

# 好塩基球における eosinophil peroxidase の発現

— 幼若好塩基球細胞株 KU812-F を用いて —

新潟大学医学部第一内科（主任：相澤義房教授）

増 子 正 義

Expression of Eosinophil Peroxidase in Basophil  
Using Immature Basophil Cell Line : KU812-F

Masayoshi MASUKO

*First Department of Internal Medicine,  
Niigata University School of Medicine  
(Director: Prof. Yoshifusa AIZAWA)*

Although peroxidase activity in basophils can be detected by morphological cytochemical reaction, the mechanism of the biochemical function of peroxidase activity detected in basophils remains to be determined, and its molecule or structure has not yet been identified. We demonstrated the characteristics of peroxidase activity induced in the immature basophil cell line, KU812-F. Their granules could be stained by anti-eosinophil peroxidase antibodies, and eosinophil peroxidase mRNA, not myeloperoxidase, was detected in the cells using Northern hybridization and RT-PCR. The biological function of eosinophil peroxidase detected in basophils remains uncertain, but eosinophils and basophils have similar cytoplasmic proteins and must play a role in allergic immune reactions. Then eosinophil peroxidase can be one of the molecules involved in the allergic reaction.

Key words: eosinophil peroxidase, mRNA, immunocytochemistry, basophils, KU812-F  
好酸球ペルオキシダーゼ, 免疫細胞化学, 好塩基球

## はじめに

生体内アレルギー反応において好塩基球は好酸球、肥満細胞, memory T 細胞, B 細胞と共同し重要な役割を担っていると考えられており, 好塩基球の生体におけ

る機能の解明はアレルギー反応の病態を考える上で重要である。これまで好塩基球の機能には不明の点が多かったが, 近年好塩基球の細胞質内蛋白や細胞膜表面レセプターの検索が徐々に進められてきている。

Peroxidase 活性は好中球, 単球, 好酸球の細胞質内

Reprint requests to: Masayoshi MASUKO,  
First Department of Internal Medicine,  
Niigata University School of Medicine,  
Niigata City, 951-8510, JAPAN.

別刷請求先: 〒951-8510 新潟市旭町通1番町  
新潟大学医学部第一内科学教室 増子正義

顆粒に認められる<sup>1)2)</sup>。ヒト白血球の持つ peroxidase 活性を示す蛋白としてはこれまで好中球ペルオキシダーゼ (MPO) と好酸球ペルオキシダーゼ (EPO) が単離されている。好中球の一次顆粒、単球の顆粒に存在する MPO は細菌防御に重要な役割を果たしているヘム含有糖蛋白である<sup>3)4)</sup>。一方、EPO もヘム含有糖蛋白であり、好酸球顆粒に存在し寄生虫防御に主要な役割を果たすとともにアレルギー反応の mediator としての機能も持っていることが知られている<sup>5)6)</sup>。MPO と EPO は類似した酵素活性を持ち、高いアミノ酸相同性を持っているが、それぞれの遺伝子は別々に染色体上に存在している<sup>7)8)</sup>。また好塩基球の顆粒にも peroxidase 活性が証明されたとの報告もある<sup>9)10)</sup>が、その生体内での機能は不明であり、現在まで好塩基球中で peroxidase 活性を示す蛋白やそれをコードする遺伝子は単離されていない。

当教室で岸らが以前慢性骨髓性白血病急性転化患者より樹立した幼若好塩基球細胞株：KU812 の亜細胞株である KU812-F<sup>11)12)</sup> は IL-3 の添加により好塩基球への分化が促進される<sup>13)</sup>。本論文では KU812-F 細胞株の好塩基球分化細胞中に EPO と同一の抗原性を持つ peroxidase 活性を示す蛋白が存在すること、さらにそれらの細胞に EPO mRNA が発現していることを示した。

## 材料および方法

### 細胞培養

KU812-F 細胞株は CO<sub>2</sub> incubator (5%CO<sub>2</sub>) を用い、10%胎仔血清 (FCS, 三光純薬, 東京) 含有 RPMI 1640 培養液 (ニプロ, 東京) 中で 37℃ で維持した。好塩基球への分化を促進するため、細胞は 20 ng/ml の recombinant IL-3 (キリンビール株式会社より供与) を加え、上記の条件で 3 日間培養した。また、EPO, MPO 発現の陽性コントロールとして、当教室で岸らが樹立した HT93 細胞株を用いた。HT93 細胞株は急性前骨髄性白血病患者から樹立された MPO 陽性顆粒をもつ細胞株であるが、all-trans レチノイン酸 (ATRA) および granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) を添加することにより、好酸球に分化する<sup>14)</sup>。この好酸球分化した細胞には、細胞質内に EPO 陽性顆粒が出現する。HT93 細胞株も同様に CO<sub>2</sub> incubator (5%CO<sub>2</sub>) を用い、10%胎仔血清 (FCS, 三光純薬, 東京) 含有 RPMI 1640 培養液 (ニプロ, 東京) 中で 37℃ で維持した。好酸球への分化誘導は 10 mM の ATRA (Sigma, 米国)

及び 50 ng/ml の G-CSF (キリンビール株式会社より供与) を加え 5 日間培養することにより行った。

### 細胞化学

KU812-F 細胞株は cytospin 標本を作製し May-Grunwald-Giemsa 染色を行うと共に、toluidineblue 染色を行い異染性を観察した<sup>15)</sup>。光学顕微鏡を用いたペルオキシダーゼ染色は diaminobenzidine (DAB) 法で行った。

### 電子顕微鏡観察

細胞は 1.25 % glutaraldehyde 含有 Gey のリン酸緩衝溶液中 (pH7.2) (Gibco BRL, 米国) 中で室温で 10 分間固定した後、Gey のリン酸緩衝溶液で 3 回洗浄した。その後 pH を 1 M sodium hydroxide を用い 7.6 に再調整し、20 mg の DAB 及び 0.1 ml の 1 % 過酸化水素含有 50 mM Tris-HCl 溶液 10 ml 中で室温で 1 時間暗所で反応させた。反応後 0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.2) を用い数回洗浄し 1 % osmium tetroxide 含有リン酸緩衝液で 30 分間後固定した。

### Northern Hybridization および逆転写 PCR (RT-PCR) 法

Total RNA は HT93 および KU812-F 細胞より ISOGEN<sup>TM</sup> (ニッポンジーン, 富山) を用い抽出した。Total RNA 20 µg を formaldehyde/MOPS buffer (pH7.0) 中で 1 % agarose 上に展開し nitrocellulose membrane filter に転写した。filter は [<sup>32</sup>P] でラベルした好酸球ペルオキシダーゼ (cDNA 塩基番号 No. 2006 から 2390 領域, gene bank, clone X14346) 及び好中球ペルオキシダーゼ (cDNA 塩基番号 No. 1430 より 1870 領域, gene bank, clone M19507) cDNA 断片を用い、Thomas<sup>16)</sup> の方法により 50% formamide, 5×SSC, 50 mM sodium phosphate (pH6.5), 5×Denhardt 溶液, 250 mg/ml 熱処理変性サケ精子 DNA 含有 hybridization buffer 中で 42℃ でハイブリダイズした。さらに KU812-F 細胞中の好酸球ペルオキシダーゼ遺伝子の発現を逆転写 PCR (RT-PCR) 法を用いても検討した。一本鎖 cDNA は 1 µg の total RNA より 100 pmol の random hexadeoxynucleotide を用い 10U の RAV-2 逆転写酵素 (宝酒造, 東京) により 20 µl の系で合成した。cDNA 0.5 µl を 1U の rTaq polymerase (宝酒造, 東京) および 0.2 mM の dNTP を含有する 20 µl の反応液中で EPO primer (sense: 5'-CACGGTTTCAAGGGAC-ATC, antisense: 5'-CTTTTCTTGCCTGGGGTG) and MPO primer (sense: 5'-TCTTACTTCGGGAGCACAAC, antisense: 5'-CTGCAATTTGGTTCTGACGA) を用

い増幅した。コントロールとしては  $\beta$ -actin 遺伝子を sense primer: (5'-ATCATGTTTGGAGACCTTCAA,) および antisense primer: (5'-CATCTCTTGCTCGAAGT-CCA) を用いて増幅した。PCR 条件は94℃で3分間変性後、94℃で1分の変性、サンプル特異的アニーリング温度 (EPO 60℃, MPO 55℃,  $\beta$ -actin 54℃) で1分のアニーリング、72℃で1分の伸長を30サイクル行った。PCR 産物は3% agarose gel 中で電気泳動し ethidium bromide で染色した。

#### 免疫細胞化学

KU812-F 細胞の MPO, EPO 蛋白の発現を、単クローン抗体を用いた蛍光免疫細胞化学により検討した。細胞は slide glass 上で純 methanol で5分間固定し、直接法 (MPO) または間接法 (EPO) を用い単クローン抗体で染色し FITC 蛍光で検出した。すなわち細胞は抗好酸球ペルオキシダーゼ抗体で (anti-EP, IgG2a, ニチレイ, 東京) 室温で2時間反応させ洗浄後、FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (Becton Dickinson, 米国) を用い室温で30分間暗所にて染色した。もしくは細胞を直接 FITC-conjugated 抗好中球ペルオキシダーゼ抗体 (Caltag, 米国) で室温で2時間染色した。

## 結 果

### KU812-F 細胞株の好塩基球分化

培養前の KU812-F 細胞の約30%が toluidine-blue 染色により異染性を示した。IL-3 を添加し3日間培養した後には異染性を示す細胞は46%に増加しており、これらの細胞には好塩基性顆粒が認められた (図 1a, b)。このことより、この細胞株の好塩基球への分化が IL-3 の添加により促進されたと考えられ、このことは Valent の報告<sup>13)</sup> と同様の結果であった。

### KU812-F 細胞株の peroxidase 反応

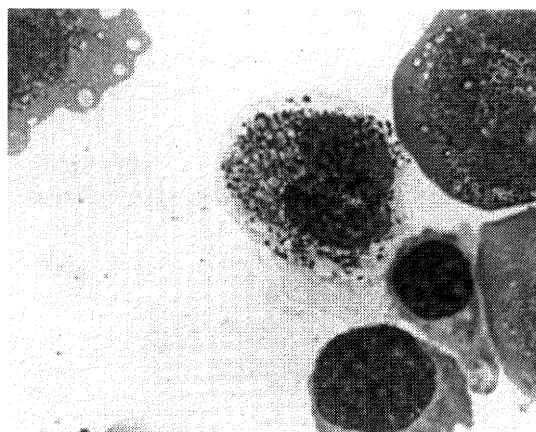
光顕的細胞化学反応の結果、IL-3 添加培養後の KU812-F 細胞の約5%が peroxidase 反応陽性であった (図 2a)。電子顕微鏡での観察では、peroxidase 陽性顆粒は stippling appearance を呈しており、さらに粗面小胞体や、核膜周囲腔でも peroxidase 反応陽性であった (図 2b)。顆粒が stippling appearance を呈したことは、これらの細胞が幼若好塩基球であることを支持する所見であった。

### Northern Hybridization 及び RT-PCR

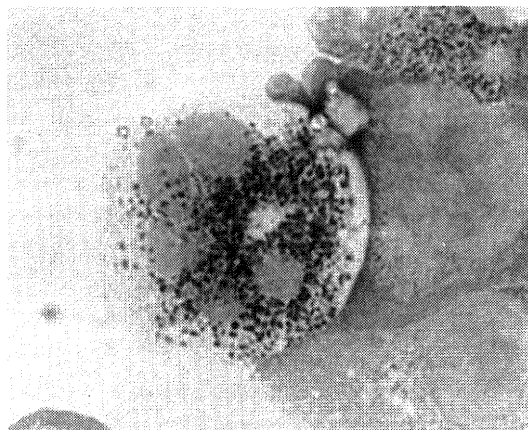
[<sup>32</sup>P] でラベルした EPO および MPO の cDNA 断片を用いた Northern Hybridization の結果、EPO

mRNA の強いシグナルが ATRA および G-CSF を添加培養した HT93 細胞のレーンの約 2500 base の位置に検出された。また培養前の KU812-F 細胞と IL-3 を添加培養した KU812-F 細胞のレーンには弱いながら EPO mRNA のシグナルが検出された (図 3a)。一方、MPO mRNA のシグナルは HT93 細胞のレーンの約 3200 base の位置に検出されたが、KU812-F 細胞では検出されなかった (図 3b)。

RT-PCR を用いた検討でも EPO mRNA の発現は ATRA と G-CSF を添加培養した HT93 細胞株と IL-3 を添加培養した KU812-F 細胞株で同じ長さの PCR



a



b

図1 IL-3 添加3日間培養後の KU812-F 細胞株の細胞形態

May-Grünwald-Giemsa 染色 (a) および toluidine-blue 染色 (b)。

産物として検出されたが、KU812-F 細胞株での発現量は Northern Hybridization の結果と同様微量であると考えられた。一方、MPO mRNA の発現は ATRA と G-CSF を添加培養した HT93 細胞株のみで認められ、KU812-F 細胞株では認められなかった (図 4)。

#### 免疫細胞化学

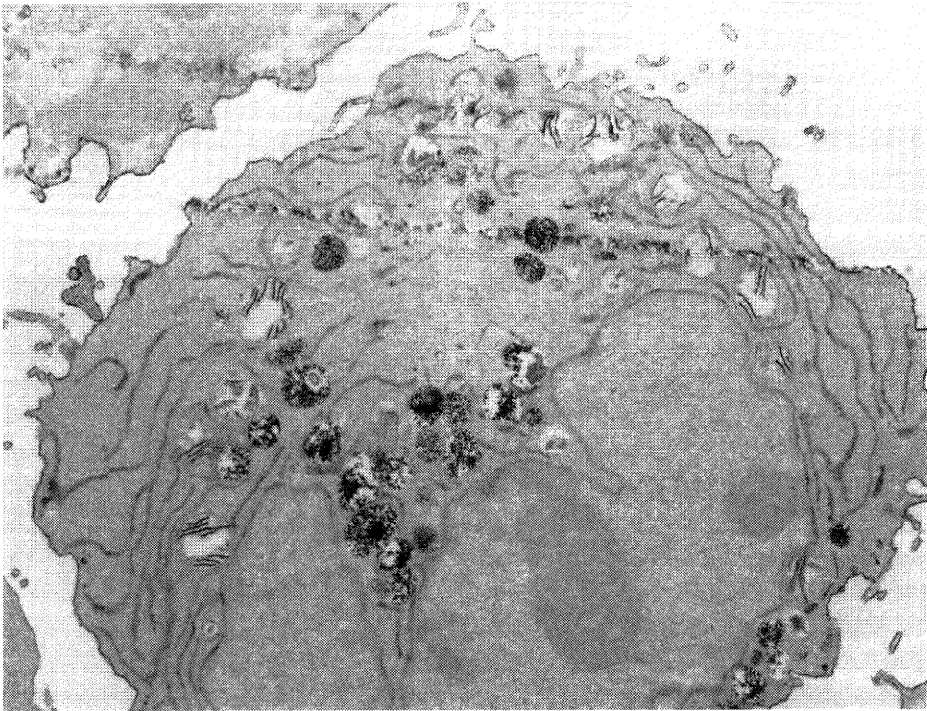
3 日間 IL-3 を添加培養後の KU812-F 細胞の一部は抗好酸球ペルオキシダーゼ抗体を用いた免疫染色にてその顆粒や核膜周囲腔に陽性に染色された (図 5)。EPO 陽性 KU812-F 細胞の割合は細胞化学的 peroxidase 反応陽性細胞の割合と同程度であった。一方 MPO 陽性の細胞はこれらの細胞中には認められなかった。

#### 考 察

好塩基球は好酸球、肥満細胞、memory T 細胞、B 細胞と共同しアレルギー反応において重要な役割を担っていると考えられており、好塩基球の生化学的機能解析



a



b

図 2 KU812-F 細胞の peroxidase 反応

KU812-F 細胞の一部に光学的 peroxidase 反応陽性細胞がみられる (a)。電子顕微鏡では陽性顆粒が stippling appearance を呈しさらに、粗面小胞体や核膜周囲腔に陽性である (b)。

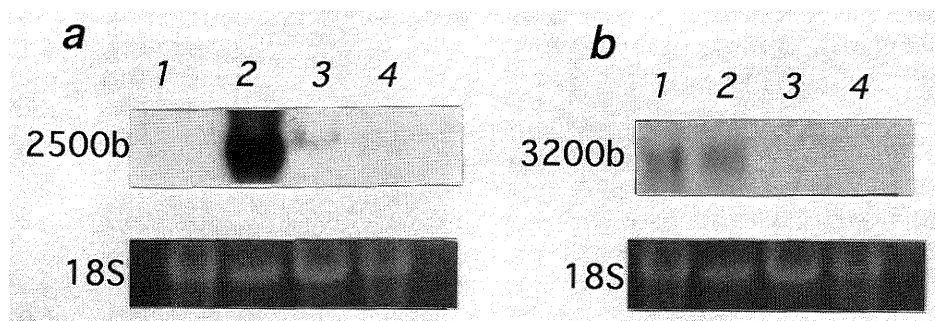


図3 MPO mRNA および EPO mRNA の Northern Hybridization

Lane 1, HT93; Lane 2, ATRA および G-CSF 添加 HT93; Lane 3, KU-812-F; Lane 4, IL-3 添加 KU812-F. Total RNA (20 mg) を 1% agarose-formaldehyde gel 上に展開し, nitrocellulose filter 上に転写させた. filter は [<sup>32</sup>P] ラベルした cDNA 断片でハイブリダイズした. EPO cDNA 断片によるハイブリダイゼーション (a). MPO cDNA 断片によるハイブリダイゼーション (b). 18S rRNA の ethidium blomide による染色によりそれぞれの細胞株より抽出した total RNA の泳動量を示した.

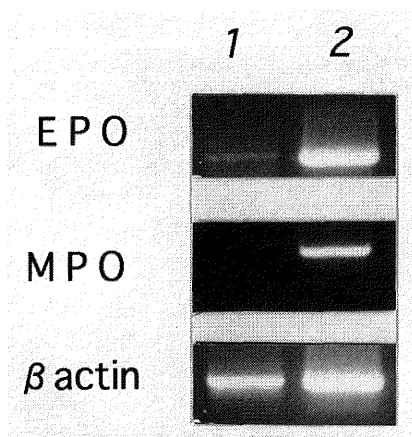


図4 MPO および EPO の RT-PCR

Lane 1, IL-3 添加培養後の KU812-F 細胞. Lane 2, ATRA および G-CSF 添加培養後の HT93 細胞. PCR 産物は 3% agarose gel 上で電気泳動し, ethidiumblomide で染色した. PCR 産物は EPO が 383 bp, MPO が 441 bp である. コントロールとして  $\beta$ -actin 遺伝子を增幅した.



図5 抗好酸球ペルオキシダーゼ抗体を用いた蛍光免疫細胞化学

3日間 IL-3 添加培養した KU812-F 細胞の一部が陽性である. 陽性部位は顆粒ならびに核膜周囲腔である. 検出は FITC を conjugate した二次抗体を用いて行った.

はアレルギー反応の機構解明に重要である. しかしながら, 好塩基球はヒト白血球中の割合が非常に少なく, 好塩基球の分化機構, 機能については未だ不明の点が多い. 好塩基球の peroxidase 活性はこれまで細胞化学的に証明されてきた<sup>9)10)</sup>. しかし, その生体内での機能は不明であり, 現在まで peroxidase 活性を示す蛋白やコード

する遺伝子は単離されていない.

本論文では幼若好塩基球細胞株 KU812-F がその細胞質内顆粒ならびに核膜周囲腔に peroxidase 活性を持っており, 免疫細胞化学により, それらが EPO 蛋白によることを示した. また, さらに Northern Hybridization 法ならびに RT-PCR 法により EPO mRNA の発現

を検討し、EPO が好塩基球において実際に転写され、発現していることを示した。

Dvorak らはヒト臍帯血単核球分画より分化させた、好塩基球の顆粒に peroxidase 活性を認めることを報告し、それが好塩基球で合成されたものではなく、好酸球から放出された EPO の貪食により、生じたものであると推測している<sup>17)</sup>。しかしながら、今回の検討では KU812-F 細胞中に peroxidase 活性を細胞質内顆粒のみならず粗面小胞体や核膜周囲腔にも認められた (図 2 b)。それゆえ、好塩基球の顆粒に認められる peroxidase 活性は好塩基球それ自身により産生されていると考えられる。さらに KU812-F 細胞で Northern Hybridization 法ならびに RT-PCR 法により EPO mRNA の発現を示し得た (図 3a, 図 4) ことは、好塩基球がそれ自身において EPO 遺伝子を転写、合成している可能性を示唆する。

これまでのいくつかの報告により好酸球と好塩基球はその共通の前駆細胞より分化する可能性が示されている。Schmidt らは慢性骨髄性白血病患者の末梢血中に好酸性と好塩基性の顆粒を合わせ持つ hybrid 顆粒球を見出し報告している<sup>18)</sup>。また Joshua らはヒト正常臍帯血単核球分画より分化させた好酸球/好塩基球 hybrid 顆粒球を報告している<sup>19)</sup>。本研究で用いた KU812-F 細胞株が好酸球と好塩基球の共通前駆細胞の性質を持っている可能性や、細胞株の一部が好酸球に分化する可能性は否定できない。しかしながら、KU812-F 細胞を好酸球に分化し得たとの報告は現在までなく、事実今回の研究においても培養中に好酸球は全く出現しなかった。それゆえ、今回示した KU812-F 細胞株にみられた EPO は正常の好塩基球の持つ peroxidase と同一であると考えられる。事実、ヒト正常末梢血から精製した好塩基球について検討したところ、約半数がペルオキシダーゼ活性を持ち、EPO を発現していた (著者ら投稿中)。

今回の結果では培養 KU812-F 細胞中での EPO 陽性細胞の割合は toluidine-bule 染色で異染性を示す細胞の割合より非常に小さかった (図 1b, 図 2a, 図 5)。また Northern Hybridization の結果で EPO mRNA のシグナルが培養前後においていずれも弱く、シグナルの強さに明らかな差異を認めなかった (図 3a)。これらの結果はすべてのヒト好酸球が EPO を発現しているのに対し、好塩基球では一部の細胞にのみ EPO が発現していることを示していると考えられる。

好酸球と好塩基球は好酸球 major basic protein や Charcot-Leyden crystal protein などいくつかの共通

の細胞質内蛋白を持っていることが知られていた<sup>20)</sup>。さらに近年、好塩基球のみならず、好酸球も高親和性 IgE レセプター<sup>21)</sup> や macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1)<sup>22)</sup> を持つことが明らかになり、好酸球と好塩基球は類縁の細胞であると認識されつつある。好酸球と好塩基球は他のアレルギー免疫反応に関わる分子も共有している可能性も考えられる。好塩基球の持つ EPO の生化学的機能は不明であるが、好酸球の EPO が slow reacting substance の不活化作用を持つ<sup>23)</sup> と同様、何らかのアレルギー反応の制御に関わっている可能性もあると思われる。つまり EPO はアレルギー反応に関わる好酸球、好塩基球に共通する分子の一つである可能性がある。EPO を持つ好塩基球と EPO を持たない好塩基球との生体内における機能の相違、アレルギー反応における好酸球と好塩基球の機能的な関連、好酸球と好塩基球の分化機構の詳細については、今後のさらなる研究が必要な課題である。

#### 謝 辞

稿を終えるにあたり、御稿閲を賜りました第一内科相澤義房教授、終始ご指導頂きました輸血部小池正助教授、高密度無菌治療部古川達雄助教授、第一内科鳥羽健先生、岩手県立中央病院岸賢治先生、遺伝子実験施設桑野良三助教授に深謝致します。

#### 参 考 文 献

- 1) Bainton, D.F.: Neutrophil granules. *Br. J. Hematology*, **29**: 17~22, 1975.
- 2) Nichols, A.B., Bainton, F.D. and Farquhar, G.M.: Differentiation of monocytes. *J. Cell. Biol.*, **50**: 498~515, 1971.
- 3) Klebanoff, S.J.: Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. *J. Bacteriol.*, **95**: 2131~2138, 1968.
- 4) Salmon, E.S., Cline, J.M., Schultz, J. and Lehrer, I.R.: Myeloperoxidase deficiency. *N. Engl. J. Med.*, **282**: 250~253, 1970.
- 5) Jong, E.C., Mahmoud, F.A.A. and Klebanoff, J.S.: Peroxidase-mediated toxicity to schistosomula of *SCHISTOSOMANSONI*. *J. Immunol.*, **126**: 468~471, 1981.
- 6) Henderson, W.R., Chi, Y.E. and Klebanoff, S.J.: Eosinophil peroxidase-induced mast cell secretion. *J. Exp. Med.*, **152**: 265~279, 1980.

- 7) **Morishita, K., Tsuchiya, M., Asano, S., Kaziro, Y. and Nagata, S.:** Chromosomal gene structure of human melopsroxidase and regulation of its expression by Granulocyte-colony-stimulating factor. *J. Biol. Chem.*, **262**: 15208~15213, 1987.
- 8) **Sakamaki, K., Tomonaga, M., Tsukui, K. and Nagata, S.:** Molecular cloning and characterization of a chromosomal gene for human epsinophil peroxidase. *J. Biol. Chem.*, **264**: 16828~16836, 1989.
- 9) **Nachman, R., Hirsch, G.J. and Baggiolini, M.:** Studies on isolated membranes of azurophil and specific granules from rabbit polymorphonuclear leukocytes. *J. Cell. Biol.*, **54**: 133~140, 1972.
- 10) **Mitsui, T.:** Notes on the peroxidase activity of human basophil leukocytes. *Tokai J. Exp. Clin. Med.*, **13**(1): 1~8, 1988.
- 11) **Fukuda, T., Kishi, K., Ohnishi, Y. and Shibata, A.:** Bipotential cell differentiation of KU812F: Evidence of a hybrid cell line that differentiates into basophils and macrophage-like cell. *Blood*, **70**: 612~619, 1987.
- 12) **Kishi, K.:** A new leukemia cell line with Philadelphia chromosome characterized as basophil precursors. *Leuk. Res.*, **9**: 381~390, 1985.
- 13) **Valent, P., Basemer, J., Kishi, K., Kaltenbrunner, R., Kuhn, B., Maurer, D., Lechner, K. and Bettelheim, P.:** IL-3 promotes basophilic differentiation of KU812 cells through high affinity binding sites. *J. Immunol.*, **145**: 1885~1889, 1990.
- 14) **Kishi, K., Toba, K., Uesugi, Y., Masuko, M., Niwano, H., Hashimoto, S., Sakaue, M., Furukawa, T., Fuse, I., Takahashi, H., Maekawa, T., Abe, T., Shibata, A. and Aizawa, Y.:** Hematopoietic cytokine dependent differentiation to eosinophils and neutrophils in newly established acute promyelocytic leukemia cell line with t (15; 17). *Exp. Hematol.*, **26**: 135~142, 1998.
- 15) **Yam, L.T., Li, Y.C. and Crosby, H.W.:** Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. *Am. J. Clin. Pathol.*, **55**: 283~290, 1971.
- 16) **Thomas, S.P.:** Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77**: 5201~5205, 1980.
- 17) **Dvorak, M.A., Ishizaka, T. and Galli, J.S.:** Ultrastructure of human basophils developing *vivo*. *Lab. Invest.*, **53**: 57~71, 1985.
- 18) **Schmidt, U., Mlynec, L.M. and Leder, D.L.:** Electron-microscopic characterization of mixed granulated (hybridoid) leukocytes of chronic myeloid leukemia. *Brit. J. Haematol.*, **68** (2): 175~180, 1988.
- 19) **Joshua, A.B., Freind, D., Matsumoto, R., Austen, F.K. and Owen, F.W.:** Differentiation *in vitro* of hybrid eosinophil/basophil granulocytes: autocrine function of an eosinophil developmental intermediate. *J. Exp. Med.*, **182**: 49~57, 1995.
- 20) **Hastie, R. and Chair, B.:** A study of the ultrastructure of human basophil leukocytes. *Lab. Invest.*, **31**: 223~231, 1974.
- 21) **Gounni, A.S., Lamkhoud, B., Ochiai, K., Tanaka, Y., Delaporte, E., Capron, A., Kinet, P.J. and Capron, M.:** High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature.*, **367** (6459): 183~186, 1994.
- 22) **Li, H., Sim, C.T., Andrew, J. and Alam, R.:** The production of macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  by human basophils. *J. Immunol.*, **157** (3): 1207~1212, 1996.
- 23) **Henderson, W.R., Weck, A.L. and Dahinden, C.A.:** Eosinophil peroxidase-mediated inactivation of leukotrienes B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, and D<sub>4</sub>. *J. Immunol.*, **128**(6): 2609~2613, 1982.

(平成10年1月26日受付)