

内耳と免疫系のバイオメカニクス

和田 仁

工学研究科 バイオロボティクス専攻 バイオメカニクス講座
生体機械工学分野 教授
E-mail: wada@cc.mech.tohoku.ac.jp



1. はじめに

2008年4月より、東北大学大学院薬学研究科から生化学を専門とする石原研治先生を助教に迎え、研究領域を聴覚器官だけでなく、生体の免疫系にまで広げた。そこで本年度は、聴覚器官に関する研究の成果“Qdotを利用した免疫原子間力顕微鏡法によるタンパク質モータprestinの可視化”と生体の免疫系に関する研究の成果“ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬による好酸球性白血病細胞の好酸球への分化誘導”を紹介する。

2. Qdot を利用した免疫原子間力顕微鏡法によるタンパク質モータ prestin の可視化

2.1 研究背景

図1にヒトの聴覚の模式図を示す。空気のス疎密波である音は、外耳道を通り、鼓膜を振動させる。この振動は耳小骨連鎖を経て、内耳蝸牛に伝えられる。蝸牛内をらせん状に走る基底板の上にはコルチ器という器官が存在する。蝸牛に伝えられた音刺激により、コルチ器は上下に振動する。コルチ器には、内有毛細胞（Insner hair cell: IHC）と、外有毛細胞(Outer hair cell: OHC)と呼ばれる2種類の感覚有毛細胞が存在し、コルチ器の振動により、有毛細胞上端に存在する聴毛が屈曲する。IHCでは聴毛の屈曲に伴って、そこに存在するイオンチャンネルが開き、陽イオンが流入する。これにより細胞内電位が上昇し、聴神経を発火させる。この信号が脳へと伝達され、我々は音を認識する。一方、OHCではコルチ器の振動に伴い、IHCと同様に細胞内電位が変化する。この電位変化を感知しOHCは自らの細胞長を変化させる。この細胞長変化はコルチ器の振動を増幅する。この増幅機構により我々は鋭敏な聴覚を得ている[1-4]。

聴覚の鋭敏さを実現しているOHCの伸縮運動は、細胞膜中に存在するタンパク質モータが膜電位の変

化に応じ、構造を変化させることに起因すると考えられている。2000年にZhengらによってこのタンパク質モータの遺伝子が同定され、prestinと命名された[5]。さらに、野生型のマウスに比べ、prestinノックアウトマウスや変異prestinノックインマウスの聴力は著しく低いことが報告されている[6, 7]。これはprestinが、聴覚の鋭敏性に重要な役割を果たしていることを示している。これまでに、prestinの構造解明を目指し、いくつかの研究が行われてきた。電子顕微鏡及び原子間力顕微鏡（Atomic force microscopy: AFM）で外有毛細胞の細胞膜を観察し、prestinと考えられる10 nm程度の構造物が発見されている[8-12]。また我々は以前に、prestinを安定発現するChinese hamster ovary (CHO)細胞を作製し、その細胞膜をAFMで観察した[13]。その結果、prestinとおぼしき8-12 nmの構造物を発見した。しかし、細胞膜にはprestin以外の膜タンパク質も存在するため、観察した構造物をprestinと断定できなかった。そこで、本研究では、Qdotを利用した免疫原子間力顕微鏡法を提案し、prestinの可視化を試みた。

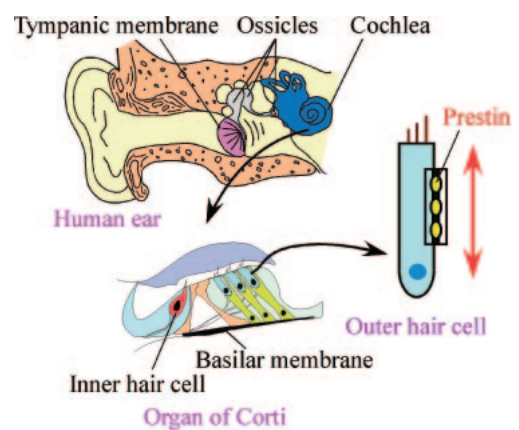


図1. Human auditory system. Sensory cells, such as outer hair cells (OHCs), inner hair cells and various kinds of the other cells, sit on the basilar membrane. OHCs subject the membrane to force, leading to cochlear amplification, resulting in the high sensitivity of mammalian hearing. Prestin is thought to be the origin of the motility of OHCs.

2.2 実験方法

2.2.1 細胞培養

実験には prestin を安定発現させた CHO 細胞と prestin を発現していない通常の CHO 細胞を使用した。prestine を安定発現させた CHO 細胞には、緑色蛍光タンパク質 (Green fluorescent protein: GFP) の遺伝子も導入されているため、GFP の蛍光を観察することで、prestine を発現している細胞と発現していない細胞を見分けることができる [14, 15]。上述の 2 種類の細胞は、10%FBS 含有 RPMI-1640 培地を用いて培養した。

2.2.2 細胞膜の単離

細胞がフラスコ内で、80%コンフルエントになるまで培養し、EDTA により細胞をフラスコから剥がした。剥がした細胞を含む EDTA 溶液を 250 g で 5 分間遠心した。上清を除去後、10%FBS 含有 RPMI-1640 培地を加え、攪拌し、そしてガラスベースディッシュに播種した。一晚培養すると、細胞は再びガラスベースディッシュに接着し、紡錘形状となる。その後、タンパク質を含む培養液を取り除くため、無タンパク質細胞外溶液 (145 mM NaCl, 5.8 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 0.9 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 0.7 mM Na₂HPO₄, 5.6 mM glucose; pH 7.3) で細胞を洗浄した。次に、細胞を低浸透圧溶液 (10 mM piperazine-*N,N'*-bis(2-ethanesulfonic acid), 10 mM MgCl₂, 0.5 mM ethylene glycol bis(2-aminoethyl ether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid; pH 7.2) に 3 分間浸した。その後、1 ml ピペットマンを用い、細胞に低浸透圧溶液を吹きかけることで細胞膜を単離した。そして、細胞骨格、表在性膜タンパク質及び prestin 以外の内在性膜タンパク質を除去するため、ディッシュ底面に単離した細胞膜を PBS で 3 回洗浄後、高塩濃度溶液 (2M NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 1mM Na₂HPO₄; pH 7.2) に浸し室温で 30 分間インキュベートし、さらに PBS で 3 回洗浄後、0.05%トリプシン/PBS に浸し室温で 5 分間インキュベートした。そして、PBS で 3 回洗浄した。細胞膜が正しく単離できているかを、CM-DiI で染色し、蛍光顕微鏡で観察することで確認した。

2.2.3 Prestin の Qdot による標識

単離した細胞膜を、4.0%パラホルムアルデヒドを用い、室温で 30 分間化学固定した。化学固定した

試料を Block Ace (Dainippon Pharmaceutical, Osaka, Japan)を用いブロッキング後、プレスチン N 末端認識 1 次抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)を加え、4°Cで一晩インキュベートした。細胞膜を PBS で洗浄し、Qdot 標識抗 IgG 2 次抗体 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を加え 37°Cで 1 時間インキュベートした。その後、ハンクス平衡塩 (HBSS; 5.33 mM KCl, 0.44 mM KH₂PO₄, 137.93 mM NaCl, 0.34 mM Na₂HPO₄, 0.5 mM glucose; pH 7.3) に浸し観察試料とした。Qdot は蛍光を発するので、この蛍光を観察することで、prestine が標識されているか否かを確認できる。Qdot はサイズの均一な半導体材料であるため、AFM 画像中において、容易にその存在を確認できる (図 2)。また、Qdot が prestin の N 末端に結合していることを考慮すると、Qdot と prestin の距離は最大 50 nm であると計算できる [16, 17]。

2.2.4 原子間力顕微鏡による観察

Prestin の観察には、倒立型蛍光顕微鏡 (IX70, Olympus) と一体型である原子間力顕微鏡 (NVB100, Olympus) を用いた。カンチレバーにはピラミダル探針を持つ、ばね定数 0.02 N/m の窒化シリコン製のものを用いた。試料に与える損傷を最小にするため、タッピングモードで観察を行った。カンチレバーの共振周波数は 3.6-4.7 kHz、走査速度は 0.3-0.4 $\mu\text{m/s}$ とした。サンプルは左から右へと走査した。得られた画像に対し、ソフトウェア (Nanoscope v4.23, Digital Instruments) により歪補正を行った。

2.3 結果

2.3.1 細胞膜単離と Qdot による染色

図 3 に CM-DiI により染色した単離細胞膜の顕微鏡画像を示す。赤く染色されている部分が細胞膜である。細胞が破砕され、細胞膜が単離されていることが確認できる。

図 4 に、prestine を安定発現している細胞と prestine を発現していない細胞から単離した細胞膜を Qdot で染色した際の蛍光顕微鏡画像を示す。Qdot は prestin の N 末端に結合する 1 次抗体に、結合し、赤色の蛍光を発する。図 4 に見られるように、prestine を安定発現している細胞から単離した細胞膜は赤色に染色されているが、prestine を発現していない細胞から単離した細胞膜は染色されなかった。この結果は、細胞膜単離処理、高塩濃度溶液処理及び

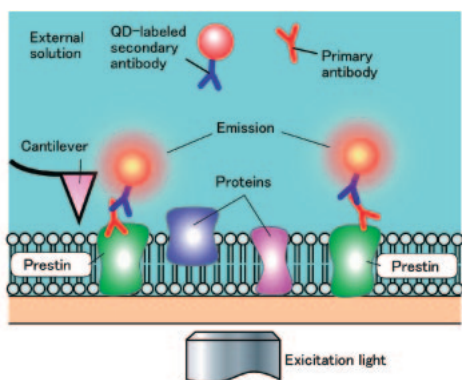


図 2. Immune AFM of the isolated inside-out plasma membrane of the prestin-transfected CHO cell.

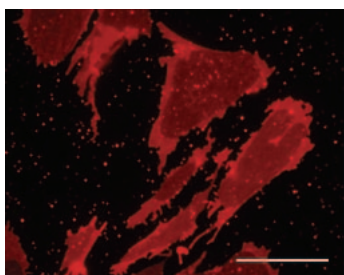


図 3. Fluorescence image of isolated plasma membrane of CHO cells. The isolated plasma membranes were stain by CM-DiI, which is a fluorescence lipophilic membrane probe. It can be confirmed that the cells were sheared open, thus becoming an isolated plasma membrane. Scale bar shows 20 μ m.

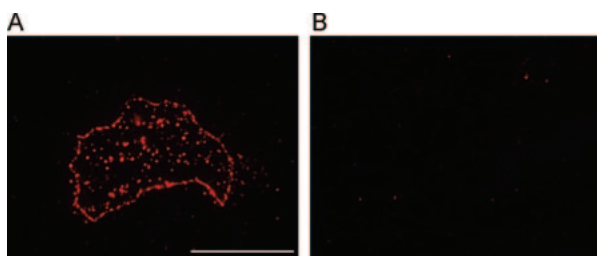


図 4. Qdot labeling of Isolated plasma membrane of CHO cells. A. Isolated plasma membrane of prestin-transfected CHO cell. B. Isolated plasma membrane of prestin-untransfected CHO cell. Fluorescence of Qdot was observed in the prestin-transfected CHO cell, but not observed in the untransfected CHO cell. Scale bar represents 20 μ m.

トリプシン処理後もprestinsが細胞膜に存在していることを示す。

2.3.2 カンチレバーの Qdot への影響

AFM で試料を観察する場合、カンチレバーが試料に接触する。このため、カンチレバーが試料を

走査する際に、Qdot が移動してしまう可能性がある。そこで、カンチレバーで試料を走査する前後で、Qdot の位置が変化しないかを調べた。図 5 に、走査前後の Qdot の蛍光画像及び低倍率 AFM 画像を示す。走査前後で、Qdot の染色画像に変化がないことから、カンチレバーの Qdot の位置への影響は無視できると考えられる。

2.3.3 AFM による prestin の観察

図 5 における低倍率 AFM 画像内に、四角で示した部分の高倍率 3 次元 AFM 画像を図 6 に示す。黒矢じりで示される構造物の高さは 7.9 nm であり、用いた Qdot の粒径と一致している。図 6 右に、Qdot 近傍の拡大図を示す。白矢印で示されるように、Qdot 近傍に、4 つのピークと中心部に一つの窪みを持つ、リングのような形をした構造物が観察された (図 6 下)。上述したように、Qdot は prestin に結合するため、Qdot 近傍に観察された構造物が prestin であると考えられる。

2.4 考察

2.4.1 サンプルの準備

AFM によって生体材料のような柔らかい試料を観察するには、観察に適した試料作製が不可欠である。以前にも我々は、単離した prestin 発現 CHO 細胞の細胞膜内側を AFM で観察したが、その際には、高さ 100 nm 程度の大きな構造物が存在していた [13]。このような大きな構造物は、AFM による prestin の高解像度での可視化の妨げになった。また、一般に試料が平らであればあるほど、AFM の試料として適している。そこで本研究では、細胞膜の単離方法を以前のそれから変更した。以前までは、CHO 細胞をガラスベースディッシュに播種後、5 分間細胞外溶液に浸し、超音波破碎を行うことで、細胞膜を単離した。一方今回は、CHO 細胞をガラスベースディッシュに播種後、一晚 37°C でインキュベートし、その後に細胞膜単離を行った。一晚インキュベートすることで、細胞はより平らになり、細胞膜単離後、100 nm の高さの構造物はほとんど見られなくなった (図 5B)。

細胞膜単離により、露出された細胞膜内側には、細胞骨格、表在性膜タンパク質および内在性膜タンパク質が多く存在している。Prestin の大きさは、その分子量 (~82 kD) から見積もると、およそ直

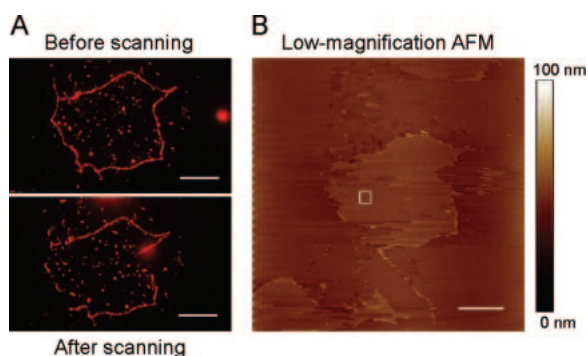


図5. Isolated Inside-out plasma membrane of the prestin-transfected CHO cell. A. Fluorescence image of Qdots labeling prestin. Fluorescence of Qdots was observed before and after scanning with the AFM, indicating that the existence of Qdots on the scanned area. B. Low magnification AFM image. Scale bars are 10 μ m.

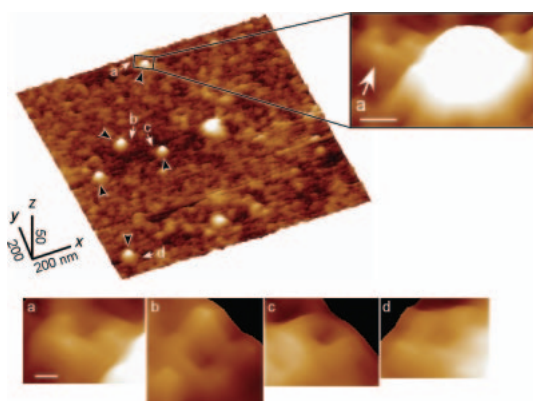


図6. High-magnification 3-D AFM images of prestin on the plasma membrane of the prestin-transfected CHO cells. Qdots were indicated by black arrowheads. A squarish ring-like structure with four peaks and one valley at its center, possibly corresponding to a prestin molecule, was observed in the vicinity of the Qdot (white arrow). Similar structures were observed at the location indicated by arrows (a-d). Scale bars at the right and bottom are 20 and 10 nm, respectively. Reprinted from [18] with the kind permission of Springer Science+Business Media.

径 7 nm である。従って、これらのタンパク質の存在は、prestins の観察の妨げになることが考えられる。そこで、高塩濃度溶液及び prestins の活性を阻害しないことが知られているトリプシンで細胞骨格及びその他のタンパク質を試料から除去することを試みた。Prestin が細胞膜単離処理、高塩濃度溶液処理及びトリプシン処理後も細胞膜に存在するかを、Qdot の蛍光を観察することで確認した。その結果、Qdot の蛍光は、prestins 発現 CHO 細胞からは確認されたが、通常の CHO 細胞からは確認さ

れなかった。この結果は、AFM で観察した試料に prestin が存在していることを示す。

2. 4. 2 Prestin の構造

以前の研究では、AFM で観察した prestin 発現 CHO 細胞膜上の構造物の中で、どれが prestin であるかを特定できなかった。そこで、本研究では、Qdot をマーカーとして、prestins を細胞膜上で特定し、その構造を可視化することを試みた。Prestin の N 末端に 1 次抗体が結合し、Qdot 標識 2 次抗体がその 1 次抗体に結合することを考慮すると、prestins と Qdot の間の距離は最大 50 nm と見積もることができる。AFM のカンチレバーの先端形状を考慮し、Qdot の中心から、66.5 nm 以内に存在する構造物を prestin とみなした。

図 6 に示すように、高さ 8 nm である Qdot が prestin 発現細胞の細胞膜内側に明瞭に確認できた。Qdot 近傍の高倍率画像を見ると、直径 10 nm 程度で、4 つのピークと中心部に一つの窪みを持つ、リングのような形をした構造物を確認できる。同様の構造物は、その他の試料からも観察できた。Prestin と考えられるこの構造物の形状、すなわち 4 つのピークは、prestins が CHO 細胞の細胞膜上で、4 量体を形成していることを示唆する。

本研究では、prestins を AFM で観察することを試みたのに対し、2007 年に Mio らは透過型電子顕微鏡で観察した[19]。彼らは、prestins は小さな空洞を中心部に持つ弾丸形状をしていると報告した。Mio らの結果と、我々の本研究で得た結果は大きく異なっている。その違いは観察手法の違いに起因する可能性がある。本研究では、バネ定数が 0.02 N/m のカンチレバーを利用し、prestins を観察した。試料を観察する間、カンチレバーと試料との距離は、カンチレバーの振動振幅が 2-5 nm 程度減少するように保たれる。つまり、フックの法則から、試料には 40-100 pN の力が付加されていたと考えられる。タンパク質はそのような力で変形する可能性が示唆されている。一方、透過型電子顕微鏡による観察では、試料に力は付加されない。Prestin の細胞質内ドメインの柔軟さを仮定すると、我々の実験において prestins の細胞質内ドメインがカンチレバーにより prestins の内部に押し込まれた可能性がある [20]。この変形が、Mio らの結果と本研究のその違いの原因の一つかもしれない。一方で、本研究では、細胞膜に発現している prestins を観察しているのに対し、Mio らは、prestins を細胞から界

面活性剤で可溶化し、溶液中の prestin を観察した。溶液中に存在する prestin が細胞膜上と同じ正しい構造をとっているとは限らない。試料の状態の違いが、観察された prestin の構造の違いの原因である可能性もある。

2.5 結言

Qdot 標識した prestin を高倍率で AFM 観察し、Qdot 近傍に、中央にくぼみがあり、4 つのドメインから構成された粒子状構造物を確認した。このことは、prestina が四量体の Ring-like 構造である可能性を示唆している。

3. ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬による好酸球性白血病細胞の好酸球への分化誘導

3.1 研究背景

細胞の分化には様々な遺伝子の発現が関与しており、クロマチン構造の変化はその制御に重要な役割を果たしている。クロマチンは、ヒストン H2A, H2B, H3 および H4 のそれぞれ 2 分子からなる 8 量体に 146 塩基対の DNA が 1.75 回巻き付いたヌクレオソーム構造にヒストン H1 や非ヒストン蛋白質などが結合したものが数珠状に連なった高次構造をとる [21]。各ヒストンの N 末端に存在するリジン残基は可逆的にヒストンアセチル化酵素 (HAT) およびヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) によってアセチル化および脱アセチル化される [21]。ヒストンが HAT によってアセチル化されるとクロマチン構造が変化し、基本転写因子や RNA ポリメラーゼなどがプロモーター上に結合できるようになるため、遺伝子の転写が活性化される [21]。従って、HAT および HDAC によるヒストンのアセチル化および脱アセチル化は遺伝子の発現に重要であると考えられている。

HDAC 阻害薬は、HDAC 活性を抑制することにより HAT によってアセチル化された蛋白質の脱アセチル化を阻害する薬物であり、*in vitro* および *in vivo* において腫瘍細胞の増殖抑制作用、アポトーシス誘導作用および分化誘導作用などを持つことが報告されている [22]。これまでにいくつかの HDAC 阻害薬が同定されている (図 7)。

好酸球の分化機構は EoL-1 細胞や HL-60 clone 15 細胞などの細胞株を用いて解析されてきた [23, 24]。EoL-1 細胞は 1985 年に好酸球性白血病の患者から

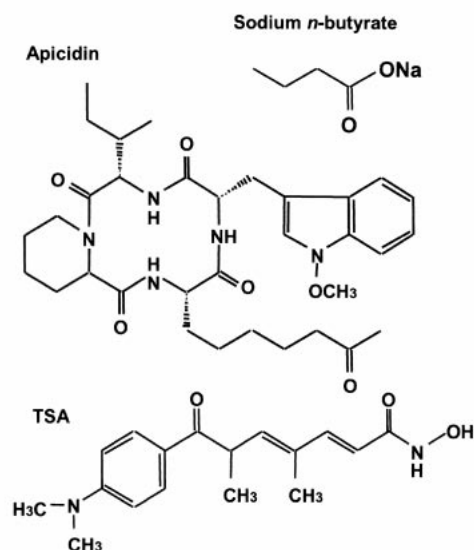


図 7. Chemical structures of sodium *n*-butyrate, apicidin and TSA.

樹立された細胞株で、*n*-butyrate によって好酸球へ分化することが報告されている [25]。しかし、*n*-butyrate による分化誘導機序は HDAC 阻害作用であるためなのかは不明であった。そこで、EoL-1 細胞の好酸球分化誘導に対する HDAC 阻害薬の作用を解析した。

3.2 実験方法

3.2.1 細胞培養

好酸球性白血病細胞 EoL-1 細胞 (5×10^4 cells/ml) を各種濃度の HDAC 阻害薬 apicidin, TSA あるいは *n*-butyrate を含む 10% (v/v) FBS 含有 RPMI-1640 medium (pH 7.8) 中で、37°C, 5% CO₂ 存在下で一定時間培養した。

3.2.2 細胞数の測定

EoL-1 細胞を各種濃度の HDAC 阻害薬存在下で一定時間培養した後、細胞を回収し、血球計算盤を用いて細胞数を計測した。

3.2.3 Western blotting

電気泳動は 15% (w/v) ポリアクリルアミドゲルを用い 125 V の定電圧で約 2 時間泳動した。泳動終了後、ゲル中のタンパク質を 250 mA の定電流

で 1 時間ニトロセルロース膜に転写した．抗体の非特異的吸着を避けるためにブロッキングを行った後，一次抗体の溶液に浸して 4℃ で一晩反応させた．次いで，ビオチン化二次抗体の溶液に 4℃ で 3 時間浸した．その後，ABC-kit solution に 30 分間浸し，膜を Western lightning chemiluminescence reagent plus を用いて化学発光させてフィルムに露光し目的の蛋白質を検出した．BCIP/NBT 溶液で発色させる場合は，アルカリフォスファターゼ標識二次抗体の溶液に 4℃ で 3 時間浸してから発色させた．

3.2.4 Flowcytometry

細胞の生存率を解析する場合は，7-AAD solution 存在下で 10 分間インキュベートした．CCR3 を解析する場合は，phycoerythrin 標識 anti-CCR3 mAb 存在下で 30 分間インキュベートした．それぞれの蛍光は FACSscan により解析した．

3.2.5 統計処理

棄却検定は Thompson's F-test により，有意差検定は Dunnett's test により行った．

3.3 結果

3.3.1 EoL-1 細胞の生存に対する HDAC 阻害薬の効果

HDAC 阻害薬が EoL-1 細胞の増殖を抑制するかどうかを明らかにする目的で，EoL-1 細胞を apicidin, TSA あるいは *n*-butyrate で一定時間培養し細胞数を計測した．その結果，EoL-1 細胞を HDAC 阻害薬非存在下で 8 日間培養すると細胞数は経時的に増加した (図 8)．しかし，100 nM の apicidin あるいは 500 μ M の *n*-butyrate 存在下で培養すると，細胞数の増加は 8 日目まで有意に抑制された (図 8)．一方，30 nM の TSA 存在下で培養した場合，細胞数の増加は 4 日目まで有意に抑制されたが，それ以降では経時的に増加し培養 6 および 8 日目では HDAC 阻害薬非存在下で培養した場合と比較して差は認められなかった (図 8)．従って，100 nM の apicidin および 500 μ M の *n*-butyrate は EoL-1 細胞の増殖を持続的に抑制し，30 nM の TSA は一過的に抑制することが示唆された．

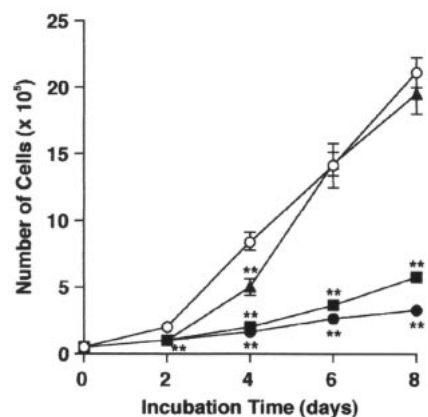


図 8. Effects of apicidin, TSA, and *n*-butyrate on the growth of EoL-1 cells. EoL-1 cells were incubated for the periods indicated at 37°C in the absence (open circles) or presence of 100 nM apicidin (closed circles), 30 nM TSA (closed triangles), or 500 μ M *n*-butyrate (closed squares). Values are the means from three samples with the S.E.M. Statistical significance: ** p < 0.01 vs. the corresponding control.

3.3.2 EoL-1 細胞の生存に対する HDAC 阻害薬の効果

HDAC 阻害薬が EoL-1 細胞の生存率を低下させるかどうかを明らかにする目的で，EoL-1 細胞を各種濃度の apicidin, TSA あるいは *n*-butyrate 存在下で 24 時間培養し，7-AAD を用いて flowcytometry 法により EoL-1 細胞の生存率を解析した．その結果，300 nM 以上の濃度の apicidin および 100 nM の TSA は生存率を有意に低下させた (図 9)．従って，100 nM 以下の apicidin, 30 nM 以下の TSA および 500 μ M の *n*-butyrate は EoL-1 細胞に対して細胞毒性を示さないことが示唆された．

3.3.3 ヒストン H4 のアセチル化に対する HDAC 阻害薬の効果

Apicidin, TSA および *n*-butyrate が EoL-1 細胞のヒストン H4 をアセチル化するかどうかを明らかにする目的で，ヒストン H4 の N 末端から 5, 8, 12 および 16 番目のリジン残基のアセチル化を認識する抗体を用いてアセチル化ヒストン H4 を Western blot 法により検出した．なお，actin は internal control として検出した．細胞を各種 HDAC 阻害薬を含む培養液で 8 日間連続して培養した結果，100 nM の apicidin および 500 μ M の *n*-butyrate は間後をピークに上昇し，その後減弱してもとの状態に戻った (図 10)．従って，ヒストン H4 は

apicidin および *n*-butyrate によって持続的にアセチル化され、TSA では一過的であることが示唆された。

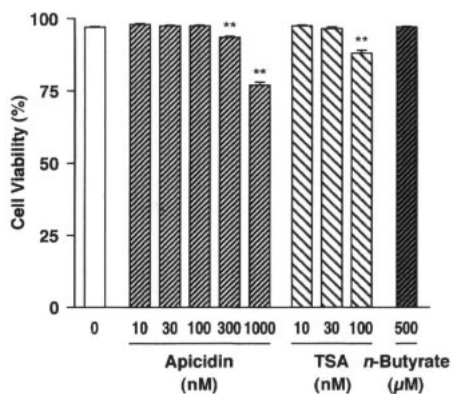


図 9. Effects of apicidin, TSA, and *n*-butyrate on the viability of EoL-1 cells. EoL-1 cells were incubated for 1 day at 37°C in medium containing the indicated concentration of apicidin, TSA, or *n*-butyrate. The viability of the cells was determined by flowcytometry using 7-AAD. Values are the means from three samples with the S.E.M. Statistical significance: ** $p < 0.01$ vs. the control.

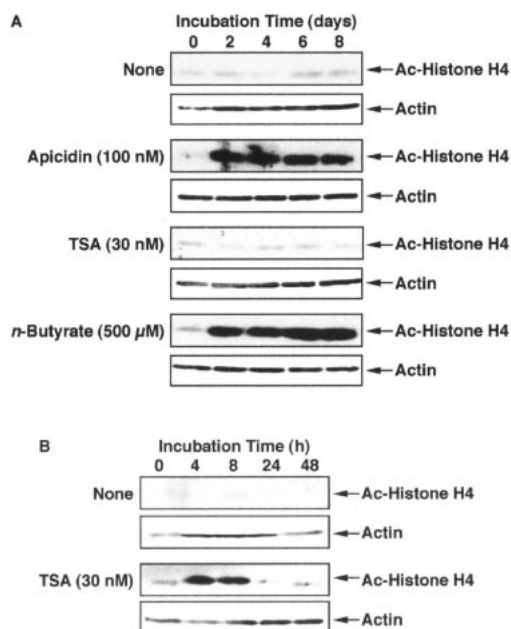


図 10. Effects of apicidin, TSA, and *n*-butyrate on the acetylation of the histone H4. EoL-1 cells were incubated for the periods indicated at 37°C in the presence or absence of apicidin (100 nM), TSA (30 nM), or *n*-butyrate (500 μM). The experiment shown is a representative of 3 independent experiments.

3.3.4 p27^{Kip1} の発現に対する HDAC 阻害薬の効果

Cyclin-dependent kinase inhibitor である p27^{Kip1} は、G₁ 期での細胞周期の停止に重要な役割を示すことが報告されている [26]. そこで、HDAC 阻害薬が p27^{Kip1} 蛋白質量を増加させるかどうかを明らかにする目的で、Western blot 法により p27^{Kip1} の発現量を解析した. その結果、100 nM の apicidin および 500 μM の *n*-butyrate は p27^{Kip1} を 2 日目から 8 日目にかけて持続的に発現させた (図 11A). 一方、30 nM の TSA で培養した細胞では p27^{Kip1} の発現量は 24 時間後をピークに上昇し、その後減弱した (図 11). 従って、100 nM の apicidin および 500 μM の *n*-butyrate は p27^{Kip1} の発現量を持続的に増加させ、30 nM の TSA は一過的に増加させることが示唆された。

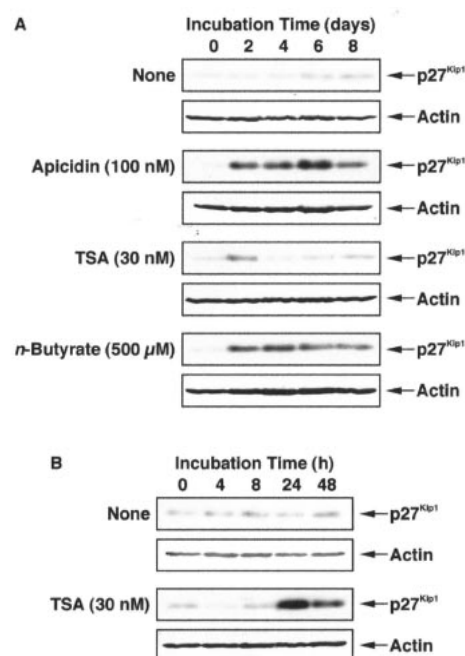


図 11. Effects of apicidin, TSA, and *n*-butyrate on the expression of p27^{Kip1} in EoL-1 cells. EoL-1 cells were incubated at 37°C for the periods indicated in the presence or absence of apicidin (100 nM), TSA (30 nM), or *n*-butyrate (500 μM). The experiment shown is a representative of 3 independent experiments.

3.3.5 CCR3 の発現に対する HDAC 阻害薬の効果

成熟好酸球にはケモカインレセプターである CCR3 が発現していることが報告されている [27]. そこで、HDAC 阻害薬が EoL-1 細胞表面上の CCR3 の発現を変化させるかどうかを解析した. EoL-1 細胞を各種 HDAC 阻害薬で 8 日間培養した結果、100

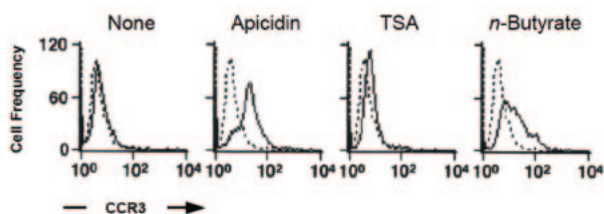


図 12. Effects of apicidin, TSA, and *n*-butyrate on the differentiation of EoL-1 cells into eosinophils. EoL-1 cells were incubated for 8 days at 37°C in medium containing the indicated concentration of apicidin, TSA, or *n*-butyrate. The expression of CCR3 was determined by flowcytometry. Dotted and solid lines represent the histogram before and after incubation with the drug, respectively. The experiment shown is a representative of 3 independent experiments.

nM の apicidin あるいは 500 μ M の *n*-butyrate は培養開始前と比較して細胞表面上の CCR3 の発現量を増加させた (図 12). 一方, 30 nM の TSA で培養した細胞では変化がなかった (図 12).

3. 4 考 察

EoL-1 細胞は *n*-butyrate 存在下で培養すると好酸球へ分化することが報告されている [23,25] が, *n*-butyrate による HDAC 阻害作用が分化誘導作用に関与しているのかどうかは明らかにされていなかった. HL-60 clone 15 細胞も EoL-1 細胞と同様に *n*-butyrate によって好酸球に分化する細胞である [28] が, 当研究室では *n*-butyrate による HL-60 clone 15 細胞の好酸球への分化誘導機序を解析し, *n*-butyrate が HDAC を持続的に抑制することにより HAT によるヒストンのアセチル化を持続させる結果, HL-60 clone 15 細胞が好酸球に分化すること, および apicidin や *n*-butyrate のようにヒストンのアセチル化を持続的に誘導する HDAC 阻害薬は HL-60 clone 15 細胞を好酸球に分化させる作用を持つことを明らかにした [29]. そこで本研究では, *n*-butyrate による EoL-1 細胞の好酸球への分化誘導作用にも持続的なヒストンのアセチル化が関与するかどうかを明らかにすることを目的として解析した. その結果, apicidin および *n*-butyrate はヒストン H4 を持続的にアセチル化したのに対して TSA の作用は一過的であった (図 3). また, apicidin および *n*-butyrate は細胞周期を負に制御する p27^{Kip1} の発現を持続的に誘導して細胞の増殖を抑制した (図 8, 11). さらに, 好酸球の分化マーカー CCR3 の発現を解析した結果, これらのマーカーは apicidin および *n*-butyrate によって有意に増加した (図 13).

しかし, TSA ではこのような好酸球への分化は起こらなかった (図 8, 10–12). 従って, EoL-1 細胞の好酸球への分化誘導作用にも持続的なヒストンのアセチル化が関与していることが示唆された.

ヒト HDAC は酵母 HDAC の配列に対する相同性によりクラス I (HDAC 1, 2, 3 および 8), クラス II (HDAC 4, 5, 6, 7, 9 および 10), およびクラス III (HDAC 11) に分類され, TSA はクラス I およびクラス II HDAC を抑制し, *n*-butyrate はクラス I および HDAC 6 と 10 を除くクラス II HDAC を抑制することが報告されている [21]. Apicidin および *n*-butyrate による HDAC 阻害作用は可逆的であることが報告されている [29]. 従って, apicidin および *n*-butyrate による HDAC 阻害作用が持続したことは, これらの化合物が培養期間中に代謝されずに存在し, 一方, TSA の場合は代謝されて不活性体になるため [30] に一過的な作用しか発現しないことが考えられる. HL-60 clone 15 細胞は TSA を細胞培養系に繰り返し添加することによってヒストンを持続的にアセチル化させると好酸球に分化すること [29] から, TSA と *n*-butyrate はほぼ同じような作用を示すものの TSAの方が apicidin や *n*-butyrate よりも代謝速度が速いため, 本研究結果のように分化誘導作用に違いが見られたと考えられる.

本研究では, 好酸球性白血病細胞が HDAC 阻害薬によって好酸球に分化することを示した. しかし, HDAC 阻害薬は様々な細胞の分化を誘導することが報告されている [31]. Apicidin は EoL-1 細胞や HL-60 clone 15 細胞を好酸球に分化させる作用を持つほか, 赤芽球系白血病細胞株 K562 細胞を赤血球に分化させる作用, 前骨髄球性白血病細胞株 HL-60 細胞を CD11b を発現するような細胞に初期分化させる作用を持つ. また, HDAC 阻害薬として最近報告された valproic acid は単球性白血病細胞株 U937 細胞を単球に, 初代神経幹細胞を神経細胞に分化させる. しかし, K562 細胞の分化は apicidin だけではなく MS-275 によっても誘導され, 赤芽球系白血病細胞株 MEL 細胞の赤血球への分化は *n*-butyrate や TSA によっても誘導されることが報告されている. さらに, EoL-1 細胞や HL-60 clone 15 細胞は apicidin や *n*-butyrate によって好酸球へ分化する. 従って, HDAC 阻害薬は様々な細胞の分化を誘導するが, その細胞の分化は HDAC 阻害薬の種類に依存せず, 細胞の種類に依存した分化をするため, このような HDAC 阻害薬による細胞の分化誘導作用はヒストンのアセチル化だけではなく細胞特異的な内因性の因子によっても制御されている可能性がある.

3.5 結 言

本研究において、EoL-1 細胞の好酸球への分化に対する HDAC 阻害薬の作用を解析した結果、持続的にアセチル化を誘導する apicidin および *n*-butyrate には EoL-1 細胞を好酸球に分化させる作用があるが、一過的なアセチル化しか誘導しない TSA では好酸球への分化が起こらないことを明らかにした。この作用は HL-60 clone 15 細胞を用いた場合と同様であり、好酸球性白血病細胞は持続的なアセチル化を誘導することによって好酸球に分化することが示唆された。本研究成果は、生体内での好酸球の分化機構の解明のみならず、好酸球性白血病の機序解明や治療薬開発に貢献できると考えられる。

謝 辞

本研究の一部は、グローバル COE「新世紀世界の成長焦点に築くナノ医工学拠点」、科学研究費補助金特定領域研究（課題番号 15086202）、基盤研究（B）（課題番号 18390455, 20390439）、萌芽研究（課題番号 18659495）、日本学術振興会特別研究員奨励費（課題番号 19002194, 19001898）を受けていることを報告し謝意を表します。

文 献

[1] Brownell WE, Bader CR, Bertrand D, and de Ribaupierre Y. Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science* **227**, 194-196, 1985.

[2] Kachar B, Brownell WE, Altschuler R, and Fex J. Electrokinetic shape changes of cochlear outer hair cells. *Nature* **322**, 365-368, 1986.

[3] Ashmore JF. A fast motile response in guinea-pig outer hair cells: the cellular basis of the cochlear amplifier. *J Physiol* **388**, 323-347, 1987.

[4] Santos-Sacchi J and Dilger JP. Whole cell currents and mechanical responses of isolated outer hair cells. *Hear Res* **35**, 143-150, 1988.

[5] Zheng J, Shen W, He DZ, Long KB, Madison LD, and Dallos P. Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature* **405**, 149-155, 2000.

[6] Liberman MC, Gao J, He DZZ, Wu X, Jia S, and Zuo j. Prestin is required for electromotility of the outer

hair cell and the cochlear amplifier. *Nature* **419**, 300-304, 2002.

[7] Dallos P, Wu X, Cheatham MA, Gao J, Zheng J, Anderson CT, Jia S, Wang X, Cheng WH, Sengupta S, He DZZ, and Zuo J. Prestin-based outer hair cell motility is necessary for mammalian cochlear amplification. *Neuron* **58**, 333-339, 2008.

[8] Arima T, Kuraoka A, Toriya R, Shibata Y, and Uemura T. Quick-freeze, deep-etch visualization of the 'cytoskeletal spring' of cochlear outer hair cells. *Cell Tissue Res* **263**, 91-97, 1991.

[9] Forge A. Structural features of the lateral walls in mammalian cochlear outer hair cells. *Cell Tissue Res* **265**, 473-483, 1991.

[10] Kalinec F, Holley MC, Iwasa KH, Lim DJ, and Kachar B. A membrane-based force generation mechanism in auditory sensory cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 8671-8675, 1992.

[11] Souter M, Nevill G, and Forge A. Postnatal development of membrane specialisations of gerbil outer hair cells. *Hear Res* **91**, 43-62, 1995.

[12] Le Grimellec C, Giocondi MC, Lenoir M, Vater M, Sposito G, and Pujol R. High-resolution three-dimensional imaging of the lateral plasma membrane of cochlear outer hair cells by atomic force microscopy. *J Comp Neurol* **451**, 62-69, 2002.

[13] Murakoshi M, Gomi T, Iida K, Kumano S, Tsumoto K, Kumagai I, Ikeda K, Kobayashi T, and Wada H. Imaging by atomic force microscopy of the plasma membrane of prestin-transfected Chinese hamster ovary cells. *J Assoc Res Otolaryngol* **7**, 267-278, 2006.

[14] Iida K, Konno K, Oshima T, Tsumoto K, Ikeda K, Kumagai I, Kobayashi T, and Wada H. Stable expression of the motor protein prestin in Chinese hamster ovary cells. *JSME Int J* **46C**, 1266-1274, 2003.

[15] Iida K, Tsumoto K, Ikeda K, Kumagai I, Kobayashi T, and Wada H. Construction of an expression system for the motor protein prestin in Chinese hamster ovary cells. *Hear Res* **205**, 262-270, 2005.

[16] Hartmann WK, Saptharishi N, Yang XY, Mitra G, and Soman G. Characterization and analysis of thermal denaturation of antibodies by size exclusion high-performance liquid chromatography with quadruple detection. *Anal Biochem* **325**, 227-239, 2004.

[17] Hertadi R, Gruswitz F, Silver L, Koide A, Koide S, Arakawa H, and Ikai A. Unfolding mechanics of multiple

- OspA substructures investigated with single molecule force spectroscopy. *J Mol Biol* **333**, 993-1002, 2003.
- [18] Murakoshi M, Iida K, Kumano S, and Wada H. Immune atomic force microscopy of prestin-transfected CHO cells using quantum dot. *Pflüger Archiv* (in press).
- [19] Mio K, Kubo Y, Ogura T, Yamamoto T, Arisaka F, and Sato C. The motor protein prestin is a bullet-shaped molecule with inner cavities. *J Biol Chem* **283**, 1137-1145, 2008.
- [20] Janovjak H, Kedrov A, Cisneros DA, Sapra KT, Struckmeier J, and Muller DJ. Imaging and detecting molecular interactions of single transmembrane proteins. *Neurobiol Aging* **27**, 546-561, 2006.
- [21] Csordas A. On the biological role of histone acetylation. *Biochem J* **265**, 23-38, 1990.
- [22] Villar-Garea A and Esteller M. Histone deacetylase inhibitors: understanding a new wave of anticancer agents. *Int J Cancer* **112**, 171-178, 2004.
- [23] Izumi T, Kishimoto S, Takano T, Nakamura M, Miyabe Y, Nakata M, Sakanaka C, and Shimizu T. Expression of human platelet-activating factor receptor gene in EoL-1 cells following butyrate-induced differentiation. *Biochem J* **305**, 829-835, 1995.
- [24] Hara K, Hasegawa T, Ooi H, Koya T, Tanabe Y, Tsukada H, Igarashi K, Suzuki E, Arakawa M, and Gejyo F. Inhibitory role of eosinophils on cell surface plasmin generation by bronchial epithelial cells: inhibitory effects of transforming growth factor β . *Lung* **179**, 9-20, 2001.
- [25] Saito H, Bourinbaiar A, Ginsburg M, Minato K, Ceresi E, Yamada K, Machover D, Breard J, and Mathe G. Establishment and characterization of a new human eosinophilic leukemia cell line. *Blood* **66**, 1233-1240, 1985.
- [26] Johnson DJ and Walker CL. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**, 295-312, 1999.
- [27] Heath H, Qin S, Rao P, Wu L, LaRosa G, Kassam N, Ponath PD, and Mackay CR. Chemokine receptor usage by human eosinophils. The importance of CCR3 demonstrated using an antagonistic monoclonal antibody. *J Clin Invest* **99**, 178-184, 1997.
- [28] Fischkoff SA and Condon ME. Switch in differentiative response to maturation inducers of human promyelocytic leukemia cells by prior exposure to alkaline conditions. *Cancer Res* **45**, 2065-2069, 1985.
- [29] Ishihara K, Hong J, Zee O, and Ohuchi K. Possible mechanism of action of the histone deacetylase inhibitors for the induction of differentiation of HL-60 clone 15 cells into eosinophils. *Br J Pharmacol* **142**, 1020-1030, 2004.
- [30] Komatsu Y, Tomizaki K, Tsukamoto M, Kato T, Nishino N, Sato S, Yamori T, Tsuruo T, Furumai R, Yoshida M, Horinouchi S, and Hayashi H. Cyclic hydroxamic-acid-containing peptide 31, a potent synthetic histone deacetylase inhibitor with antitumor activity. *Cancer Res* **61**, 4459-4466, 2001.
- [31] Ishihara K, Hong J, Zee O, and Ohuchi K. Mechanism of the eosinophilic differentiation of HL-60 clone 15 cells induced by n-butyrate. *Int Arch Allergy Immunol* **137**(Suppl 1), 77-82, 2005.