

に深謝する。また、同種移植の研究は奈良県立医科大学整形外科の先生方との共同により行った。

- 1) Caplan, A.I. (1991) *J. Orthop. Res.*, 9(5), 641-650.
- 2) Ohgushi, H. & Caplan, A.I. (1999) *J. Biomed. Mater. Res.*, 48, 913-927.
- 3) Dezawa, M., Kanno, H., Hoshino, M., Cho, H., Matsumoto, N., Itokazu, Y., Tajima, N., Yamada, H., Sawada, H., Ishikawa, H., Mimura, T., Kitada, M., Suzuki, Y., & Ide, C. (2004) *J. Clin. Invest.*, 113(12), 1701-1710.
- 4) Theise, N.D., Nimmakayalu, M., Gardner, R., Illei, P.B., Morgan, G., Teperman, L., Henegariu, O., & Krause, D.S. (2000) *Hepatology*, 32, 11-16.
- 5) Ikeda, E., Yagi, K., Kojima, M., Yagyuu, T., Ohshima, A., Sobajima, S., Tadokoro, M., Katsube, Y., Isoda, K., Kondoh, M., Kawase, M., Go, M.J., Adachi, H., Yokota, Y., Kirita, T., & Ohgushi, H. (2008) *Differentiation*, 76, 495-505.
- 6) Nagaya, N., Fujii, T., Iwase, T., Ohgushi, H., Itoh, T., Uematsu, M., Yamagishi, M., Mori, H., Kangawa, K., & Kitamura, S. (2004) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 287(6), 2670-2676.
- 7) Nagaya, N., Fujii, T., Iwase, T., Ohgushi, H., Itoh, T., Uematsu, M., Yamagishi, M., Mori, H., Kangawa, K., & Kitamura, S. (2005) *Circulation*, 112, 1128-1135.
- 8) Kagiwada, H., Yashiki, T., Ohshima, A., Tadokoro, M., Nagaya, N., & Ohgushi, H. (2008) *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 2(4), 184-189.
- 9) Akahane, M., Ohgushi, H., Yoshikawa, T., Sempuku, T., Tamai, S., Tabata, S., & Dohi, Y. (1999) *J. Bone Miner. Res.*, 14, 561-568.
- 10) Arinze, T.L., Peter, S.J., Archambault, M.P., van den Bos, C., Gordon, S., Kraus, K., Smith, A., & Kadiyala, S. (2003) *J. Bone Joint. Surg. Am.*, 85-A, 1927-1935.
- 11) Aggarwal, S. & Pittenger, M.F. (2005) *Blood*, 105, 1815-1822.
- 12) Tateishi-Yuyama, E., Matsubara, H., Murohara, T., Ikeda, U., Shintani, S., Masaki, H., Amano, K., Kishimoto, Y., Yoshimoto, K., Akashi, H., Shimada, K., Iwasaka, T., & Imaizumi, T. (2002) *Lancet*, 360, 427-435.
- 13) Asahara, T. & Kawamoto, A. (2004) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 287(3), C572-579.
- 14) Kotobuki, N., Hirose, M., Takakura, Y., & Ohgushi, H. (2004) *Artif. Organs*, 28(1), 33-39.
- 15) Makino, S., Fukuda, K., Miyoshi, S., Konishi, F., Kodama, H., Pan, J., Sano, M., Takahashi, T., Hori, S., Abe, H., Hata, J., Umezawa, A., & Ogawa, S. (1999) *J. Clin. Inv.*, 103, 697-705.
- 16) Nishiyama, N., Miyoshi, S., Hida, N., Uyama, T., Okamoto, K., Ikegami, Y., Miyado, K., Segawa, K., Terai, M., Sakamoto, M., Ogawa, S., & Umezawa, A. (2007) *Stem Cells*, 25(8), 2017-2024.
- 17) Akahane, M., Ohgushi, H., Kuriyama, S., Akahane, T., & Takakura, Y. (2002) *J. Orthop. Sci.*, 7, 677-682.
- 18) Ohgushi, H., Kotobuki, N., Funaoka, H., Machida, H., Hirose, M., Tanaka, Y., & Takakura, Y. (2005) *Biomaterials*, 26, 4654-4661.
- 19) Morishita, T., Honoki, K., Ohgushi, H., Kotobuki, N., Ma-

tsushima, A., & Takakura, Y. (2006) *Artif. Organs*, 30(2), 115-118.

20) Kotobuki, N., Katsube, Y., Katou, Y., Tadokoro, M., Hirose, M., & Ohgushi, H. (2008) *Cell Transplant.*, 17(6), 705-712.

21) Go, M.J., Takenaka, C., & Ohgushi, H. (2008) *Exp. Cell Res.*, 314(5), 1147-1154.

大串 始

(産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門)

Basic science and clinical applications of mesenchymal stem cells

Hajime Ohgushi (Research Institute for Cell Engineering (RICE), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 3-11-46 Nakouji, Amagasaki City, Hyogo 661-0974, Japan)

## 炎症に關与する酸化脂質メディエーター

### はじめに

リン脂質やコレステロールエステルなどを構成する多価不飽和脂肪酸は酸化に最も鋭敏な生体構成成分であり、プロスタグランジンなどの生理活性脂質の起源であることはいうまでもない。一方、生体における脂肪酸の酸化反応は酵素反応を介した合目的なものに限らず、フリーラジカル連鎖反応を介する脂質過酸化反応のように、脂肪酸の酸化的分解により短鎖アルデヒドなど様々な酸化物を生成する反応も含まれる。これまでの研究から、プロスタグランジンのような生理活性脂質だけでなく、こうした脂質過酸化反応によって生成される化合物の多くが細胞応答誘発作用を示す脂質メディエーターになりうるということが明らかになってきた。一方、最近筆者らはn-6系多価不飽和脂肪酸に由来した短鎖アルデヒドの一つである4-ヒドロキシ-2-ノネナール(HNE)が、マクロファージなどにおいてプロスタノイド合成の律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)の遺伝子発現を特異的に誘導することを見いだした。また、その誘導機構の解析過程において、HNEによるCOX-2の誘導には細胞培養に用いる血清成分が必須であることを見いだした。さらに、同定された血清成分は、以前より動脈硬化症発症の初期過程におけるマクロファージ泡沫化への関与が示唆されてきた分子であった。本ミニレビューは、COX-2誘導分子としてのHNEの発見から、血清成分の同定、さらにHNEと血清成分が協調し

て活性化するシグナル伝達機構の確立に至る一連のストーリーである。

1. COX-2を誘導する酸化脂質メディエーター

COX-2はプロスタノイドの生成過程における律速酵素であり、COX-2の過剰な発現は炎症反応の亢進をもたらすものと考えられている<sup>1)</sup>。炎症と関わりの深い動脈硬化

症などの病態においてその発現の亢進が免疫組織化学的に確認されているが、興味深いのはその局在であり、動脈硬化病巣では泡沫細胞に発現がみられる。従って、当初からマクロファージ泡沫化の一因とされる低密度リポタンパク質(LDL)との関連性が示唆されてきた。LDLはその高い多価不飽和脂肪酸含量のため酸化されやすく、泡沫細胞においてもこれまでに酸化LDLに起因すると思われる

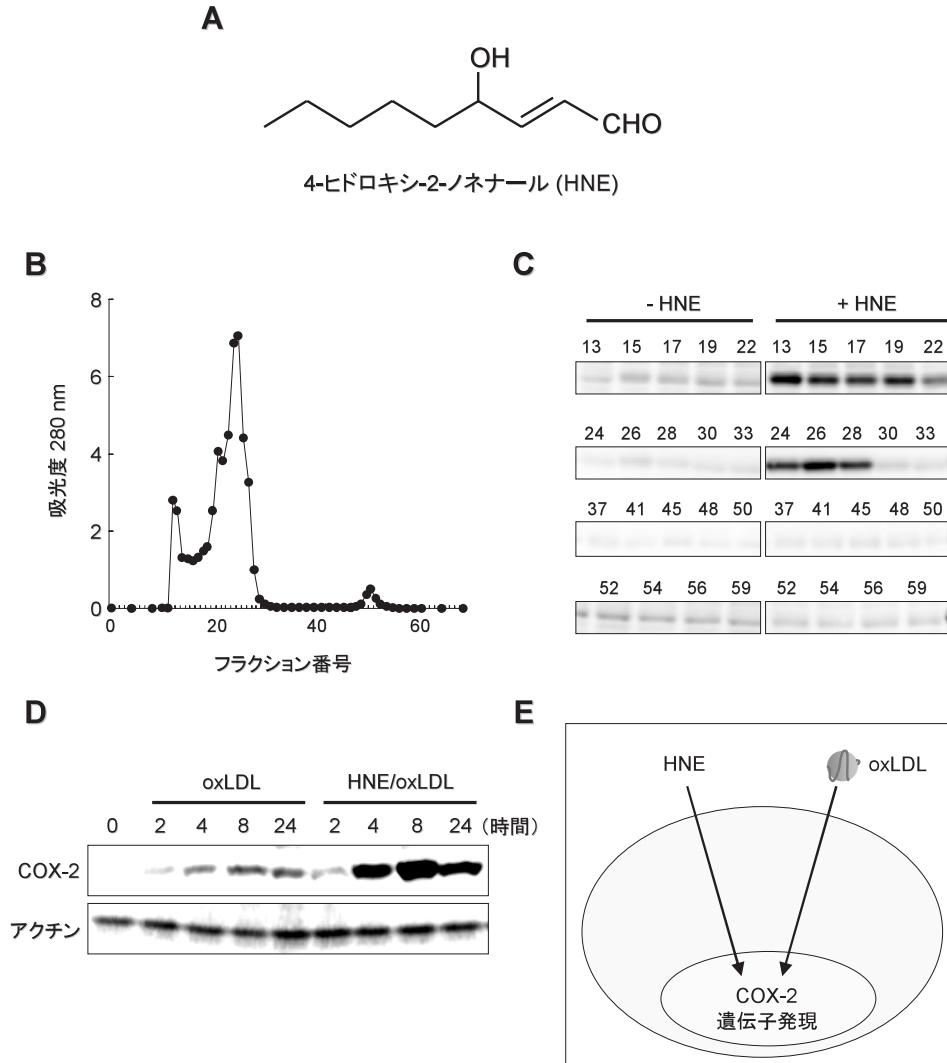


図1 HNEによるCOX-2誘導に必要な血清成分の同定  
 (A)HNEの化学構造。(B)ゲル濾過によるヒト血清の分画。カラム:Hi Prep 16/60 Sephacryl S-300, 溶出液:PBS, 溶出速度:0.5 ml/min, 検出:280 nm。各フラクション3 ml ずつ分画。  
 (C)ゲル濾過フラクションのCOX-2誘導活性。HNE(50 μl)存在下及び非存在下において、各フラクションのCOX-2誘導活性を調べた。(D)HNE存在下における酸化LDLによるCOX-2誘導。HNE(50 μl)存在下及び非存在下において、酸化LDL(100 μg/ml)を細胞に投与し、4時間後COX-2誘導活性を調べた。(E)この段階までに判明したCOX-2誘導機構。HNEと酸化LDLは独立して細胞に作用することが明らかになった。

様々な酸化脂質の生成蓄積に関する報告がなされてきている。従って、酸化LDL成分がCOX-2誘導に関わっているとしても何ら不思議ではない。そこで筆者らはマクロファージ細胞株RAW264.7を用い、既知の酸化脂質についてCOX-2誘導物質をスクリーニングしたところ、HNEにのみ著しいCOX-2誘導活性を見いだした<sup>2)</sup>。HNEはリノール酸やアラキドン酸などのn-6系多価不飽和脂肪酸を生成源とするアルデヒドであり(図1A)、その生体分子との高い反応性や細胞応答感受性などから、これまでの脂質過酸化反応生成物の中でも最もよく研究されてきている化合物である<sup>3,4)</sup>。

HNEによるCOX-2誘導は、肝細胞などの細胞株でも観察される<sup>5)</sup>。また、動物(マウス)を用いた腹腔内投与実験でも確認され、腹腔マクロファージや肝臓などの各種臓器におけるCOX-2発現誘導が観察された。さらに、HNEによるCOX-2誘導機構の解析を行った結果、p38 MAPK経路を介したCOX-2 mRNAの安定化など、複数のリン酸化シグナル伝達機構の関与が明らかになった<sup>6)</sup>。興味深いことに、COX-2発現に重要な役割を果たすことが知られるNF- $\kappa$ Bの活性化は全く観察されなかったことから、従来の受容体刺激に伴うCOX-2誘導機構とは異なることが示唆された。これまでの低分子化合物による遺伝子発現誘導に関する研究の場合、こうした既存のリン酸化を介したシグナル伝達機構に当てはめてお茶を濁す程度で済んだ話であるが、困った(興味深い)ことにこのHNEによるCOX-2発現誘導には、細胞の培養に用いる血清が不可欠であることが判明した。HNEによるCOX-2発現誘導の全容解明にはこの血清成分の同定を避けて通ることができないということであり、COX-2誘導に関与する血清成分の同定という新たな課題にチャレンジすることになった。

## 2. 酸化脂質 HNE による COX-2 誘導に必要な血清成分の同定

血清をあらかじめ加熱しておくこととHNEによるCOX-2誘導活性が消失することから、活性成分はタンパク質性であることが予想された。そこで、血清成分を限外濾過により分画し、アッセイを行ったところ、血清中の100 kDa以上のかかなり高分子量成分がCOX-2発現誘導に関与することが明らかとなった。さらにゲル濾過により分画し(北海道薬科大学・高橋和彦教授との共同研究)、それぞれのフラクションについてHNE存在下COX-2誘導活性を調べたところ、アルブミンおよびリポタンパク質画分に活性がみられたが(図1B, C)、比活性からリポタンパク質が活性成

分の本体であることが示唆された。実際、超遠心分離によりウシ血清からリポタンパク質を調整したところ、リポタンパク質単独ではCOX-2の発現上昇がほとんど見られなかったのに対し、HNE存在下においてはリポタンパク質濃度依存的にCOX-2の発現上昇が確認された。さらに、リポタンパク質を超遠心により分画しCOX-2誘導活性を調べた結果、LDL画分に最も強いCOX-2発現誘導活性が確認された。こうした結果から、HNEによるCOX-2発現誘導に関与する血清成分はLDLであるものと予想した。ところが、あらためてヒト健常者血清からLDLを調整し、HNE存在下COX-2誘導活性を調べたが、全く活性がみられなかった。市販のLDLには強い活性があるのにもかかわらず、である。

## 3. 血清成分の正体

LDLはトリグリセリドやコレステロールエステルを分子内に含み、それをリン脂質が取り囲んだものにアポリポタンパク質B100が結合した球状構造体である。LDLは未変性の状態ではアポリポタンパク質B100が細胞表面のLDL受容体(LDLR)に認識されエンドサイトーシスにより取り込まれる。しかし、アセチル化や酸化修飾などにより生じた変性LDLはLDLRには認識されなくなり、それに代わってスカベンジャー受容体に認識され、積極的に細胞に取り込まれるようになる<sup>7,8)</sup>。このスカベンジャー受容体による変性LDLの取り込みは動脈硬化の発症及び進展における大きなリスクファクターの一つであるものと考えられている<sup>9)</sup>。

これまでのデータからLDLは未変性の状態ではCOX-2の発現誘導に関与せず、市販の血清から調整したLDLのみ活性を示すようになることが明らかになった。このことから、市販の血清中に含まれるLDLが凍結融解により変性し、これによりCOX-2誘導活性を示すようになったものと予想した。実際、健常者血清より調整したLDLを用い、凍結融解の可能性について調べた結果、HNE存在下においても未変性LDLはCOX-2の発現を誘導しなかったのに対し、凍結融解処理したLDLはHNE存在下において顕著にCOX-2を誘導した。さらに、動脈硬化発症の初期に関与するものと考えられている酸化LDLについても検討したところ、著しいCOX-2誘導活性を示すことが判明した(図1D)。こうした結果から、HNEによるCOX-2発現誘導に関与する血清成分は酸化LDLを含めた変性LDLであるものと結論した<sup>10)</sup>。

#### 4. CD36を介する新しいCOX-2発現誘導機構

当初、反応性の高いHNEが変性LDLに共有結合し、それにより生成したHNE修飾変性LDLがCOX-2誘導に関与するものと予想した。しかし、HNEと変性LDLとのブレインキュベーションにより誘導活性はむしろ減弱したことから、それぞれの分子が独立して細胞に作用するものと予想された(図1E)。当然のことながら、変性LDLが作用するのは細胞膜分子であるスカベンジャー受容体が考えられた。スカベンジャー受容体が関与しているならその発現変動があるであろうと期待し、LDL受容体を含めいくつかの受容体について検討した。その結果分かったことは、変性LDLの有無に関わらず、HNEは単独でスカベンジャー受容体の一種であるCD36の発現を誘導するということであった(図2A, B)。CD36は細胞外因子に対する受容体であり、それが機能するためには細胞表面に移行する必要がある。それゆえ、CD36の発現上昇を示す際にmRNA量の上昇だけでは不十分であり、細胞表面の発現量について示す必要がある。実際、CD36の細胞表面上での発現量をフローサイトメトリーで調べたところ、発現量の増加が確認された。またラベル化した変性LDLの細胞への結合量についてフローサイトメトリーにより解析した結果、HNEを処理した細胞では未処理の細胞と比較して相対的な蛍光強度が上昇していること、すなわち変性LDLの結合量が上昇していることが確かめられた。ここでやっと全体のシナリオがみえてきた。HNEはCD36の遺伝子発現誘導を、また変性LDLはHNEにより発現亢進されたCD36を介してCOX-2を誘導する、というものである。この時点において、HNEがCD36を誘導するという報告はあったが、CD36がCOX-2の発現誘導に関与するという報告は全くなかった。従って、これを証明すればほぼ全容が解明されたことになる。CD36 siRNAの細胞への導入により、期待通り、CD36のノックダウンによるCOX-2の発現上昇が抑制された。さらにCD36過剰発現細胞を用い、COX-2発現を検討したところ、CD36が過剰に発現した細胞ではもはやHNEによるCD36誘導は必要でなくなり、酸化LDL単独でもCOX-2誘導が確認された(図2C)。こうして、CD36がCOX-2誘導に関与する受容体であることが初めて立証されたのである(図2D)。

#### 5. HNEが作用する細胞膜受容体

こうした一連の研究により、酸化脂質であるHNEはCD36の遺伝子発現誘導に作用していることが判明した。

一方、HNEにより誘導されると考えられていたCOX-2は、血清に含まれる変性LDLによりCD36を介して誘導されていることが明らかになった。つまりHNEは変性LDLによるCOX-2誘導を手助けしていたのである。興味を惹くのはHNEが何に作用し、CD36シグナリングを活性化するかという点であろう。HNEがリガンドとして受容体に作用すれば一層面白い。これまでのデータを集約すると、HNEは細胞表面受容体を共有結合修飾により活性化し、これにより下流のシグナル伝達機構が活性化されるものと考えられる。実際、HNEは標的タンパク質の一つとして上皮成長因子(EGF)受容体に結合し、EGF受容体の自己リン酸化を亢進することが確かめられており<sup>11)</sup>、さらにその下流のシグナル分子であるPI3KやPKCの活性化も観察されている。このようにHNEによるEGF受容体への結合および活性化がCD36の誘導に関与するのは少なくとも部分的には間違いないであろう。

以上の結果から、酸化LDLを含む変性LDLを直接の誘導因子とするCOX-2の遺伝子発現誘導機構は図3のように予想されている。酸化ストレスあるいは酸化LDLを生成源として細胞内外に生成されたHNE(図3A)はEGF受容体に作用し、PI3K/PKC経路を経てCD36の遺伝子発現を亢進させる(図3B)。さらにCD36の発現増加は酸化LDLの取り込みを促進し(図3C)、COX-2の遺伝子発現の亢進に至る(図3D)<sup>10)</sup>。

#### おわりに

生命は脂質を酸化して様々な生理活性物質を作り出す仕組みを備えた。しかし、それは同時に常に脂質過酸化反応に曝されるという危険と隣り合わせになった。フリーラジカル連鎖反応を主体とする脂質過酸化反応は多岐にわたる酸化脂質を生成し、それらの多くがタンパク質や遺伝子に直接作用することが知られている。酸素と脂質を利用して生きていく限りこの反応の影響は避けられない。本ミニレビューの主人公であるHNEは脂質過酸化反応生成物の一つであるが、その反応性(特にタンパク質)や細胞機能特性は、酸化脂質の中でも際立ってユニークである。今後さらに情報が蓄積され、HNEを含めた酸化脂質メディエーターの本質的な役割、特に悪役としての疾病との因果関係、が明らかになることを切に期待したい。

#### 謝辞

本研究は、熊谷剛(北里大薬)、松川奈央((株)大鵬薬品)、金山雅也((株)キリンホールディングス)、山口悟

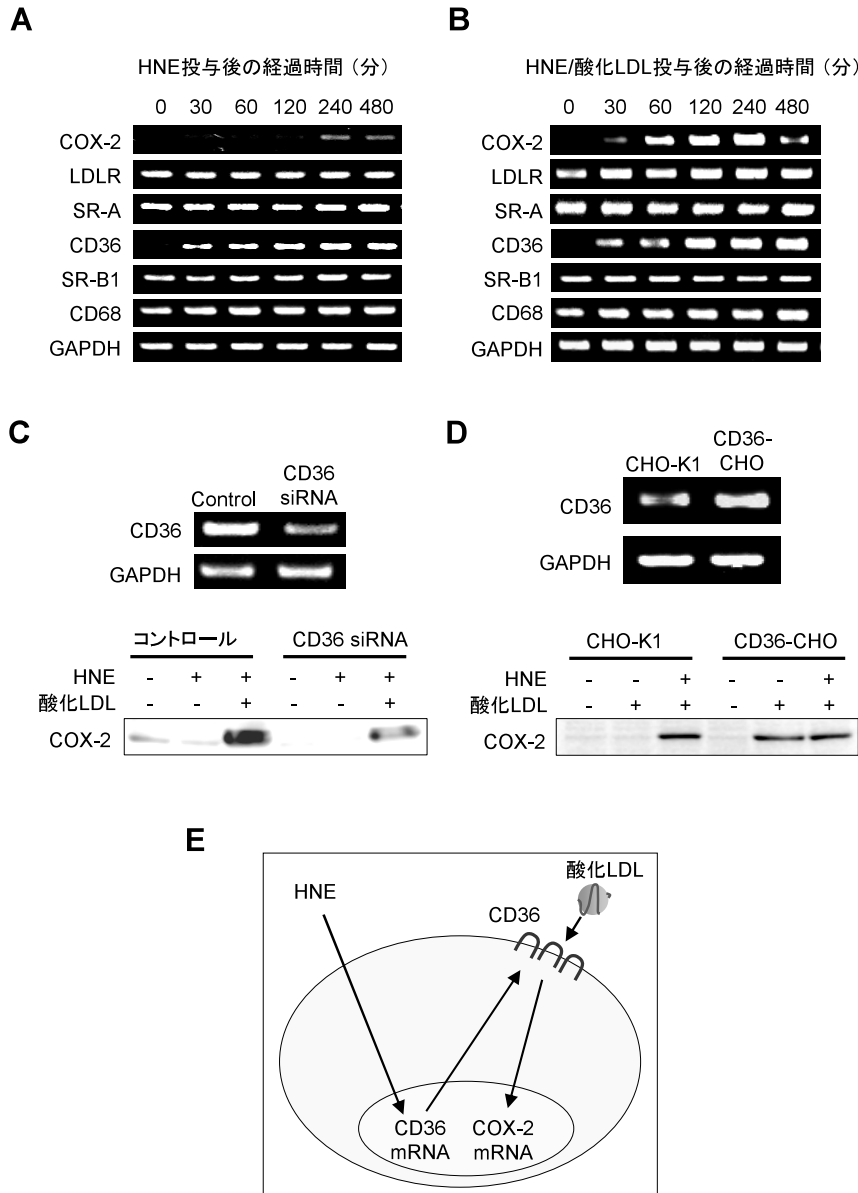


図 2 CD36 を介した新しい COX-2 発現誘導機構

(A) HNE 単独投与 (50  $\mu$ M) による LDL 受容体, スカベンジャー受容体, 及び COX-2 の遺伝子発現誘導. (B) HNE (50  $\mu$ M)/酸化 LDL (100  $\mu$ g/ml) 同時投与による LDL 受容体, スカベンジャー受容体, 及び COX-2 の遺伝子発現誘導. (C) HNE/酸化 LDL 同時投与による COX-2 誘導における CD36 ノックダウンの効果. HNE (50  $\mu$ M) 及び酸化 LDL (100  $\mu$ g/ml) 投与前に細胞を CD36 siRNA により 24 時間処理した. CD36 及び GAPDH の RT-PCR (上). COX-2 のウェスタンブロット (下). (D) HNE (50  $\mu$ M)/酸化 LDL (100  $\mu$ g/ml) 同時投与による COX-2 誘導における CD36 過剰発現の効果. CHO-K1 (コントロール細胞) 及び CD36-CHO (CD36 過剰発現細胞) を用い, 酸化 LDL 存在下, HNE 投与による COX-2 誘導を調べた. CD36 及び GAPDH の RT-PCR (上). COX-2 のウェスタンブロット (下). (E) この段階までに判明した COX-2 誘導機構. HNE は CD36 の発現誘導に, 酸化 LDL は CD36 を介して COX-2 を誘導することが明らかになった.

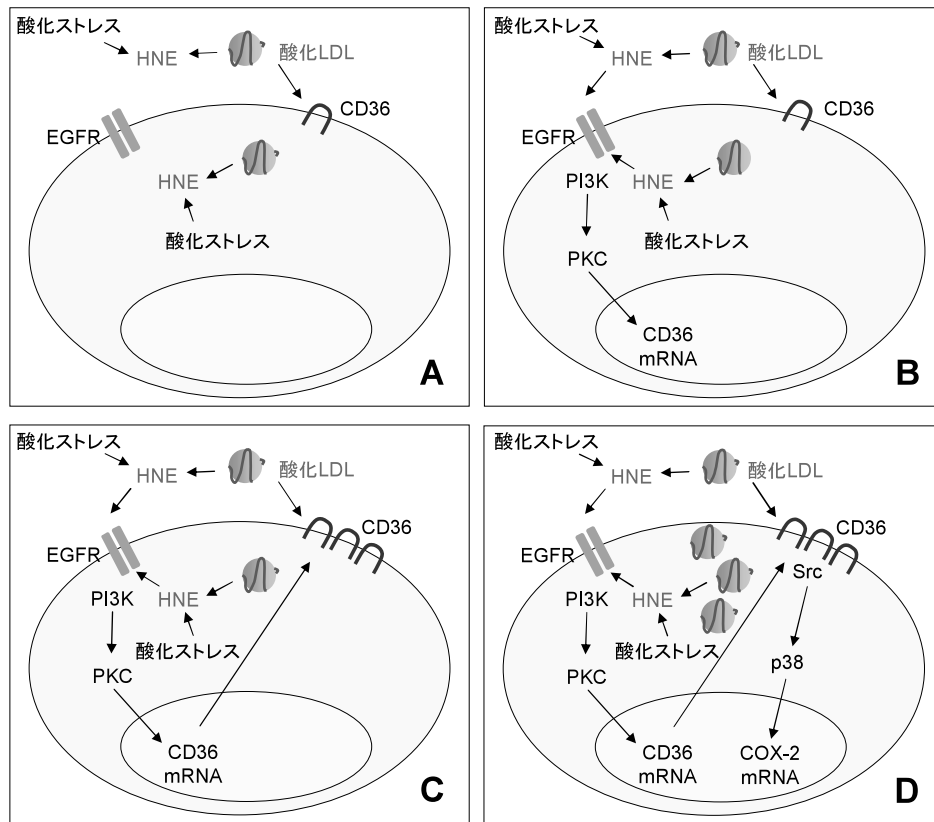


図3 HNEと協調した酸化LDLによるCOX-2誘導の分子機構

酸化ストレスあるいは酸化LDLを生成源として細胞内外に生成されたHNE(A)はEGF受容体に作用し、PI3K/PKC経路を経てCD36の遺伝子発現を亢進させる(B)。さらにCD36の発現増加は酸化LDLの取り込みを促進し(C)、COX-2の遺伝子発現の亢進に至る(D)。

((株)豊田通商)など、かつて私のグループに在籍した学生達の努力の賜物である。また、高橋和彦教授(北海道薬科大学)、永井竜児博士(熊本大学医学部)、及び新井洋由教授(東京大学大学院薬学研究科)の各先生には共同研究を通してお力をお借りした。この場を借りて感謝の意を表したい。

- 1) FitzGerald, G.A. (2003) *Nat. Rev.*, **2**, 879-890.
- 2) Kumagai, T., Matsukawa, N., Kaneko, Y., Kusumi, Y., Mitsumata, M., & Uchida, K. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 48389-48396.
- 3) Esterbauer, H., Schaur, R.J., & Zollner, H. (1991) *Free Radic. Biol. Med.*, **11**, 81-128.
- 4) Uchida, K. (2003) *Prog. Lipid Res.*, **42**, 318-343.
- 5) Kumagai, T., Kawamoto, Y., Osawa, T., Nakamura, Y., Hatayama, I., Satoh, K., & Uchida, K. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **273**, 437-441.
- 6) Kumagai, T., Nakamura, Y., Osawa, T., & Uchida, K. (2002)

*Arch. Biochem. Biophys.*, **397**, 240-245.

- 7) Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C., & Witztum, J.L. (1989) *N. Engl. J. Med.*, **320**, 915-924.
- 8) Steinberg, D. (1995) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **369**, 39-48.
- 9) Glass, C.K. & Witztum, J.L. (2001) *Cell*, **104**, 503-516.
- 10) Kanayama, M., Yamaguchi, S., Shibata, T., Shibata, N., Kobayashi, M., Nagai, R., Arai, H., Takahashi, K., & Uchida, K. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 24166-24174.
- 11) Vindis, C., Escargueil-Blanc, I., Elbaz, M., Marcheix, B., Grazide, M.H., Uchida, K., Salvayre, R., & Nègre-Salvayre, A. (2006) *Circ. Res.*, **98**, 785-792.

内田 浩二

(名古屋大学大学院生命農学研究科)

Inflammation-related oxidized lipid mediators  
Koji Uchida (Graduate School of Bioagricultural Sciences,  
Nagoya University, Nagoya 464-8601, Japan)