 および 2  $\mu$ M ルテオリンの前処理では、TPA 処理による CD ファミリー mRNA 発現増大への影響は認められなかった (Fig. 13A)。次に、TPA 処理による THP-1 細胞の細胞接着に対する各種フラボノイドの抑制効果を検討した。THP-1 細胞を TPA にて処理することにより細胞接着が認められたが、20  $\mu$ M のクリシン、アピゲニンおよびルテオリンにて前処理することにより、細胞接着は抑制された (Fig. 13B)。一方、トリセチンにて前処理した場合は、TPA 処理による細胞接着の増大が観察された (Fig. 13B)。さらに、TPA 処理による CD ファミリー発現増大に対するフラボノイドの抑制効果を検討した結果、クリシンおよびアピゲニンの前処理では、それぞれ CD11b および CD14 発現増大を抑制したが、トリセチンの前処理では抑制効果が認められなかった。一方、ルテオリンの前処理では、すべての CD ファミリー発現増大が抑制された (Fig. 13C)。また、TPA 処理による細胞接着と CD ファミリー発現増大に対するフラボノイドの抑制効果がほぼ相関することが確認された (Fig. 13B および C)。以上のことから、ルテオリン、クリシン、アピゲニンは TPA 処理による接着因子 CD ファミリーの発現増大に対する抑制作用を介して THP-1 細胞の細胞接着を抑制することが示唆された。



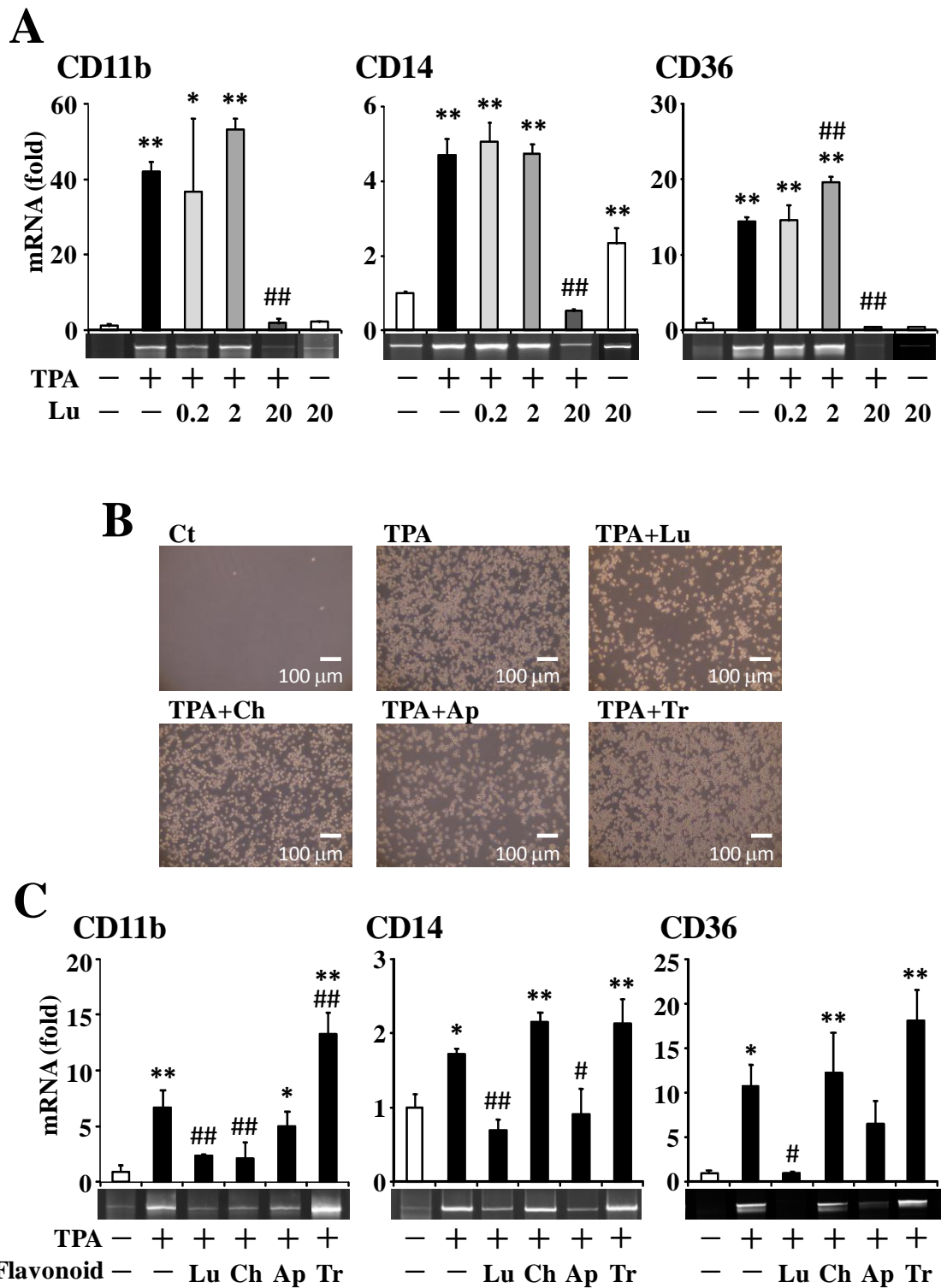


Fig. 13 Effect of flavonoids on the TPA-triggered induction of CD families and cell adhesion. (A) THP-1 cells were pretreated with 0.2, 2 or 20  $\mu$ M luteolin (Lu) for 1 h and then treated with (+) or without (-) 100 nM TPA for 24 h. (B) Cells were pretreated

with or without 20  $\mu$ M chrysin (Ch), apigenin (Ap), luteolin (Lu) and tricetin (Tr) for 1 h and then treated with or without 100 nM TPA for 24 h. After the cells had been treated, cell adhesion was detected using a microscope. (C) Cells were pretreated with 20  $\mu$ M Lu, Ch, Ap or Tr for 1 h and then treated with (+) or without (-) 100 nM TPA for 24 h. After the cells had been treated, RT-PCR was carried out. Data were normalized using 18S rRNA levels (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 vs. untreated cells, # $p$ <0.05, ## $p$ <0.01 vs. TPA-treated cells).

## 第2項 TPA 処理による ERK1/2 のリン酸化に対するルテオリンの抑制効果

著者は、第1章において THP-1 細胞を TPA 処理することにより認められる ERK1/2 リン酸化の亢進や CD ファミリーの発現亢進が、THP-1 細胞のマクロファージ様細胞への分化に関与することを明らかにした[66]。そこで、次に MEK1/2 および ERK1/2 のリン酸化に対するルテオリンの抑制作用をウェスタンブロッティングにて検討したが、ルテオリンの前処理は、MEK1/2 および ERK1/2 のリン酸化に影響を与えなかった (Fig. 14)。したがって、ルテオリンは MEK1/2 および ERK1/2 の下流のシグナルを抑制することが示唆された。

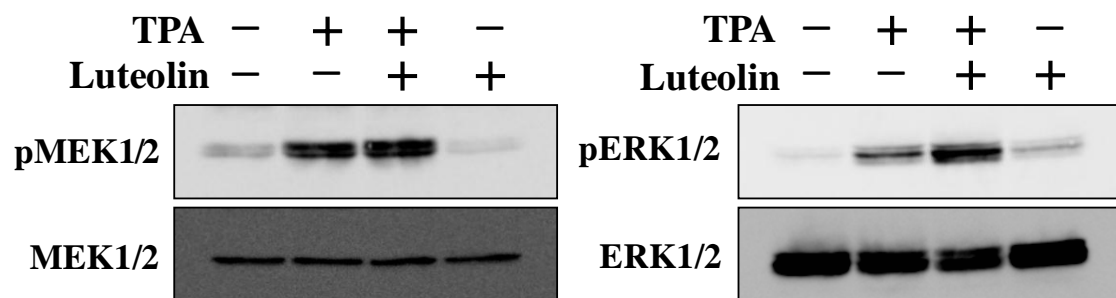


Fig. 14 Effect of luteolin on TPA-triggered MEK1/2 and ERK1/2 phosphorylation. THP-1 cells were pretreated with (+) or without (-) 20  $\mu$ M luteolin for 1 h and then treated with (+) or without (-) 100 nM TPA for 15 min. After the cells had been treated, phosphorylated and total MEK1/2 or ERK1/2 levels were determined by Western blotting.

### 第3項 TPA 処理による細胞内 ROS 産生および p47<sup>phox</sup> の膜移行に対するルテオリンの抑制効果

NOX2 は、好中球およびマクロファージに多く発現しており、反応性の高いスーパーオキシドを産生することで、外来の細菌やウイルスから生体を防御している[93]。また、セカンドメッセンジャーなどの細胞内シグナル分子としても機能し、生体の恒常性維持にも大きく関与している[94-96]。

そこで次に、第1章で示した TPA 処理による CD ファミリー発現増大への NOX2 由来 ROS の関与についての知見から[66]、NOX2 活性化に対するルテオリンの抑制効果を検討した。初めに、細胞内 ROS 産生に対するルテオリンの抑制効果をフローサイトメトリーにて検討した結果、ルテオリンの前処理により TPA 処理による細胞内 ROS 産生亢進が有意に抑制された (Fig. 15A)。次に、NOX2 mRNA 発現を RT-PCR 法にて検討したところ、TPA 処理による NOX2 発現増大がルテオリンの前処理によりコントロールレベルまで有意に抑制された (Fig. 15B)。一方で、TPA 処理による THP-1 細胞の細胞接着および CD ファミリー発現に対して抑制作用を示さなかったトリセチンの前処理では、TPA 処理による NOX2 発現増大に対する抑制効果は認められなかった (Fig. 15B)。さらに、NOX2 の活性化に必須の p47<sup>phox</sup> の膜移行をウェスタンブロッティング法にて検討したところ、ルテオリンの前処理により、TPA 処理による p47<sup>phox</sup> の膜移行が抑制されたが、トリセチンを前処理では、その抑制効果は認められなかった (Fig. 15C)。

以上のことから、ルテオリンは NOX2 mRNA 発現および p47<sup>phox</sup> の膜移行に起因する NOX2 活性化を抑制することにより、CD ファミリーの発現を抑制していることが示唆された。

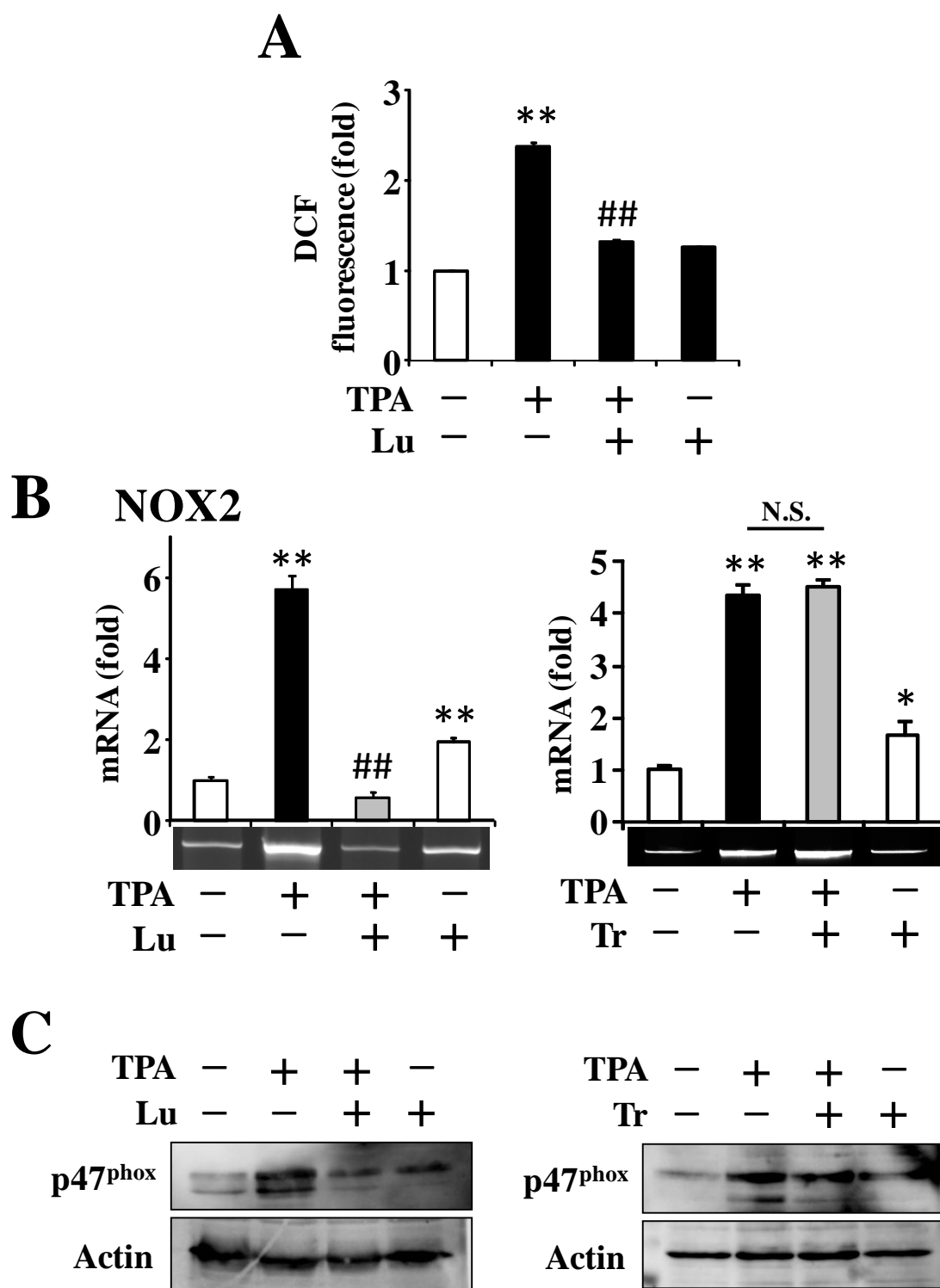


Fig. 15 Effect of luteolin (Lu) on TPA-triggered ROS generation and NOX2 activation. (A) THP-1 cells were pretreated with (+) or without (-) 20  $\mu$ M Lu for 1 h and then treated with (+) or without (-) 100 nM TPA for 24 h. After the cells had been treated,

intracellular ROS accumulation was measured by flow cytometry (\*\* $p < 0.01$  vs. untreated cells, ## $p < 0.01$  vs. TPA-treated cells). (B and C) The cells were pretreated with (+) or without (-) 20  $\mu$ M Lu or Tr for 1 h and then treated with (+) or without (-) 100 nM TPA for (B) 24 h or (C) 12h. (B) After the cells had been treated, NOX2 expression was measured by RT-PCR. RT-PCR data were normalized using 18S rRNA (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. untreated cells, ## $p < 0.01$  vs. TPA-treated cells, N.S., not significant). (C) After the cells had been treated, the membrane translocation of p47<sup>phox</sup> was determined by Western blotting.

## 第4節 考察

血液中の単球は、血管内皮細胞などから分泌される MCP-1 などにより、血管内皮細胞に誘引、接着し、IL-4、IL-13 およびインターフェロン- $\gamma$ などのサイトカインの刺激によりマクロファージに分化することが知られている[97]。そのマクロファージには、細菌やウイルスを認識する受容体が多く発現し、自然免疫として機能すると同時に、生体内の異物を取り込むことによって、生体のホメオスタシス維持に働くことが知られている[98]。一方で、oxLDL などの陰性荷電を有するタンパク質を認識する CD36、LOX-1 や SR-A などの SRs の発現が多く認められ、oxLDL などの修飾 LDL を際限なく取り込むことにより泡沫化することが知られている[99]。したがって、動脈硬化症の発症初期に認められる単球のマクロファージへの分化を抑制することは、その発症・進展を予防できると考えられる。

単球のマクロファージへの分化過程において、CD ファミリー (CD11b、CD14、CD36) の発現増大が認められるが、TPA 処理によっても CD ファミリーの発現を伴った分化および接着が認められる[38,41,58]。第1章において CD ファミリーのタンパク発現および mRNA 発現レベルが亢進することを示したが、実際、本章においても、THP-1 細胞由来マクロファージの接着が認められた (Fig. 13B)。このことから、TPA により、単球のマクロファージへの分化が誘導され、病態形成に大きく関与することが考えられる。

ルテオリンは、その強力な抗炎症・抗酸化作用から、抗動脈硬化作用を有すると考えられている。本研究では、そのルテオリンの抑制作用を評価するため、ルテオリンの類似化合物3種類 (クリシン、アピゲニン、トリセチン) を含む4種のフラボノイドの構造活性相関を検討した。ルテオリンは 20  $\mu$ M の濃度で CD

ファミリーの発現増大を抑制すると同時に、TPA 処理による THP-1 細胞の接着を部分的に抑制した。また、クリシン、アピゲニン、トリセチンと比較し、ルテオリンは CD ファミリー発現に対する抑制作用が強く、著しく単球分化を抑制していると考えられる。

ルチンおよびケルセチンは、カテコール環を有していることから、ROS を効率良く消去することが知られている[100]。ルテオリンは、ルチンやケルセチンと同様、カテコール環を有しており、同様な機序による有効性が推察される。著者は、第 1 章においてヒト単球系細胞株 THP-1 細胞における CD ファミリー発現増大における MEK1/2 および ERK1/2 の関与を見出しているが[66]、ルテオリンに MEK1/2 および ERK1/2 活性化に対する抑制作用は認められなかった (Fig. 14)。この結果は、MEK1/2 および ERK1/2 の下流にルテオリンの作用点があることを示唆している。また、THP-1 細胞の分化過程において、NOX2 発現増大や NOX2 由来 ROS 産生亢進が認められたが、ルテオリンの前処理はこの NOX2 発現および p47<sup>phox</sup> の膜移行の抑制を介して ROS 産生を抑制した (Fig. 15)。一般的に、ROS は貪食細胞の分化を含む、様々な生理的作用に参与するシグナル分子として働くことが知られているが[101-104]、ルテオリンはこれらの作用を抑制することで、血管系疾患で認められる過剰な ROS 産生によるレドックス恒常性破綻に対して抑制効果を示すと考えられる。

ルテオリンの強力な単球分化抑制作用は、構造活性相関から考えると、カテコール骨格に起因すると考えられる。アピゲニンと比較してルテオリンの抗酸化能が強いのは、B 環に存在するカテコール骨格が電子の非局在化に関係し、ヒドロキシ基が単独で結合する場合に比べてフェノキシラジカルの安定性を高めることによると考えられる。一方、トリセチンは、トリキノンの構造が非常に不安定なため分解を受けやすく、抗酸化作用が非常に弱いと考えられる。また、



3 つのヒドロキシ基がプロオキシダントとして機能することも報告されており [105]、今回の結果からもトリセチンの前処理では、CD ファミリーの発現に抑制効果は認められなかった (Fig. 13)。ルテオリンはカテコール環を有しているため、酸化後のジキノンの構造も安定で、ヒドロキシ基になることで再利用される。また、クリシン、アピゲニンはヒドロキシ基が少ないことでルテオリンの作用より効果が劣ると考えられる。以上の結果および考察から、ルテオリンが以下に示すフローチャートのように、NOX2 発現および p47<sup>phox</sup> の膜移行による ROS 産生亢進に対する抑制を介して、CD ファミリーの発現を抑制することが示唆された (Fig. 16)。

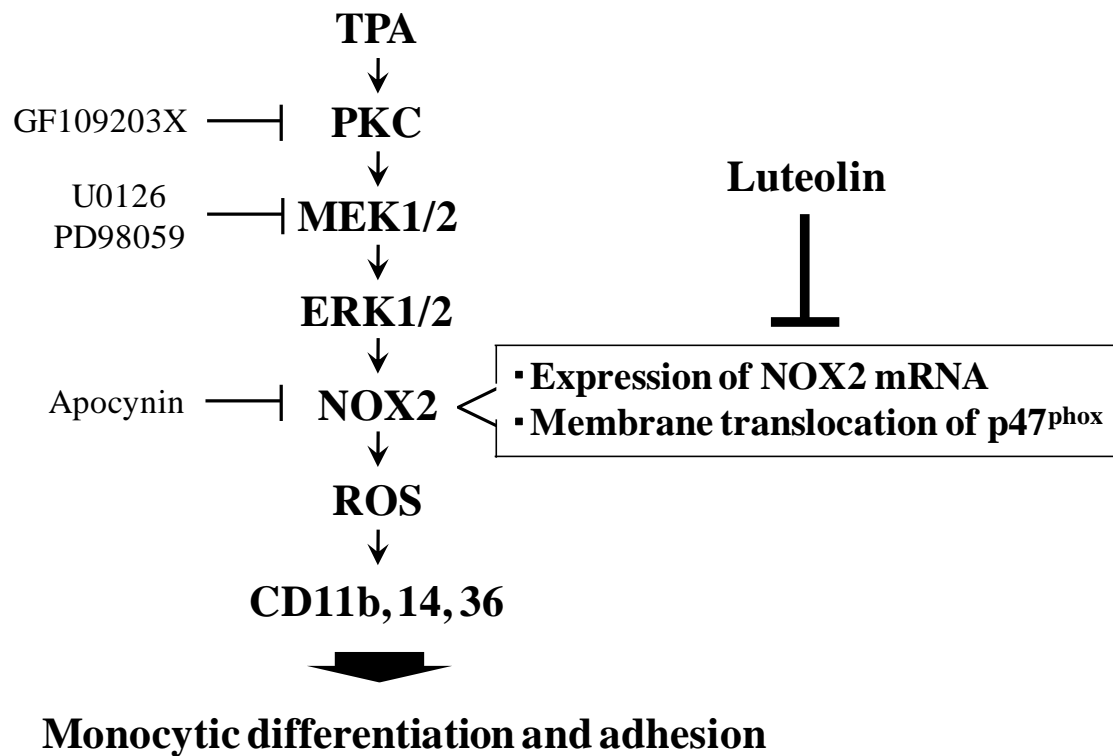


Fig. 16 Hypothesis of the site of action of luteolin. CD families are induced during monocytic differentiation through PKC, MEK1/2, ERK1/2, and NOX2-derived ROS. Luteolin has the potent activities of the blockage of NOX2 mRNA expression and membrane translocation of p47<sup>phox</sup>.

## 総括

動脈硬化症の進展・増悪は、日本の死因の上位を占める脳梗塞や心筋梗塞などの致死的な病態への引き金になることが知られている。EC-SOD は細胞外に局在する唯一の抗酸化酵素であり、分泌後、細胞表面や間質の細胞外マトリックスに結合し組織、特に血管系を酸化ストレスから防御していると考えられている。EC-SOD は他の組織と比べ、血管系組織に比較的高濃度に存在し ROS の消去に関与しているため、単球/マクロファージにおける EC-SOD 発現調節機構を解明すること、および単球の分化を抑制する化合物を探索することは、動脈硬化症を始めとする血管系疾患の発症・進展抑制に向けての有用な情報の提供に繋がると考えられる。そこで本研究では、ヒト単球系細胞株である THP-1 細胞を用いて、単球のマクロファージへの分化過程およびマクロファージの泡沫化過程における EC-SOD 発現変動とそのメカニズムについて、細胞内 ROS の関与および EC-SOD mRNA の安定性という観点から検討し、以下に示す知見を得た。

### 1. ヒト単球系細胞のマクロファージへの分化過程における EC-SOD 発現調節機構

単球系細胞株 THP-1 細胞の分化過程における抗酸化酵素 EC-SOD の発現を、分化誘導剤であるホルボールエステル TPA を用いて検討した。THP-1 細胞を TPA にて処理したところ、分化マーカーである CD11b、CD14、CD36 の発現および EC-SOD 発現の増大が認められた。次に、EC-SOD 発現増大機構を検討した。まず初めに、TPA が PKC のアクチベーターとして知られていることから[37]、EC-SOD 発現における PKC の関与を検討した結果、TPA を処理することにより、リン酸化 PKC の膜移行が認められた。また、PKC 阻害剤 GF109203X の前処理

により TPA 処理による EC-SOD 発現が有意に抑制された。次に、単球系細胞、平滑筋細胞および腎尿細管間質細胞における EC-SOD 発現調節機構への MAPK の関与が報告されていることから[19,39,40]、EC-SOD 発現への MAPK の関与を検討した結果、TPA 処理により MEK1/2 および ERK1/2 のリン酸化が認められた。一方で、JNK および p38-MAPK のリン酸化は認められなかった。また、MEK/ERK 阻害剤 U0126 および PD98059 にて前処理することにより、TPA 処理による EC-SOD 発現増大が有意に抑制された。さらに、TPA 処理により細胞内 ROS 産生が亢進したが、その ROS 産生亢進は、NOX2 発現増大および NOX2 活性化に必須の p47<sup>phox</sup> の膜移行の亢進に起因することが示され、実際、NOX 阻害剤は、TPA 処理による EC-SOD 発現増大を有意に抑制した。以上の結果から、ヒト単球系細胞株の分化過程における EC-SOD 発現増大に PKC、MEK1/2、ERK1/2 ならびに NOX2 由来 ROS 産生亢進によるシグナル経路が関与していると考えられた。

## 2. ヒト単球系細胞由来マクロファージの oxLDL 曝露による EC-SOD の発現変動とその調節機構

単球由来マクロファージの泡沫化過程における EC-SOD 発現調節機構を検討するため、THP-1 細胞由来マクロファージへの oxLDL 曝露により in vitro 泡沫化モデルを作製した。THP-1 由来マクロファージに oxLDL を曝露したところ、TPA 誘導性 EC-SOD 発現増大がその処理時間依存的に有意に減少した。また、その発現低下は SRs の一つである CD36 をノックダウンすることにより抑制されたことから、oxLDL 曝露による EC-SOD 発現低下に CD36 の関与が示唆された。次に、EC-SOD 発現低下機構を検討した。これまでに、EC-SOD 発現制御機構として、ヒストン H3/H4 のアセチル化および転写因子 Sp1/Sp3 の関与が報告され

ている[60,74]。そこで、これらの関与を検討するため、ヒストン抽出および ChIP 法を行った結果、oxLDL 曝露による EC-SOD 発現低下機構にヒストンアセチル化および Sp1/Sp3 の関与は認められなかった。転写レベルの制御を受けないことから、次に分化過程で発現増大した mRNA の安定性に着目した。OxLDL 曝露により、ActD の同時処理下において EC-SOD mRNA レベルが時間依存的に有意に低下したことから、oxLDL 曝露による EC-SOD mRNA レベルの低下は mRNA の不安定化の促進に起因することが示唆された。mRNA の 3'UTR には、mRNA の安定性を制御する配列が存在しており、そのシスエレメントの配列によって mRNA の安定性が大きく変化することが報告されていることから[75,76]、oxLDL 曝露による EC-SOD 低下への 3'UTR の関与を検討した。その結果、3'UTR を欠損させた *EC-SOD* 遺伝子 (*EC-SOD Δ3'UTR*) では、oxLDL 曝露による EC-SOD 3'UTR mRNA 低下が抑制された。さらに、*EC-SOD* 遺伝子の 3'UTR を Cu,Zn-SOD に挿入して oxLDL 曝露による影響を検討した結果、プラスミド由来 Cu,Zn-SOD mRNA レベルが EC-SOD の結果と同様に低下した。これらの結果から、oxLDL を曝露した場合、3'UTR を介して mRNA の不安定化を促進する反応が進むことが示唆された。以上の結果から、ヒト単球系由来マクロファージの泡沫化過程において、EC-SOD mRNA の分解が促進されることにより、EC-SOD レベルの低下が起きると考えられた。

### 3. ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞の分化に対するルテオリンの抑制効果

単球のマクロファージへの分化は、動脈硬化症の発症初期に認められる生理現象であり、その単球の分化を抑制することは動脈硬化症の発症予防に繋がると考えられる。そこで、THP-1 細胞分化モデルを用いて、単球分化に対するフラボノイドの抑制効果を評価した。本章では、CD11b、CD14 ならびに CD36 を

分化の指標として用いた。第 1 章において、TPA 処理による CD ファミリーの発現増大への PKC-MEK1/2-ERK1/2-NOX2/ROS のシグナル経路の関与を見出し、そのシグナル経路を指標にフラボノイドの抑制効果を検討した。THP-1 細胞を 4 種類のフラボノイド (クリシン、アピゲニン、ルテオリン、トリセチン) にて前処理することにより、TPA 誘導性の CD ファミリー発現増大が有意に減少し、その中でも、ルテオリンが最も強く発現を抑制し、細胞接着抑制との間に相関性が認められた。次に、ルテオリンの抑制作用点を検討した。まず、ルテオリンの前処理による MEK1/2 および ERK1/2 への作用を検討したところ、MEK1/2 のリン酸化および ERK1/2 のリン酸化には影響は認められなかった。次に、ルテオリン前処理による ROS 産生への影響を検討したところ、TPA 処理による細胞内 ROS 産生亢進が有意に抑制された。また、細胞内 ROS の産生源である NOX2 の発現および活性化へのルテオリンの作用を検討したところ、ルテオリンの前処理により、NOX2 mRNA の発現および NOX2 活性化に必須の p47<sup>phox</sup> の膜移行が抑制された。以上の結果から、ヒト単球系細胞株の分化に対して、ルテオリンが抑制効果を示すメカニズムを明らかにした。

以上、ヒト単球系細胞における動脈硬化症の発症・進展過程における EC-SOD 発現調節メカニズムおよび動脈硬化症の予防に有用なルテオリンの抑制作用を明らかにした (Fig. 17)。単球のマクロファージへの分化過程において認められる EC-SOD の発現増大は、細胞自身が産生する ROS および細胞外の ROS に対する抵抗性を高めるための防御的反応であると推察できる。一方で、泡沫化過程において EC-SOD レベルが低下することが、細胞外レドックス恒常性の破綻に繋がり、動脈硬化症を促進させる一因になると考えられる。実際に、泡沫化細胞において、際限なく修飾 LDL を取り込む点、マクロファージでのアポトー

シス抑制因子の発現など、病態の悪化を招く状態であることが知られている [106]。したがって、マクロファージの泡沫化を未然に防ぐ予防法および治療法の開発が急務である。本研究では、単球のマクロファージへの分化を抑制するルテオリンの有用性を示した。しかしながら、マクロファージは免疫系で重要な役割を果たすことから、分化とルテオリンの抑制作用とのバランスが今後の課題になると考えられる。

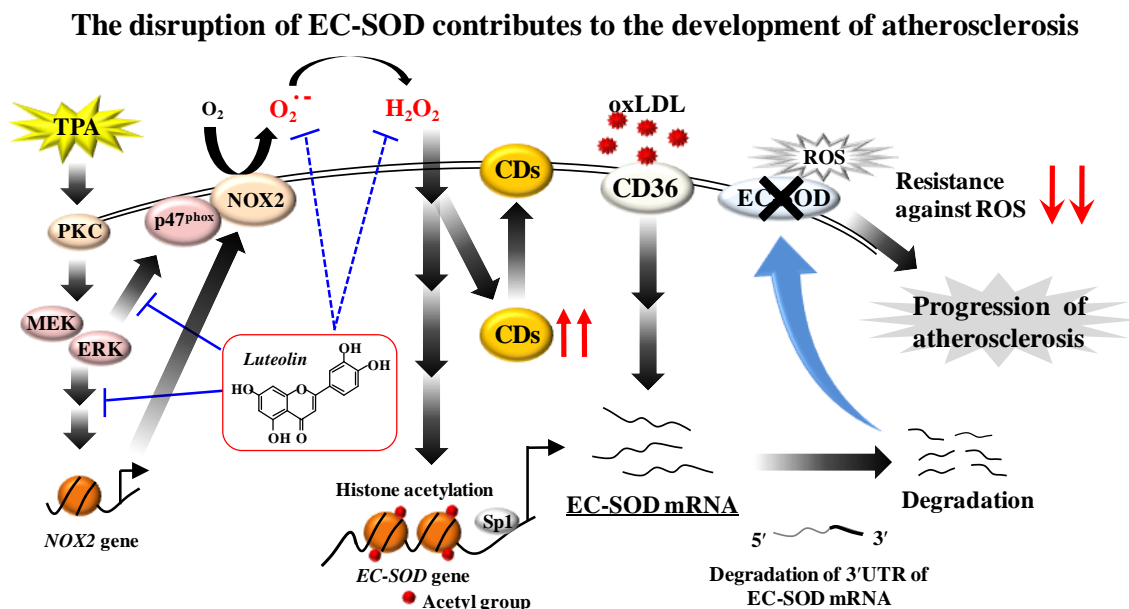


Fig. 17 Mechanism of EC-SOD disruption during foam cell formation and effect of luteolin on monocytic differentiation. The decrease of resistance against ROS by EC-SOD disruption may induce the progression of atherosclerosis.

動脈硬化症は、脳梗塞や心筋梗塞などの致死的な病態に繋がる危険性を有することから、EC-SOD 発現の制御が、動脈硬化症の予防および治療薬の開発への有用な情報の提供に繋がり、その罹患率および死亡率の軽減に寄与するものと考えられる。

## 謝辞

本研究の遂行において終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました岐阜薬科大学臨床薬剤学研究室、足立哲夫教授、原宏和准教授、神谷哲朗助教に深甚なる謝意を表します。

本研究の実施にあたり、天然化合物アピゲニンおよびトリセチンを御供与頂きました岐阜大学工学部生命機能材料工学科、瀬瀬守教授に心から感謝いたします。

本研究に際し御協力頂きました岐阜薬科大学臨床薬剤学研究室の諸氏に感謝いたします。



## 引用文献

- [1] Jerome WG, Cox BE, Griffin EE, Ullery JC. Lysosomal cholesterol accumulation inhibits subsequent hydrolysis of lipoprotein cholesteryl ester. *Microsc Microanal* 2008;**14**:138-149.
- [2] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;**352**:1685-1695.
- [3] Itabe H, Suzuki K, Tsukamoto Y, Komatsu R, Ueda M, Mori M, Higashi Y, Takano T. Lysosomal accumulation of oxidized phosphatidylcholine-apolipoprotein B complex in macrophages: intracellular fate of oxidized low density lipoprotein. *Biochem Biophys Acta* 2000;**1487**:233-245.
- [4] Watanabe K, Nakazato Y, Saiki R, Igarashi K, Kitada M, Ishii I. Acrolein-conjugated low-density lipoprotein induces macrophage foam cell formation. *Atherosclerosis* 2013;**227**:51-57.
- [5] Lin CS, Lin FY, Ho LJ, Tsai CS, Cheng SM, Wu WL, Huang CY, Lian CH, Yang SP, Lai JH. PKC $\delta$  signaling regulates SR-A and CD36 expression and foam cell formation. *Cardiovasc Res* 2012;**95**:346-355.
- [6] Ding Z, Liu S, Sun C, Chen Z, Fan Y, Deng X, Wang X, Mehta JL. Concentration polarization of ox-LDL activates autophagy and apoptosis via regulating LOX-1 expression. *Sci Rep* 2013;**3**:2091.
- [7] Mukai E, Kume N, Hayashida K, Minami M, Yamada Y, Seino Y, Kita T. Heparin-binding EGF-like growth factor induces expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2004;**176**:289-296.
- [8] Kiyon Y, Tkachuk S, Hilfiker-Kleiner D, Haller H, Fuhrman B, Dumler I. oxLDL induces inflammatory responses in vascular smooth muscle cells via urokinase receptor association with CD36 and TLR4. *J Mol Cell Cardiol* 2014;**66**:72-82.
- [9] Mügge A1, Brandes RP, Böger RH, Dwenger A, Bode-Böger S, Kienke S, Frölich JC, Lichtlen PR. Vascular release of superoxide radicals is enhanced in hypercholesterolemic rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994;**6**:994-998.
- [10] Vachier I, Chanez P, Le Doucen C, Damon M, Descomps B, Godard P. Enhancement of reactive oxygen species formation in stable and unstable asthmatic patients. *Eur Respir J* 1994;**7**:1585-1592.
- [11] Wright E, Jr. Scism-Bacon JL, Glass LC. Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycaemia. *Int J Clin Pract* 2006;**60**:308-314.

- [12] Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004;**114**:1752-1761.
- [13] Roberts CK, Barnard RJ, Sindhu RK, Jurczak M, Ehdaie A, Vaziri ND. Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. *Metabolism* 2006;**55**:928-934.
- [14] Faraci FM. Vascular protection. *Stroke* 2003;**34**:327-329.
- [15] Keele BB, Jr, McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase from escherichia coli B. A new manganese-containing enzyme. *J Biol Chem* 1970;**245**: 6176-6181.
- [16] Marklund SL, Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;**79**:7634-7638.
- [17] McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969;**244**:6049-6055.
- [18] Stralin P, Karlsson K, Johansson BO, Marklund SL. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;**15**:2032-2036.
- [19] Kamiya T, Makino J, Hara H, Inagaki N, Adachi T. Extracellular-superoxide dismutase expression during monocytic differentiation of U937 cells. *J Cell Biochem* 2011;**112**:244-255.
- [20] Carlsson LM, Jonsson J, Edlund T, Marklund SL. Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;**92**:6264-6268.
- [21] Sheng H, Brady TC, Pearlstein RD, Crapo JD, Warner DS. Extracellular superoxide dismutase deficiency worsens outcome from focal cerebral ischemia in the mouse. *Neurosci Lett* 1999;**267**:13-16.
- [22] Li Q, Bolli R, Qiu Y, Tang XL, Guo Y, French BA. Gene therapy with extracellular superoxide dismutase protects conscious rabbits against myocardial infarction. *Circulation* 2001;**103**:1893-1898.
- [23] Iyama S, Okamoto T, Sato T, Yamauchi N, Sato Y, Sasaki K, Takahashi M, Tanaka M, Adachi T, Kogawa K, Kato J, Sakamaki S, Niitsu Y. Treatment of murine collagen-induced arthritis by ex vivo extracellular superoxide dismutase gene transfer. *Arthritis Rheum* 2001;**44**:2160-2167.
- [24] Rusak G, Gutzeit HO, Muller L. "Structurally related flavonoids with antioxidative properties differentially affect cell cycle progression and apoptosis of human acute leukemia cells". *Nutr Res* 2005;**25**:143-155.

- [25] Yi L, Chen CY, Jin X, Zhang T, Zhou Y, Zhang QY, Zhu JD, Mi MT. Differential suppression of intracellular reactive oxygen species-mediated signaling pathway in vascular endothelial cells by several subclasses of flavonoids. *Biochemie* 2012;**94**:2035-2044.
- [26] Jung HA, Jin SE, Min BS, Kim BW, Choi JS. Anti-inflammatory activity of Korean thistle *Cirsium maackii* and its major flavonoids, luteolin 5-O-glucoside. *Food Chem Toxicol* 2012;**50**:2171-2179.
- [27] Hwang JT, Park OJ, Lee YK, Sung MJ, Hur HJ, Kim MS, Ha JH, Kwon DY. Anti-tumor effect of luteolin is accompanied by AMP-activated protein kinase and nuclear factor-NF- $\kappa$ B modulation in HepG2 hepatocarcinoma cells. *Int J Mol Med* 2011;**28**:25-31.
- [28] Seelinger G, Merfort I, Schempp CM. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin. *Planta Med* 2008;**74**:1667-1677.
- [29] Jia Z, Nallasamy P, Liu D, Shah H, Li JZ, Chitrakar R, Si H, McCormick J, Zhu H, Zhen W, Li Y. Luteolin protects against vascular inflammation in mice and TNF- $\alpha$ -induced monocyte adhesion to endothelial cells via suppressing IKB $\alpha$ /NF- $\kappa$ B signaling pathway. *J Nutr Biochem* 2014;**14**:251-254.
- [30] Meng L, Park J, Cai Q, Lanting L, Reddy MA, Natarajan R. Diabetic conditions promote binding of monocytes to vascular smooth muscle cells and their subsequent differentiation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;**298**:736-745.
- [31] Scholtes VP, Versteeg D, de Vries JP, Hoefer IE, Schoneveld AH, Stella PR, Doevendans PA, van Keulen KJ, de Kleijn DP, Moll FL, Pasterkamp G. Toll-like receptor 2 and 4 stimulation elicits an enhanced inflammatory response in human obese patients with atherosclerosis. *Clin Sci* 2011;**121**:205-214.
- [32] Corrêa CR, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Lastória S, Soares AM. Activation of monocytes and cytokine production in patients with peripheral atherosclerosis obliterans. *J Inflamm* 2011;**8**:23.
- [33] Abrahamsson T, Brandt U, Marklund SL, Sjoqvist PO. Vascular bound recombinant extracellular superoxide dismutase type C protects against the detrimental effects of superoxide radicals on endothelium-dependent arterial relaxation. *Circ Res* 1992;**70**:264-271.
- [34] Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad U S A* 1990;**87**:1620-1624.
- [35] Ziegler-Heitbrock HW. The biology of the monocyte system. *Eur J Cell Biol* 1989;**49**:1-12.

- [36] Jawien J. New insights into immunological aspects of atherosclerosis. *Pol Arch Med Wewn* 2008;**118**:127-131.
- [37] Nishizuka, Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 1992;**258**:607-614.
- [38] Miranda MB, McGuire TF, Johnson DE. Importance of MEK-1/-2 signaling in monocytic and granulocytic differentiation of myeloid cell lines. *Leukemia* 2002;**16**:683-692.
- [39] Adachi T, Toishi T, Takashima E, Hara H. Infliximab neutralizes the suppressive effect of TNF- $\alpha$  on expression of extracellular-superoxide dismutase *in vitro*. *Biol Pharm Bull* 2006;**29**:2095-2098.
- [40] Kamiya T, Hara H, Yamada H, Imai H, Inagaki N, Adachi T. Cobalt chloride decreases EC-SOD expression through intracellular ROS generation and p38-MAPK pathway in COS7 cells. *Free Rad Res* 2008;**42**:949-956.
- [41] Pathak MK, Hu X, Yi T. Effects of sodium stibogluconate on differentiation and proliferation of human myeloid leukemia cell lines *in vitro*. *Leukemia* 2002;**16**:2285-2291.
- [42] Yamamoto T, Sakaguchi N, Hachiya M, Nakayama F, Yamakawa M, Akashi M. Role of catalase in monocytic differentiation of U937 cells by TPA. *Leukemia* 2009;**23**:761-769.
- [43] Mohana T, Navin AV, Jamuna S, Sakeena Sadullah MS, Niranjali Devaraj S. Inhibition of differentiation of monocyte to macrophages in atherosclerosis by oligomeric proanthocyanidins –In-vivo and in-vitro study. *Food Chem Toxicol* 2015;**82**:96-105.
- [44] Datta R, Yoshinaga K, Kaneki M, Pandey P, Kufe D. Phorbol ester-induced generation of reactive oxygen species is protein kinase c $\beta$ -dependent and required for SAPK activation. *J Biol Chem* 2000;**275**:41000-41003.
- [45] Traore K, Trush MA, George M Jr, Spannhake EW, Anderson W, Asseffa A. Signal transduction of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-induced growth inhibition of human monocytic leukemia THP-1 cells is reactive oxygen dependent. *Leuk Res* 2005;**29**:863-879.
- [46] Yang KD, Shaio MF. Hydroxy radicals as an early signal involved in phorbol ester-induced monocytic differentiation of HL60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;**200**:1650-1657.
- [47] Takatsu H, Tasaki H, Kim HN, Ueda S, Tsutsui M, Yamashita K, Toyokawa T, Morimoto Y, Nakashima Y, Adachi T. Overexpression of EC-SOD suppresses endothelial-cell-mediated LDL oxidation. *Biochem Biophys Res Commun*

2001;**285**:84-91.

- [48] Heistad DD. Oxidative stress and vascular disease: 2005 Duff lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;**26**:689-695.
- [49] Laurila JP, Laatikainen LE, Castellone MD, Laukkanen MO. SOD3 reduces inflammatory cell migration by regulating adhesion molecule and cytokine expression. *PLoS One* 2009;**4**:e5786.
- [50] Zelko IN, Folz RJ. Sp1 and Sp3 transcription factors mediate trichostatin A-induced and basal expression of extracellular superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med* 2004;**37**:1256-1271.
- [51] Fujii J, Taniguchi N. Phorbol ester induces manganese-superoxide dismutase in tumor necrosis factor-resistant cells. *J Biol Chem* 1991;**266**:23142-23146.
- [52] Kamiya T, Hara H, Inagaki N, Adachi T. The effect of hypoxia mimetic cobalt chloride on the expression of EC-SOD in 3T3-L1 adipocytes. *Redox Rep* 2010;**15**:131-137.
- [53] Kamiya T, Obara A, Hara H, Inagaki N, Adachi T. ER stress inducer, thapsigargin, decreases extracellular-superoxide dismutase through MEK/ERK signaling cascades in COS7 cells. *Free Radic Res* 2011;**45**:692-698.
- [54] Obara A, Kamiya T, Izumi M, Hara H, Yamada H, Adachi T. Extracellular-superoxide dismutase expression in COS7 cells exposed to cadmium chloride. *Biol Pharm Bull* 2011;**34**:1443-1447.
- [55] Sözeri O, Vollmer K, Liyanage M, Frith D, Kour G, Mark GE III. Activation of the c-Raf protein kinase by protein kinase C phosphorylation. *Oncogene* 1992;**7**:2259-2262.
- [56] Rada B, Hably C, Meczner A, Timár C, Lakatos G, Enyedi P, Ligeti E. Role of Nox2 in elimination of microorganisms. *Semin Immunopathol* 2008;**30**:237-253.
- [57] Brown DI, Griendling KK. Nox proteins in signal transduction. *Free Radic Biol Med* 2009;**47**:1239-1253.
- [58] Barbieri SS, Eligini S, Brambilla M, Tremoli E, Colli S. Reactive oxygen species mediate cyclooxygenase-2 induction during monocyte to macrophage differentiation: critical role of NADPH oxidase. *Cardiovasc Res* 2003;**60**:187-197.
- [59] Niculescu MD, Craciunescu CN, Zeisei SH. Dietary choline deficiency alters global and gene-specific DNA methylation in the developing hippocampus of mouse fetal brains. *FASEB J* 2006;**20**:43-49.
- [60] Kamiya T, Machiura M, Makino J, Hara Hirokazu, Hozumi I, Adachi T. Epigenetic regulation of extracellular-superoxide dismutase in human monocytes.

*Free Rad Biol Med* 2013;**61**:197-205.

- [61] Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;**340**:115-126.
- [62] Miller YI, Chang MK, Binder CJ, Shaw PX, Witztum JL. Oxidized low density lipoprotein and innate immune receptors. *Curr Opin Lipidol* 2003;**14**:437-445.
- [63] Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, Ray R, Grieve DJ, Walker S, Shah AM. NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal* 2006;**8**:691-728.
- [64] Adachi T, Marklund SL. Interactions between human extracellular superoxide dismutase C and sulfated polysaccharides. *J Biol Chem* 1989;**264**:8537-8541.
- [65] Ookawara T, Imazeki N, Matsubara O, Kizaki T, Oh-Ishi S, Nakao C, Sato Y, Ohno H. Tissue distribution of immunoreactive mouse extracellular superoxide dismutase. *Am J Physiol* 1998;**275**:840-847.
- [66] Makino J, Kamiya T, Hara H, Adachi T. TPA induces the expression of EC-SOD in human monocytic THP-1 cells: Involvement of PKC, MEK/ERK, and NOX-derived ROS. *Free Radic Res* 2012; **46**: 637-644.
- [67] Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell* 2007;**128**:669-681.
- [68] Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008;**358**:1148-1159.
- [69] Zelko IN, Folz RJ. Myeloid zinc finger (MZF)-like, kruppel-like and Ets families of transcription factors determine the cell-specific expression of mouse extracellular superoxide dismutase. *Biochem J* 2003;**369**:375-386.
- [70] Lu Z, Xu X, Zhu G, Zhang P, van Deel ED, French JP, Fassett JT, Oury TD, Bache RJ, Chen Y. Extracellular superoxide dismutase deficiency exacerbates pressure overload-induced left ventricular hypertrophy and dysfunction. *Hypertension* 2008;**51**:19-25.
- [71] Laukkanen MO, Lehtolainen P, Turunen P, Aittomäki S, Oikari P, Marklund SL, Ylä-Herttuala S. Rabbit extracellular superoxide dismutase: expression and effect on LDL oxidation. *Gene* 2000;**254**:173-179.
- [72] Wang J, Zhao Y, Wang W, Du Z, Yan D, Li C, Chen Z. Daintain/AIF-1 plays roles in coronary heart disease via affecting the blood composition and promoting macrophage uptake and foam cell formation. *Cell Physiol Biochem* 2013;**32**:121-126.
- [73] Michael DT, Kyle Z, Latrisha KP, Prabhas VM, Tomassone MS. Coarse grained molecular dynamics of engineered macromolecules for the inhibition of oxidized low-density lipoprotein uptake by macrophage scavenger receptors.

*Biomacromolecules* 2013;**14**:2499-2509.

- [74] Zelko IN, Mueller MR, Folz RJ. Transcription factors sp1 and sp3 regulate expression of human extracellular superoxide dismutase in lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;**39**:243-251.
- [75] Osawa M, Hosoda N, Nakanishi T, Uchida N, Kimura T, Imai S, Machiyama A, Katada T, Hoshino S, Shimada I. Biological role of the two overlapping poly(A)-binding protein interacting motifs 2 (PAM2) of eukaryotic releasing factor eRF3 in mRNA decay. *RNA* 2012;**18**:1957-1967.
- [76] Hagmeister U, Reuschlein K, März A, Wenck H, Gallinat S, Lucius R, Knott A. Poly(A) tail shortening correlates with mRNA repression in tropoelastin regulation. *J Dermatol Sci* 2012;**67**:44-50.
- [77] Moore KJ, Tabas I. Macrophage in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* 2011;**145**:341-355.
- [78] Chávez-Sánchez L, Garza-Reyes MG, Espinosa-Luna JE, Chávez-Rueda K, Legorreta-Haquet MV, Blanco-Favela F. The role of TLR2, TLR4 and CD36 in macrophage activation and foam cell formation in response to oxLDL in humans. *Hum Immunol* 2014;**75**:322-329.
- [79] Rios FJ, Ferracini M, Pecenin M, Koga MM, Wang Y, Ketelhuth DF, Jancar S. Uptake of oxLDL and IL-10 production by macrophage requires PAFR and CD36 recruitment into the same lipid rafts. *PLoS One* 2013;**8**:e76893.
- [80] Lappalainen J, Lindstedt KA, Oksjoki R, Kovanen PT. OxLDL-IgG immune complexes induce expression and secretion of proatherogenic cytokines by cultured human mast cells. *Atherosclerosis* 2011;**214**:357-363.
- [81] Emili A, Greenblatt J, Ingles CJ. Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA-box-binding protein. *Mol Cell Biol* 1994;**14**:1582-1593.
- [82] Chiang CM, Roeder RG. Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators. *Science* 1995;**267**:531-536.
- [83] Rahaman SO, Lennon DJ, Febbraio M, Podrez EA, Hazen SL, Silverstein RL. A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation. *Cell Metab* 2006;**4**:211-221.
- [84] Smirnova IV, Kajstura M, Sawamura T, Goligorsky MS. Asymmetric dimethylarginine upregulates LOX-1 in activated macrophages: role in foam cell formation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;**287**:782-790.
- [85] Gu BJ, Saunders BM, Petrou S, Wiley JS. P2X(7) is a scavenger receptor for apoptotic cells in the absence of its ligand, extracellular ATP. *J Immunol*

2011;**187**:2365-2375.

- [86] Park YM, Febbraio M, Silverstein SL. CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima. *J Clin Invest* 2009;**119**:136-145.
- [87] Park JG, Oh GT. The role of peroxidases in the pathogenesis of atherosclerosis. *BMB Rep* 2011;**44**:497-505.
- [88] Yu D, Li M, Tian Y, Liu J, Shang J. Luteolin inhibits ROS-activated MAPK pathway in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Life Sci* 2015;**122**:15-25.
- [89] Kawai Y, Nishikawa T, Shiba Y, Saito S, Murota K, Shibata N, Kobayashi M, Kanayama M, Uchida K, Terao J. Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries: implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids. *J Biol Chem* 2008;**283**:9424-9434.
- [90] Ninomiya M, Tanaka K, Tsuchida Y, Muto Y, Koketsu M, Watanabe K. Increased bioavailability of tricin-amino acid derivatives via a prodrug approach. *J Med Chem* 2011;**54**:1529-1536.
- [91] Bai H, Jin H, Yang F, Zhu H, Cai J. Apigenin induced MCF-7 cell apoptosis-associated reactive oxygen species. *Scanning* 2014;**36**:622-631.
- [92] Ha SK, Moon E, Kim SY. Chrysin suppresses LPS-stimulated proinflammatory responses by blocking NF- $\kappa$ B and JNK activations in microglia cells. *Neurosci Lett* 2010;**485**:143-147.
- [93] Yazawa S, Miyano K, Honbou K, Inagaki F, Sumimoto H. The domain organization of p67 phox, a protein required for activation of the superoxide-producing NADPH oxidase in phagocytes. *J Innate Immun* 2009;**1**:543-555.
- [94] Rosc-Schlüter BI, Häuselmann SP, Lorenz V, Mochizuki M, Facciotti F, Pfister O, Kuster GM. NOX2-derived reactive oxygen species are crucial for CD29-induced pro-survival signaling in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2012;**93**:454-462.
- [95] Bondi CD, Manickam N, Lee DY, Block K, Gorin Y, Abboud HE, Barnes JL. NAD(P)H oxidase mediates TGF- $\beta$ 1-induced activation of kidney myofibroblasts. *J Am Soc Nephrol* 2010;**21**:93-102.
- [96] 宮野 佳, 住本 英樹. 好中球による活性酸素産生の分子機構. *感染・炎症・免疫* 2008;**38**:194-203.
- [97] Balce DR, Li B, Allan ER, Rybicka JM, Krohn RM, Yates RM. Alternative activation of macrophages by IL-4 enhances the proteolytic capacity of their



- phagosomes through synergistic mechanisms. *Blood* 2011;**118**:4199-4208.
- [98] Beckett EL, Phipps S, Starkey MR, Horvat JC, Beagley KW, Foster PS, Hansbro PM. TLR2, but not TLR4, is required for effective host defence against Chlamydia respiratory tract infection in early life. *PLoS One* 2012;**7**:e39460.
- [99] Makino J, Nii M, Kamiya T, Hara H, Adachi T. Oxidized low-density lipoprotein accelerates the destabilization of extracellular-superoxide dismutase mRNA during foam cell formation. *Arch Biochem Biophys* 2015;**575**:54-60.
- [100] Kessler M, Ubeaud G, Jung L. Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. *J Pharm Pharmacol* 2003;**55**:131-142.
- [101] Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002;**82**:47-95.
- [102] Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol* 2003;**15**:247-254.
- [103] Nathan C. Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling. *J Clin Invest* 2003;**111**:769-778.
- [104] Kinningham KK, Cardozo ZA, Cook C, Cole MP, Stewart JC, Tassone M, Coleman MC, Spitz DR. All-trans-retinoic acid induces manganese superoxide dismutase in human neuroblastoma through NF-kappaB. *Free Radic Biol Med* 2008;**44**:1610-1616.
- [105] Hsu YL, Hou MF, Tsai EM, Kuo PL. Tricetin, a dietary flavonoid, induces apoptosis through the reactive oxygen species/c-Jun NH2-terminal kinase pathway in human liver cancer cells. *J Agric Food Chem* 2010;**58**:12547-12556.
- [106] Arai S, Miyazaki T. Impacts of the apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) on obesity-associated inflammatory diseases. *Semin Immunopathol* 2014;**36**:3-12.

## 略語表

ActD	actinomycin D
Apo	apocynin
ATRA	all- <i>trans</i> -retinoic acid
BCA	bicinchoninic acid
BSA	bovine serum albumin
Carboxy-H <sub>2</sub> DCFDA	5-(and-6)-carboxy-2',7'dichlorodihydrofluorescein diacetate
CD	cluster of differentiation
ChIP	chromatin immunoprecipitation assay
Cu,Zn-SOD	copper and zinc containing-SOD
DPI	diphenyleneiodonium
DTT	dithiothreitol
EC-SOD	extracellular-SOD
ERK	extracellular-regulated protein kinase
FCS	fetal calf serum
IL	interleukin
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LDL	low-density lipoprotein
LOX-1	lectin-like oxidized LDL receptor-1
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
MEK	MAPK/ERK kinase
Mn-SOD	manganese containing-SOD

NC	negative control
NF- $\kappa$ B	nuclear factor-kappa B
nLDL	native LDL
NOX	NADPH oxidase
oxLDL	oxidized LDL
PBS	phosphate buffered saline
PFA	paraformaldehyde
PKC	protein kinase C
ROS	reactive oxygen species
RT-PCR	reverse transcriptional-polymerase chain reaction
siRNA	small interfering RNA
SOD	superpoxide dismutase
SR	scavenger receptor
TBP	TATA box binding protein
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$
TPA	12- <i>O</i> -tetradecanoylphorbol-13-acetate
UTR	untranslated region