

ビタミン A および D による MPO 遺伝子のダウンレギュレーション

細川 優¹⁾・川口竜二²⁾・引地一昌²⁾・吉原富子³⁾・山田道之⁴⁾・椎野禎一郎¹⁾・戸谷誠之¹⁾

¹⁾国立健康栄養研究所*, ²⁾エス・アール・エル遺伝子**, ³⁾東京家政大学・家政学部***,

⁴⁾横浜市立大学・文理学部****

Down Regulation of Myeloperoxidase (MPO) Gene Induced by Vitamin A or Vitamin D

Yu HOSOKAWA¹⁾, Ryuji KAWAGUCHI²⁾, Kazumasa HIKIJI²⁾, Tomiko YOSHIHARA³⁾, Michiyuki YAMADA⁴⁾,
Teiichiro SHIINO¹⁾, Masayuki TOTANI¹⁾

¹⁾The National Institute of Health and Nutrition ²⁾Genetic Research Laboratory, SRL ³⁾School of Home Economics, Tokyo Kasei University ⁴⁾Faculty of Liberal Arts and Science, Yokohama City University

The differentiation-related down regulation of MPO gene was studied in two human myeloid leukemic cell lines. The MPO gene was also strongly expressed in monocytic cell line SKM-1. Exposure of HL-60 or SKM-1 cells to all-trans-retinoic acid (ATRA) resulted in a remarkable decrease of MPO mRNA levels. The MPO mRNA levels in SKM-1 cells decreased faster than those in HL-60 cells after exposure to ATRA. Exposure of HL-60 cells to $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D₃ ($1, 25$ - $(OH)_2D_3$) resulted in a time-dependent decrease of MPO mRNA levels. While, no decrease of MPO mRNA levels was observed in SKM-1 cells. The increase in c-fms mRNA levels was observed in SKM-1 cells after two days exposure to $1, 25$ - $(OH)_2D_3$. The percentage of NBT positive cells in SKM-1 cells was also increased after 4 days exposure to $1, 25$ - $(OH)_2D_3$.

好中球ミエロペルオキシダーゼ (MPO) は、過酸化水素とハロゲンイオン (Cl⁻) の存在下に強力な殺菌を行う¹⁾。MPO 遺伝子の発現は、組織特異的で、顆粒球-マクロファージ系譜の細胞に発現する。しかも分化の前骨髄球の時期に限られている。前骨髄球の特長を残す HL-60細胞は、MPO 遺伝子を強く発現する。HL-60は、ビタミン A の誘導体である all-trans-レチノイン酸 (ATRA) あるいはジメチ

*所在地：東京都新宿区戸山1-23-1 (〒162)

**所在地：東京都八王子市小宮町51 (〒192)

***所在地：東京都板橋区加賀1-18-1 (〒173)

****所在地：神奈川県横浜市金沢区瀬戸22-2 (〒236)

ルスルホキシド (DMSO) で顆粒球に、活性型ビタミン D₃ (1,25-(OH)₂D₃), ホルボール-12ミリスタート-13アセテート (PMA) で単球-マクロファージに分化する。それに伴い MPO 遺伝子の発現量は低下する²⁻⁴⁾。著者らは、数種の白血病培養株を用いて分化と MPO 遺伝子の発現との関連を検討し、SKM-1細胞では MPO 遺伝子のビタミン A と D に対するレスポンスが HL-60 とは異なることを認めたので報告する。

実験方法

(1) 細胞の培養と分化誘導

急性骨髄性白血病由来の SKM-1 (FAB 分類: M5) と HL-60 (FAB 分類: M2) は、10% FBS を含む RPMI-1640 培地で培養した。分化は、 $2\sim 4 \times 10^5$ 細胞/ml に調整後、誘導剤を添加した。生細胞数は、トリパンブルーで染色して計測した。

(2) ノーザンプロット解析

遠心で細胞を集め、PBS (-) で洗浄後、グアニジンチオシアネート-フェノール-クロロフォルム法で粗 RNA を調整した⁵⁾。10~15 μ g の粗 RNA を用いて解析した。5 \times SSPE, 5 \times Denhardt's, 1% SDS, 10% 硫酸デキストラン, 50% フォルムアミドおよび 100 μ g/ml 熱変性サケ精子 DNA を含む溶液で 42°C で、2 時間、プレハイブリダイゼーションをした後、³²P 標識プローブを加えて、42°C、一晩ハイブリダイズした。フィルターは、0.1% SDS / 2 \times SSC 溶液で、室温、5 分、3 回洗浄した後、0.1% SDS / 0.2 \times SSC 溶液で 50°C、20 分、2 回洗浄した。

(3) プローブ

MPO は、cDNA (MP-S7) 由来の KpnI / KpnI 断片 (0.45kb) を用いた。c-fms, c-myc (Oncogene Science 製), β -アクチン (Oncof 製) は、cDNA あるいは構造遺伝子に由来する DNA プローブを用いた。

(4) NBT 還元と貪食試験

NBT 還元は、 3×10^5 細胞を用い、NBT バイアル (Sigma Diagnostics) で測定した。貪食は、 10^6 細胞を用い、ヒト IgG でコートしたラテックスビーズの食作用で測定した。

実験結果

1. ATRA によるダウンレギュレーション

10^{-6} M の ATRA を添加して、MPO mRNA レベルの変化をノーザン法で経時的に検討した (図-1)。HL-60 では、ATRA で顆粒球に分化し、活性酸素生成の指標となるニトロブルーテトラゾリウム (NBT) 還元、あるいは貪食作用などの表現型が現れる。SKM-1 でも、ATRA を添加すると 4 日後には、弱いながらも NBT 還元とマイクロビーズに対する貪食作用が認められた。SKM-1 の MPO mRNA レベルは、1 日後から急激に低下し、その後少なくとも 4 日間は低いレベルを持続した。低下の度合も、HL-60 より大きかった。HL-60 の mRNA レベルは、3 日後にかけて徐々に低下した。なお、両方の細胞において、対照とした β -アクチンの mRNA レベルは ATRA により変化しなかった。

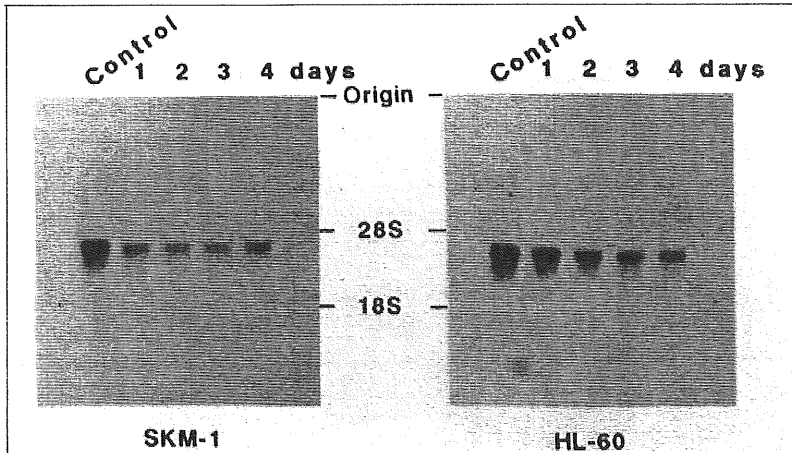


Fig. 1. Effect of ATRA on MPO gene expression in SKM-1 and HL-60 cells, Cells (2.5×10^5 /ml) were exposed to 10^{-6} M ATRA, Ten μ g of total cellular RNA was subjected to Northern blot analysis.

2. 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ によるダウンレギュレーション

10^{-7} M の 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ を添加すると、HL-60 の MPO mRNA レベルは、2 日から 4 日後にかけて徐々に低下した (図-2)。c-myc の mRNA レベルも 2 日後から著しく低下したが、 β -アクチンの mRNA レベルは変わらなかった。SKM-1 では、MPO mRNA レベルは 4 日後にもほとんど変わらなかった。c-myc の mRNA レベルも同様に変化しなかった。細胞の単球-マクロファージへの分化で上昇が確認されている c-fms の mRNA レベルを検討した⁶⁾ (図-3)。SKM-1 でも c-fms の mRNA レベルは 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ の添加に伴い、2 日後から上昇し少なくとも 4 日後までは持続した。分化の指標となる表現型の発現を検討した (表-1)。4 日後の生細胞数は、1,25-(OH) $_2$ D $_3$ を添加しても対照の 90% で、SKM-1 では 1,25-

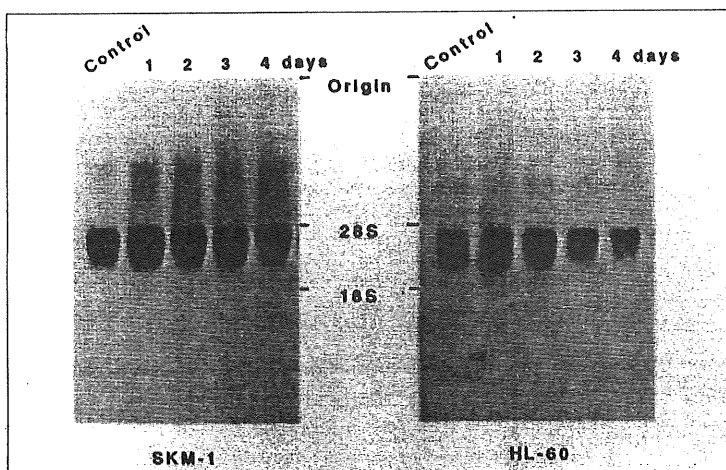


Fig. 2. Effect of 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ on MPO gene expression in SKM-1 and HL-60 cells, Cells (2.5×10^5 /ml) were exposed to 10^{-7} M 1,25-(OH) $_2$ D $_3$.

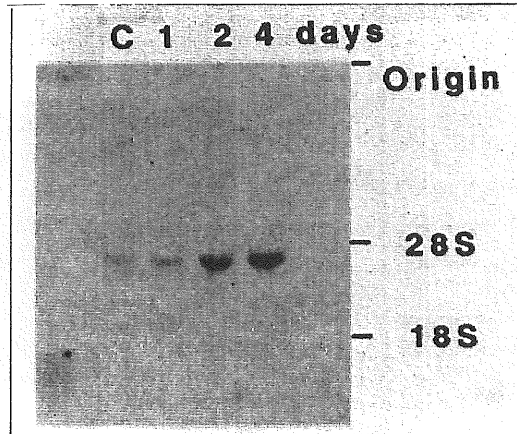


Fig. 3. Effect of 1,25-(OH)₂D₃ on c-fms gene expression in SKM-1 cells. Cells (2.5 × 10⁵/ml) were exposed to 10⁻⁷M 1,25-(OH)₂D₃. Twenty μg of total cellular RNA was subjected to Northern blot analysis.

Table 1. Expression of differentiation-related phenotypes by 1,25-(OH)₂D₃ in SKM-1 cells

Treatment	Viable cells (× 10 ⁵ /ml)	NBT positive cells (%)	Phagocytosed cells (%)
Control	13.5	2.7	20.4
1,25-(OH) ₂ D ₃	12.2	26.2	29.7

Cells (2.5 × 10⁵/ml) were treated with 10⁻⁷ M 1,25-(OH)₂D₃ for 4 day

(OH)₂D₃による増殖抑制効果はほとんど観察されなかった。NBT還元作用は、1,25-(OH)₂D₃で上昇したがHL-60で観察されるような強いものではなかった。貪食作用もわずかに上昇した。

考 察

SKM-1では、ATRAによるMPO遺伝子の著しいダウンレギュレーションが観察された。しかし、HL-60では観察される1,25-(OH)₂D₃によるダウンレギュレーションは認められなかった。ビタミンAあるいはDによる転写調節のシグナル伝達では、ビタミンは特異的受容体と複合体を形成し、標的遺伝子の調節領域への結合が必要である⁷⁾。SKM-1でも、単球-マクロファージへの分化で特異的に増加するc-fmsのmRNAレベルの上昇が観察された。また、分化の表現型の一つであるNBT還元作用も発現しており、細胞内における1,25-(OH)₂D₃とその受容体(VDR)システムは正常に機能していると考えられる。最近、ビタミンDの転写調節におけるシグナル伝達には、ビタミンD単独で機能する経路とビタミンAと共同的に機能する経路の存在が明らかにされている⁸⁾。これらのシグナル伝達経路が、MPO遺伝子の転写調節にどのように関与しているかは今後の問題点である。

文 献

1. Klebanoff, S. J. (1975) *Semin. Hematol.* 12 : 117.
2. Yamada, M., Hur, S. -J., Hashinaka, K., Tsuneoka, K., Saeki, T., Nishio, C., Sakiyama, F. and Tsunasa-
wa, S. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* 255 : 147.
3. Sagoh, T. and Yamada, M. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* 262 : 599.
4. Tobler, A., Miller, C. W., Johnson, K. R., Selsted, M. E., Rovera, G. and Koeffler, H. P. (1988) *J. Cell.*
Physiol. 136 : 215.
5. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.* 162 : 156.
6. Sariban, E., Mitchell, T. and Kufe, D. (1985) *Nature* 316 : 64.
7. Evans, R. M. (1988) *Science* 240 : 889.
8. Carlberg, C., Bendik, I., Wyss, A., Meier, E., Sturzenbecker, L. J., Grippo, J. F. and Hunziker, W.
(1993) *Nature* 361 : 657.