

血管内皮細胞に対する Asp-hemolysin の細胞毒性とサイトカイン遺伝子発現誘導活性

熊谷 健,^{*,a} 永田隆之,^a 工藤陽一,^b 福地祐司,^c 蝦名敬一,^a 横田勝司^a東北薬科大学第一衛生化学教室,^a JR 仙台病院衛生試験室,^b仙台赤十字病院薬剤部^c

Cytotoxic Activity and Cytokine Gene Induction of Asp-hemolysin to Vascular Endothelial Cells

Takeshi KUMAGAI,^{*,a} Takayuki NAGATA,^a Yoichi KUDO,^b Yuji FUKUCHI,^cKeiichi EBINA,^a and Katsushi YOKOTA^aThe First Department of Hygienic Chemistry, Tohoku Pharmaceutical University,^a 4-4-1 Komatsushima,

Aoba-ku, Sendai 981-8558, Japan, Hygiene Research Laboratory, Sendai Hospital of East Japan

Railway Company,^b 1-3-1 Itsutsubashi, Aoba-ku, Sendai 980-8508, Japan, and JapaneseRed Cross Sendai Hospital,^c 2-43-3 Yagiyamahon-cho, Taihaku-ku,

Sendai, 982-8508, Japan

(Received November 9, 2000; Accepted February 6, 2001)

We examined the effects of Asp-hemolysin from *Aspergillus fumigatus* Fresenius-Muramatsu strain on the viability and cytokine gene expression of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). The cell viability of HUVEC was reduced to 50% by 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Asp-hemolysin. However, lower concentration of Asp-hemolysin ($<30 \mu\text{g}/\text{ml}$) had no effect on the cell viability. The mRNA expression of such cytokines as tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8 and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) were also observed in HUVEC cultured with 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Asp-hemolysin.

Key words—Asp-hemolysin; vascular endothelial cell; cytotoxic activity; cytokine mRNA

緒 言

Asp-hemolysin は, *Aspergillus fumigatus* Fresenius-村松株 (FM 株) の培養ろ液及びその菌体から精製された微量の糖を含む易熱性タンパク質毒素であり, cDNA 塩基配列から成熟 Asp-hemolysin は 126 個のアミノ酸から成ることが推定されている。¹⁾ 本毒素は, 各種動物赤血球に対し *in vitro* において溶血作用を有するほか, マウス腹腔内血管透過性亢進作用やモルモット腸管平滑筋収縮作用, ヒト多核白血球やマウス並びにモルモット腹腔マクロファージに対する細胞毒性など様々な生物活性を有している。また, Asp-hemolysin は, マウスを用いた *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) の実験的感染に際し, 感染促進効果を示すと共に感染病巣中にも実際に産生されることが認められている。²⁾ さらに Asp-hemolysin は, 呼吸器疾患患者由来 *A. fumigatus* 臨床分離株からタンパク質及び遺伝子レベルにおいて検出されている。³⁾ これらの知見は, Asp-

hemolysin が *A. fumigatus* 感染の発症及び進展における菌側の病原性因子として関与していることを示している。

アスペルギルス症は, *A. fumigatus* をはじめとするいくつかの病原性 *Aspergillus* species に起因する代表的な深在性真菌症であり, その多くは, 日和見感染症として発症する。一般に, アスペルギルス感染において, 全身性あるいは脳アスペルギルス症などの肺外型を除くほとんどの症例は, いわゆる気管支・肺アスペルギルス症であることより, アスペルギルスの好発部位は呼吸器であると言われている。また, 他の臓器に形成される病変は, 肺胞内に定着・増殖した菌が血行性に播種した結果と推定されている。実際に代表的な肺アスペルギルス症である侵襲性肺アスペルギルス症は, 肺胞内に達したアスペルギルス分生子が肺胞壁から侵入し, 菌糸を形成後血管壁を穿通して血液中に侵入し, 血行性に全身臓器に真菌が播種されることが知られている。⁴⁾ さらに, アスペルギルスは, 感染局所において種々

の物質（マイコトキシン，プロテアーゼ及び他の二次代謝産物）を産生放出することが知られている⁵⁾が，血管壁に対するこれら物質の具体的な作用に関しては不明な点が多い．本報では，Asp-hemolysinの血管壁に及ぼす影響を解明する目的から，ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を用い，Asp-hemolysinの細胞毒性を検討すると共に，HUVECのサイトカイン産生に与えるAsp-hemolysinの影響を遺伝子レベルで解析した．

実験の部

Asp-hemolysinの精製 当教室保存のFM株を0.85% NaCl加サブロー液状培地（3.5% glucose, 1% peptone, 0.85% NaCl, pH 6.0）で30°C, 2週間静置培養し，得られた菌体抽出液及び培養ろ液から既報¹⁾に従い精製を行った．精製したAsp-hemolysinは，SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で単一バンドを示すことを確認した．

HUVECの培養 HUVEC（Clonetics）の培養は，専用の培地（2% fetal bovine serum, 12 µg/ml bovine brain extract, 1 µg/ml hydrocortisone, 10 pg/ml human epidermal growth factor, 50 µg/ml gentamicin, 50 ng/ml amphotericin B含有 endothelial cell basal medium）で行い，2—3代継代培養後，96 well又は12 well tissue culture plate（FALCON）に播き，コンフルエントまで培養したことを確認後，実験に供した．また，96 well並びに12 well tissue culture plateで培養後の細胞数を計測した結果，それぞれ約 0.9×10^4 cells/well, 1×10^5 cells/wellであった．

細胞毒性試験 96 well plateで培養したHUVECに各濃度のAsp-hemolysinを含む培地溶液を100 µl加え，5% CO₂—95% air下で37°C, 1h培養し，Hank's balanced salt solution (HBSS)で洗浄後，再度培地溶液を加え，Cell counting kit（同仁化学）を用い，既報⁶⁾に従って生細胞数の測定を行った．すなわち，各wellに試薬溶液（5 mM WST-1, 0.2 mM 1-methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate, 20 mM HEPES, pH 7.4）10 µlを添加し，2h培養後の450 nmにおける吸光度を測定した．Asp-hemolysinの細胞毒性は，Asp-hemolysin非添加培地培養細胞における吸光度に対するAsp-hemolysin添加培地培養細胞での吸光度の割合から評価した．

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)によるサイトカイン mRNAの検出

Total RNAの抽出 12 well plateで培養したHUVECをAsp-hemolysin 30 µg/ml含有培地で経時的に培養後，acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform（AGPC）法⁷⁾を用い，total RNAの抽出を行った．また，Asp-hemolysin溶液中に混在するエンドトキシン量をエンドスペシー（生化学工業）を用い測定した結果，0.05 EU (endotoxin unit)/ml以下であった．

RT-PCR法 RT-PCR反応はGeneAmp® RNA PCR kit（PEアプライドバイオシステムズ）を用い，既報⁶⁾に従って行った．すなわち，RT反応は，HUVECから抽出したtotal RNA 1 µgを含む全量20 µlの反応系 [5 mM MgCl₂, 1×PCR buffer II (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3), 1 mM dNTP, 2.5 µM Oligo d(T) 16, 1 U/µl RNase inhibitor, 2.5 U/µl MuLV reverse transcriptase] で42°C, 1h反応後，99°C, 5 min加熱処理を行った．

PCR反応は，RT反応後の反応溶液の一部を鋳型として全量50 µlの反応系 [2 mM MgCl₂, 1×PCR buffer II, 0.2 mM dNTP, 1 µM各サイトカイン特異的プライマー (Table 1), 1.25 U/50 µl Taq DNA polymerase] で94°C, 1 min, 65°C, 2 minのサイクルでInterleukin (IL)-6, IL-8は25サイクル，β-actin, Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)は30サイクル，Tumor necrosis factor (TNF)-α, IL-1βは35サイクル行い，さらに72°C, 7 minの反応を行った．また，対照実験にはβ-actin特異的プライマーを用いた．PCR産物の確認はポリアクリルアミドゲル電気泳動で行った．なお，サイズマーカーとしてφX174RF/DNA Hae III Digest (NEW ENGLAND Bio Labs)を用いた．

統計学的処理 細胞毒性試験の結果は，Studentのt検定法に従って計算し，5%未満の危険率をもって統計的有意差と認めた．

結果と考察

A. fumigatus感染における菌側病原性因子の1つであるAsp-hemolysinの血管壁に対する作用を解明する目的から血管内皮細胞としてHUVECを用い，Asp-hemolysinの直接的な作用としての細胞毒性を検討した．その結果，Fig. 1に示すように，

Table 1. Sequences of the Oligonucleotide Primers Used for PCR Amplification

mRNA	Primer sequence	Product (bp)
β -actin		
sense	5' GTGGGGCGCCCCAGGCACCA 3'	540
antisense	5' CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC 3'	
TNF- α		
sense	5' CAGAGGGAAGAGTTCCCCAG 3'	325
antisense	5' CCTTGGTCTGGTAGGAGACG 3'	
IL-1 β		
sense	5' GACACATGGGATAACGAGGC 3'	248
antisense	5' ACGCAGGACAGGTACAGATT 3'	
IL-6		
sense	5' ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGC 3'	628
antisense	5' GAAGAGCCCTCAGGCTGGACT 3'	
IL-8		
sense	5' ATGACTTCCAAGCTGGCCGTG 3'	300
antisense	5' TTATGAATTCTCAGCCCTCTTCAAAAATTCTC 3'	
GM-CSF		
sense	5' TGGCTGCAGAGCCTGCTGCTC 3'	435
antisense	5' TCACTCCTGGACTGGCTCCC 3'	

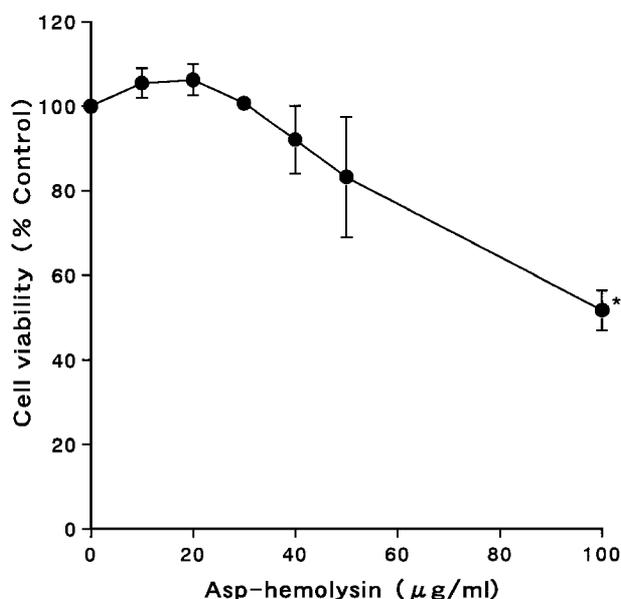


Fig. 1. Cytotoxic Activity of Asp-hemolysin to HUVEC

HUVEC were incubated with the indicated concentration of Asp-hemolysin in medium at 37°C for 1 h. Cell viability was assessed by WST-1 assay. Values are shown as mean \pm S.E. of three separate experiments. The 100% control value was 0.755 measured as the absorbance at 450 nm. Significantly different from the control at $p < 0.05$.

Asp-hemolysin 無添加系での HUVEC 生存率 (100%) を対照とした場合, Asp-hemolysin 30 μ g/ml 添加系までは HUVEC の生存率がほぼ 100% を示し, Asp-hemolysin の細胞毒性は認められなかった. これに対し, Asp-hemolysin 40 μ g/ml 添加系からの

Asp-hemolysin 高濃度領域において毒素濃度に依存した生存率の低下が認められ, Asp-hemolysin の HUVEC に対する細胞毒性が明らかとなり, その 50% 致死濃度は 100 μ g/ml であった. 一方, 前報⁶⁾においてマウス腹腔マクロファージ (M ϕ) に対する Asp-hemolysin の 50% 致死濃度は 22.7 μ g/ml であったことから, HUVEC と M ϕ では Asp-hemolysin の示す細胞毒素活性に有意な差が認められ, Asp-hemolysin に対する細胞の感受性が細胞種によって異なることが示唆された.

また, HUVEC に対する Asp-hemolysin の細胞毒性試験は, 毒素添加 1 h 後に測定を行っているが, 志賀毒素の HUVEC を用いた細胞毒性試験では, 毒素添加 24—96 h 後の遅延型の細胞毒性発現を観察している⁸⁾ことから, HUVEC に対し無作用量であった Asp-hemolysin 低濃度領域 (30 μ g/ml 以下) の細胞毒性発現においてもある程度の遅延時間が必要である可能性が考えられ, Asp-hemolysin 30 μ g/ml を含む培地中で HUVEC を培養し, 経時的に生存率の測定を行った. その結果, Asp-hemolysin 添加 24 h 後においても HUVEC の生存率はほぼ 100% を示し, 少なくとも Asp-hemolysin 30 μ g/ml までは HUVEC に対し細胞毒性を示さないことが明らかとなった (Fig. 2). さらに, Asp-hemolysin 添加 4 h 後の生存率は 131% と有意な増加を示し

(Fig. 2), 低濃度の Asp-hemolysin は HUVEC の細胞機能を亢進させる可能性が推察された。

一般に微生物感染における生体側の感染防御機構として各種サイトカインの産生が知られており, *A. fumigatus* 感染に関しても菌の産生する病原性因子が宿主のサイトカイン応答を引き起こすことが上皮細胞⁹⁾や脾臓細胞¹⁰⁾を用いた実験から示唆されている。しかしながら, *A. fumigatus* 感染における血管内皮細胞のサイトカイン応答に関しては未だ明らかとなっていないことから, HUVEC の細胞機能としてのサイトカイン産生に及ぼす Asp-hemolysin の影響について検討した。すなわち, 細胞毒性を示さないレベルの Asp-hemolysin を添加し培養した HUVEC について, そのサイトカイン mRNA 発現をサイトカイン特異的プライマーを用いた RT-PCR 法により解析した。その結果, Fig. 3 に示すように IL-1 β , IL-6, IL-8, GM-CSF において, そのシグナルに強弱は認められるものの Asp-hemolysin 刺激後の時間経過に依存した遺伝子発現の増強が明らかとなった。また, TNF- α については, Asp-hemolysin 刺激 12 h 後に最も強い TNF- α mRNA 発

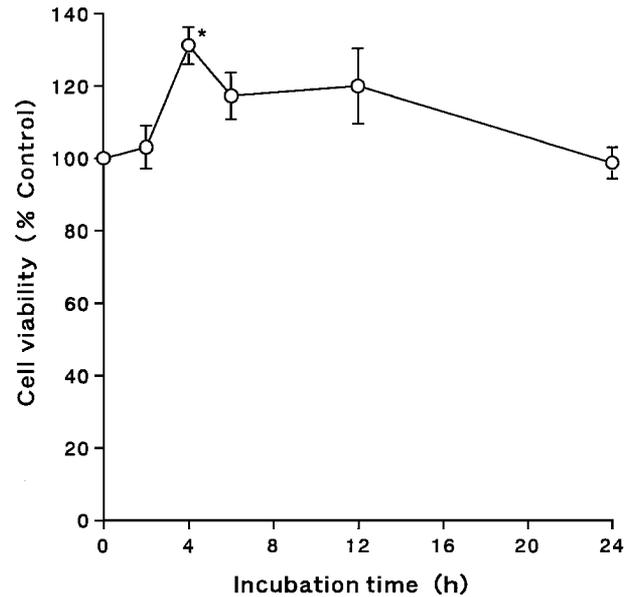


Fig. 2. Time Course of HUVEC Viability Caused by Asp-hemolysin

HUVEC were cultured in 30 μ g/ml of Asp-hemolysin. After the indicated time, cell viability was assessed by WST-1 assay. Values are shown as mean \pm S.E. of three separate experiments. The 100% control value was 0.720 measured as the absorbance at 450 nm. Significantly different from the control at $p < 0.05$.

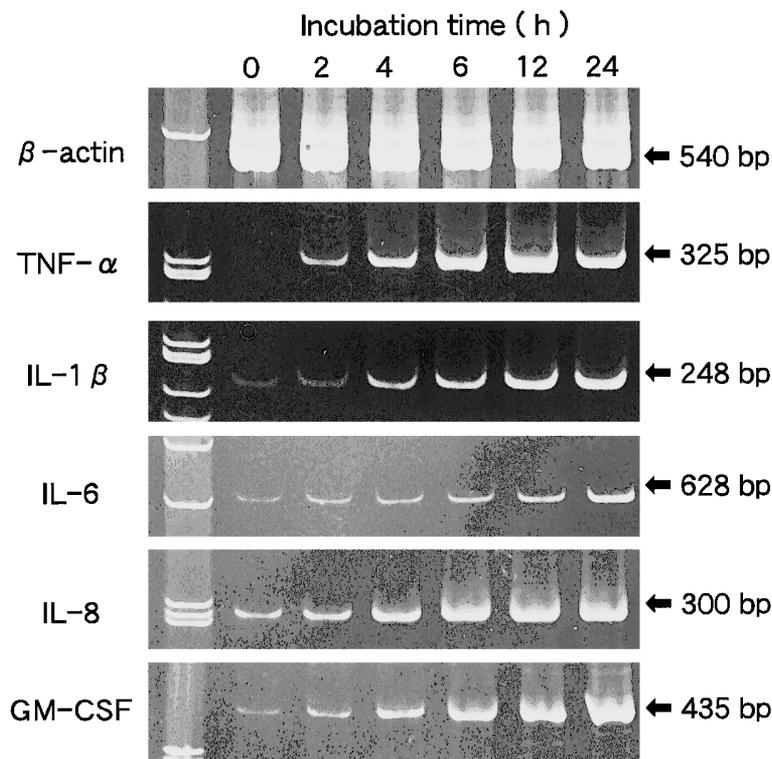


Fig. 3. Expression of Cytokine mRNA in HUVEC Stimulated by Asp-hemolysin

HUVEC were cultured with 30 μ g/ml of Asp-hemolysin. After the indicated time, each cell was lysed, total RNA was extracted and RT-PCR was performed by using specific primer pairs for β -actin, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and GM-CSF. PCR products were electrophoresed, and the predicted sizes of PCR products are indicated. Size markers are shown in the leftmost lane.

現を認めた。この結果は、Asp-hemolysin が血管内皮細胞において上記各サイトカイン遺伝子の発現を誘導することを示している。

TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 は微生物感染時の生体反応の1つとして惹起される炎症に深く関与することが知られているサイトカインである。Asp-hemolysin によるこれらサイトカイン遺伝子の発現増大は、サイトカイン産生の増加を促し、しいては炎症反応を助長し、さらには本毒素の細胞毒性と相まって組織傷害を引き起こし、結果として感染促進的に働くことが考えられる。また IL-6 は血管内皮細胞に対して血管透過性を亢進させる作用を有していることから、*A. fumigatus* 菌糸の組織内への進入に係わることも予想される。しかしながら、GM-CSF はインターフェロン- γ と共に単球に作用し、*A. fumigatus* 菌糸に対する抗菌活性を増大させることが報告されている¹¹⁾ことから、これらサイトカインの *A. fumigatus* 感染における生体側防御因子としての作用も考えられる。

一方、*A. fumigatus* 感染における菌の血管親和性を示す報告として、Paris ら¹²⁾は *A. fumigatus* 感染における *A. fumigatus* 分生子の血管内皮細胞への internalization を観察し、渋谷ら¹³⁾は *A. fumigatus* 分生子のラット腸管膜から血管内への侵入過程の解析から、菌の静脈壁内への侵入に際し、菌糸の物理的な圧力のみではなく菌側の組織傷害性因子の存在を推定している。また、著者ら²⁾は Asp-hemolysin の生物活性の1つとしてマウス腹腔内血管透過性亢進作用を観察すると共に毒素投与マウスの免疫組織化学的解析から、腎髄質の小葉間動脈の中膜並びに脳底動脈枝の動脈壁中膜における Asp-hemolysin の局在と血管平滑筋の壊死を認め、本毒素の血管壁親和性を示唆している。さらに野村ら¹⁴⁾は、高度の血管破綻を示した菌球型肺炎aspergillosisの症例報告において、Asp-hemolysin が血管壁の破壊、菌の組織内侵入に関与している可能性を指摘している。

本論文では、*A. fumigatus* 感染の菌側病原性因子である Asp-hemolysin の血管壁に対する影響を細胞レベルで解明する目的から、血管壁のモデル細胞として HUVEC を用い、Asp-hemolysin の新たな活性としての HUVEC に対する細胞毒性とサイトカインの発現誘導作用を明らかにし、Asp-hemolysin

が *A. fumigatus* 感染における菌の血管親和性に基づく血管壁の破壊、さらには菌の血管内への進入に関与する菌側因子の1つになり得る可能性を示唆した。

REFERENCES

- 1) Ebina K., Sakagami H., Yokota K., Kondo H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1219**, 148–150 (1994).
- 2) Ebina K., Kumagai T., Fukuchi Y., Yokota K., *Jpn. J. Med. Mycol.*, **38**, 155–160 (1997).
- 3) Ebina K., Suzuki K., Kumagai T., Fukuchi Y., Amitani R., Yokota K., *Jpn. J. Med. Mycol.*, **36**, 245–250 (1995).
- 4) Shibuya K., Wakayama M., Takahashi K., Naoe S., *Byori to Rinsyo*, **9**, 1279–1284 (1991).
- 5) Amitani R., Tanaka E., Murayama T., Kuze F., *Kokyu*, **14**, 923–931 (1995).
- 6) Kumagai T., Nagata T., Kudo Y., Fukuchi Y., Ebina K., Yokota K., *Jpn. J. Med. Mycol.*, **40**, 217–222 (1999).
- 7) Chomczynski P., Sacchi N., *Anal. Biochem.*, **162**, 156–159 (1987).
- 8) O'Brig T. G., Del Vecchio P. J., Brown E., Moran T. P., Rowland B. M., Jodge T. K., Rothman S. W., *Infect. Immun.*, **56**, 2373–2378 (1988).
- 9) Chris Tomee J. F., Wierenga A. T. J., Hiemstra P. S., Kauffman H. F., *J. Infect. Dis.*, **176**, 300–303 (1997).
- 10) Kurup V. P., Hari V., Guo J., Murali P. S., Resnick A., Krishnan M., Fink J. N., *Peptides*, **17**, 183–190 (1996).
- 11) Roilides E., Holmes A., Blake C., Venzon D., Pizzo A., Walsh T. J., *J. Infect. Dis.*, **170**, 894–899 (1994).
- 12) Paris S., Boisvieux-Ulrich E., Crestani B., Houcine O., Taramelli D., Lombardi L., Latege J-P., *Infect. Immun.*, **65**, 1510–1514 (1997).
- 13) Shibuya K., Wakayama M., Tomita T., Oza-wa E., Uchida K., Yamaguchi H., Naoe S., *Jpn. J. Med. Mycol.*, **34**, 365–371 (1993).
- 14) Nomura T., Hirai S., Ishihara T., Sawazaki H., Saiki S., *J. Jpn. Soc. Bronch.*, **20**, 595–599 (1998).