

表題 :

ビスホスフォネートがマクロファージの貪食能に及ぼす作用の検討 : 高輝度蛍光ビーズとヒト単球系培養細胞株 THP-1 を用いた貪食能の定量測定

著者氏名 :

井本しおん¹ 西郷勝康² 坊垣美也子¹ 松元英理子¹ 後藤正徳¹

Shion IMOTO, MD, PhD¹, Katsuyasu SAIGO, MD, PhD², Miyako BOHGAKI, PhD¹, Eriko MATSUMOTO¹, PhD, Masanori GOTO¹.

所属 :

1 神戸常盤大学保健科学部医療検査学科

Faculty of Medical Technology, Department of Health Science, Kobe Tokiwa

University

〒653-0838 神戸市長田区大谷町 2-6-2

Nagata-ku, Kobe, 653-0838, Japan.

2 姫路獨協大学薬学部医療薬学科

Faculty of Pharmaceutical Medicine, Himeji Dokkyo University

〒670-8524 姫路市上大野 7-2-1

Himeji, 653-0838, Japan.

連絡著者

井本しおん

神戸常盤大学保健科学部医療検査学科

〒653-0838 神戸市長田区大谷町 2-6-2

TEL 078-611-1821 FAX 078-643-4361

Corresponding author:

Shion IMOTO, MD, PhD, Faculty of Medical Technology, Department of Health Science, Kobe Tokiwa University, Nagata-ku, Kobe 653-0838, Japan. E-mail

s-imoto@kobe-tokiwa.ac.jp

Title:

The effects of four bisphosphonates on macrophage phagocytosis: Quantitative measurement by flow cytometry using high- fluorescence particles and human monocytic cell line THP-1

Abstract:

Impairment of macrophage phagocytosis is a major cause of chronic inflammation. Bisphosphonates (BPs) are widely used as anti-osteoclastic agents. The effects of BPs on monocyte-macrophage lineage cells are being increasingly reported; however, the detailed effects of BPs on macrophage phagocytic activity are still unclear. We examined the effects of four BPs: clodronate as a non-nitrogen containing BP (non-N-BP), and pamidronate, alendronate, and zoledronate as nitrogen-containing BP (N-BP), on macrophage phagocytic activity. The uptake of high fluorescence-labeled polystyrene beads by the human monocytic cell line THP-1 was investigated by flow cytometry. All three N-BPs suppressed the phagocytosis of macrophages more potently than the non-N-BP, clodronate. Pamidronate and zoledronate were more potent than alendronate. BP induced the apoptosis of THP-1. Pamidronate and zoledronate induced apoptosis more effectively than clodronate. The method described to observe phagocytosis was simple and quantitative, and might be useful in screening for the effects of drugs, such as N-BP and non-N-BP, on phagocytic activity. (156 words)

Key Words:

macrophage (マクロファージ)、phagocytosis (貪食)、bisphosphonates (ビスホスフォネート)、apoptosis (アポトーシス)

【緒言】

マクロファージは自然免疫の中心的役割を担っており、病原菌を貪食処理することにより感染を制御するだけでなく、アポトーシス細胞の貪食により、炎症の解消やホメオスタシス維持をしている。マクロファージの貪食能低下は、感染症の持続や炎症の持続をもたらすことになる^{1,2}。また、慢性炎症の代表的疾患である動脈硬化においてもマクロファージは中心的な役割を果たしている³。マクロファージの貪食能に対する薬剤の作用を検証することは、慢性炎症性疾患の治療薬開発の面でも、薬剤の副作用検討の面でも、重要と思われる。

ビスホスフォネート (BP) は、マクロファージの類縁細胞である破骨細胞の機能を抑制する作用を持ち、骨粗鬆症や悪性腫瘍に伴う骨病変の治療に広く用いられている。最近、BP が破骨細胞以外の単球・マクロファージ系細胞にも作用して抗腫瘍効果や免疫変調効果等を示すことが明らかになりつつある^{4,5}。また、BP は窒素を含有するもの (N-BP) と含有しないもの (non-N-BP) に大別されるが、N-BP を高容量で長期投与すると顎骨壊死という重大な副作用を生じることが明らかになってきた。N-BP による口腔内マクロファージの機能抑制がもたらす易感染性と炎症の持続が顎骨壊死の原因と考えられている^{4,6,7}。BP がマクロファージのアポトーシスを誘導する、という報告もある⁸⁻¹⁰。しかしながら、マクロファージの貪食能に対する BP の作用については、まだあまり検討されていない¹¹。

今回我々は、BP がマクロファージの貪食能に及ぼす作用を、4 種類の BP (non-N-BP として clodronate、N-BP として pamidronate, alendronate, zoledronate) を用いて検討し、若干の知見を得ることができた。

【材料と方法】

A. 材料

1. マクロファージ : ヒト単球系培養細胞株 THP-1 を DS ファーマバイオメディカル社から購入した。
2. 蛍光ビーズ : オレンジ色蛍光色素 (FL-2 で測定) 標識した直径 $1\mu\text{m}$ の polystyrene 蛍光ビーズ(FluoSpheres F-13082 : Invitrogen 社)。蒸留水 1ml あたり 10^{10} 個のビーズを含有。
3. 4 種類のビスホスフォネート
clodronate : clodronate disodium (LKT Laboratories, Inc, Cat.No. C3449)
pamidronate: アレディア点滴静注用 15mg (ノバルティス ファーマ社)
alendronate: テイロック注射液 5mg (帝人ファーマ社)
zoledronate: ズメタ点滴静注用 4mg (ノバルティス ファーマ社)
4. リポソーム化キット : コートソーム EL シリーズ EL-01-N (日油社)
5. アポトーシスアッセイ : Annexin V-FITC Kit (Beckman Coulter 社)および Annexin V-FITC (PromoKine 社)

B. 方法

1. マクロファージ貪食能の測定

THP-1 は 10%FBS を含む RPMI1640 で、 37°C 、5% CO_2 で培養した。 $2 \times 10^5/\text{ml}$ で 24 well plate に各 1ml ずつ分注し、THP-1 を PMA (Phorbol 12-Myristate 13-acetate : Promega 社) 10^{-8}mol/l 存在下で 1~2 日間培養しマクロファージ様に分化させた。

PMA 処理した THP-1 に、培養液で希釈した蛍光ビーズを最終ビーズ濃度 2×10^7 個/ml となるよう添加し、 37°C 5% CO_2 で一定時間培養した。PBS で 2 回洗浄後、THP-1 細胞をトリプシン処理ではがし、PBS で 1 回洗浄後に PBS に浮遊させ、フローサイトメトリー

(flow cytometry; FCM) で蛍光ビーズ貪食細胞比率 (貪食率) を測定した。FCM には FACSCalibur (BD 社) を用いた。BP を様々な濃度とタイミングで添加し、貪食率への影響を検討した。

2. アポトーシス・死細胞の測定

THP-1 細胞を 10%FBS を含む RPMI1640 で、細胞濃度 $2 \times 10^5/\text{ml}$ で 24 well plate に各 1ml ずつ分注し、様々な濃度の BP を添加し一定時間培養後、Annexin V-FITC キットを添付書通りに用いて FCM でアポトーシス・死細胞比率を測定した。

3. リポソーム化 pamidronate の作成法

細胞内への取り込みを促進する目的で、pamidronate のリポソーム化 (脂質二重膜構造を持つリポソーム内に包含させること) を、リポソーム化キット (COATSOME 日油) を用いて行った。添付書通りに pamidronate を蒸留水に溶解し、リポソーム化キットのバイアルに注入し、数回転倒混和した。

【結果】

1. ビーズ貪食の経時変化

THP-1 ($2 \times 10^5/\text{ml}$) を PMA (10^{-8}mol/l) で 1 日間処理後、ビーズ貪食の程度を FCM と蛍光顕微鏡で経時的に測定した (Fig. 1)。

FCM では左端に FL-2 陰性のピーク、右側に陽性ピークが複数認められる。貪食したビーズ数が増加するほどピークは右方向にシフトする。貪食率は M1(%) として算出される (Fig. 1 中央列)。

1 時間後の貪食率は 10.78%、蛍光顕微鏡ではビーズを 1 ~ 2 個貪食した細胞が少数認められた (Fig. 1 右上写真)。4 時間後の貪食率は 41.72%、蛍光顕微鏡ではビーズを数個貪

食した細胞が半数近く認められた (Fig. 1 右中写真)。24 時間後の貪食率は 85.3%、蛍光顕微鏡では多数のビーズを貪食した細胞が認められた (Fig. 1 右下写真)。以降の貪食率測定は蛍光顕微鏡でも差異が観察しやすい 4 時間後に実施した。

2. マクロファージ貪食能に対する BP の作用に関する検討

まず、PMA 処理 THP-1 に蛍光ビーズを添加、直後に 4 種類の BP を様々な濃度で各々添加し、4 時間後のビーズ貪食率を FCM で測定した。代表的な結果を Fig. 2 に示す。pamidronate では $4 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-4} \text{mol/l}$ で貪食率が陰性コントロールより上昇し、さらに高濃度では低下した。他の BP では濃度依存性に貪食率の低下が認められた。独立に 4 回行った実験結果の貪食率平均値 \pm SD は、陰性コントロールでは $39.3 \pm 5.6\%$ 、これに対し、pamidronate では $1 \times 10^{-4} \text{mol/l}$ で有意に上昇 ($57.3 \pm 0.49\%$; $p = 0.0052$)、zoledronate では $2.8 \times 10^{-4} \text{mol/l}$ で有意に低下 ($29.7 \pm 1.5\%$; $p = 0.046$)、alendronate では $7.7 \times 10^{-4} \text{mol/l}$ で有意に低下 ($28.3 \pm 3.5\%$; $p = 0.045$)、clodronate では $6 \times 10^{-3} \text{mol/l}$ で有意に低下 ($16.7 \pm 1.5\%$; $p = 0.0025$)、を各々示した。

次に、pamidronate だけが $4 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-4} \text{mol/l}$ で貪食亢進作用を示した原因を検討した。BP は水溶性であるが、pamidronate だけが $4 \times 10^{-5} \text{mol/l}$ 以上の濃度で CO_2 インキュベーター内に置くと沈殿物を形成した。pamidronate による貪食亢進が、形成された沈殿物による二次的なものであるかどうかを以下のように検討した。PMA 処理した THP-1 に pamidronate を添加して一定時間培養後、生じた沈殿物を洗浄・除去してから蛍光ビーズを添加し、4 時間後に貪食率を測定した。この方法では貪食亢進作用は認められず、濃度および処理時間依存性に貪食抑制作用が認められた (Fig. 3-a)。また、pamidronate をリポソーム化して投与すると沈殿形成は認められず、貪食亢進作用も認められなかった (Fig. 3-b)。以上の結果から、pamidronate で見られた貪食亢進作用は、沈殿物形成による二次的なものであると考えられた。

次に、BP 処理時間を延長すると、より低濃度で貪食抑制が見られるかどうかを検討した。

PMA 処理した THP-1 に、BP を種々の濃度で添加して 24 時間培養した後、蛍光ビーズを添加し 4 時間後に FCM で食食率を測定した。代表的な結果を Fig. 4 に示す。いずれの BP も、ビーズ添加直後から 4 時間処理した場合よりも低濃度で食食抑制作用を示した。独立に 3 回行った実験結果の食食率平均値±SD は、陰性コントロールでは 31±4.6%、これに対し、pamidronate では 3×10^{-5} mol/l で有意に低下 (21.7±3.7%; $p = 0.039$)、zoledronate では 5.6×10^{-5} mol/l で有意に低下 (21.3±2.5%; $p = 0.024$)、alendronate では 3.8×10^{-4} mol/l で有意に低下 (19.7±4.5%; $p = 0.029$)、clodronate では 1.8×10^{-3} mol/l で有意に低下 (19.3±3.1%; $p = 0.016$)、を各々示した。

3. BP のアポトーシス誘導作用

次に、BP によるマクロファージ食食抑制作用が、アポトーシス誘導によるものかどうかを検討した。

THP-1 に 4 種類の BP を様々な濃度で添加し、1~3 日間培養後にアポトーシス/細胞死を Annexin V-FITC キットを用いて FCM で測定した (Fig. 5-a)。Annexin-V 陽性 propidium iodide (PI) 陰性細胞をアポトーシス細胞、Annexin V 陽性 PI 陽性細胞をアポトーシス後死細胞と見なした。

pamidronate (1×10^{-4} mol/l) では、2 日間処理ではアポトーシス細胞の増加は認められず、3 日間 (72 時間) 以上処理した場合、その増加が認められた (Fig. 5-b)。

BP で 3 日間処理すると、pamidronate では 3×10^{-5} mol/l 以上、zoledronate では 1.4×10^{-4} mol/l 以上でアポトーシスの増加が認められた (Fig. 5-c,d)。alendronate では 7.7×10^{-4} mol/l でもアポトーシスの増加は認められなかった (Fig. 5-e)。clodronate では 1.8×10^{-3} mol/l までアポトーシス増加は認められず、 3.6×10^{-3} mol/l 以上でアポトーシスが著増した (Fig. 5-f)。

【考察】

今回我々は、BP がマクロファージの貪食能に及ぼす作用について、4 種類の BP (clodronate, pamidronate, alendronate, zoledronate) を用いて比較検討した。

BP は non-N-BP と N-BP に大別される。non-N-BP は細胞内で代謝された結果生じた ATP 誘導体が細胞毒性を発揮する。N-BP は、細胞内では代謝されないが、コレステロール合成経路であるメバロン酸経路の阻害により GTP 蛋白の脂質修飾 (プレニル化) を阻害する^{4,5}。GTP 蛋白の中でも、Rho や Rac などは、細胞の運動や形態変化に重要であり、マクロファージの貪食にも関与している¹²⁻¹⁵。プレニル化が阻害されれば、これら GTP 蛋白は正常に機能できなくなる可能性がある。

4 種類の BP はいずれも貪食抑制作用を示した。24 時間処理した場合に貪食抑制を示す濃度は、pamidronate, zoledronate では 10^{-5} mol/l レベル、alendronate, では 10^{-4} mol/l レベル、clodronate では 10^{-3} mol/l レベルであった。zoledronate では 10^{-6} ~ 10^{-3} mol/l でヒト末梢血単球由来マクロファージの貪食抑制が起きることを Wolf らも報告している¹¹。

貪食抑制を示す濃度で3日間BP処理すると、pamidronate>zoledronate>alendronate の順でアポトーシス誘導が認められた。Moreau らは、pamidronate, alendronate, zoledronate, および non-N-BP の etidronate で、同様の結果を報告している⁹。

BP によるアポトーシス誘導には3日間以上の処理が必要であったが、BP による貪食抑制作用は短時間の処理で認められたことから、貪食抑制作用にはアポトーシス誘導以外の機序が関与している可能性が示唆された。貪食に必要な GTP 蛋白の機能阻害¹²⁻¹⁵による可能性などさらなる検討が必要である。

non-N-BP である clodronate では、貪食抑制にもアポトーシス誘導にも N-BP より高濃度 (10^{-3} mol/l レベル) が必要であった。高濃度では高度のアポトーシス/細胞死が認められ、代謝産物の細胞毒性によるものと考えられた¹⁰。

Pamidronate では、 10^{-5} ~ 10^{-4} mol/l で貪食亢進作用が認められたが、これは沈殿物形成

による二次的なものであることがわかった。貪食させる物質の性状によって貪食能が変化することを示しており¹⁵、何をどのように貪食させるかの条件設定の重要性が再認識された。

以上、4種類のBPが貪食能に及ぼす影響を検討し、N-BPではnon-N-BPより貪食抑制作用が強力であること、N-BPでも化合物によって貪食抑制作用に差があること、を示すことができた。4種類のBPでマクロファージ貪食能に対する作用を評価した報告は、本論文が初めてである。貪食抑制を示す濃度は、BPを治療薬として投与した場合の血中濃度（最大値およそ 10^{-6} mol/l）より高値であるが、この濃度は骨周辺や石灰化組織周辺において蓄積可能なレベルである^{5,16}。N-BPの種類による貪食抑制作用の違いが、N-BPの重大な副作用である顎骨壊死の発生と関係するかどうか、臨床的に興味深い。

貪食能の評価法には様々な方法が用いられている¹⁷⁻²⁰。貪食させる物質には、ビーズ、細菌、血球やアポトーシス細胞等が用いられ、さらにそれらをオプソニン化する場合としない場合、など多彩である。評価方法も、目視法、光度計を用いる方法、FCMなどがある。論文によって方法が異なるため、結果の比較検討には注意が必要である。

今回用いた蛍光ビーズとFCMによる貪食能の評価法は、蛍光顕微鏡で目視する方法に比べ観察者によるバラツキがなく客観的な評価が可能である。ビーズの蛍光強度が強いため、貪食陽性の細胞集団と陰性の細胞集団のヒストグラムが重なることがなく、貪食能を貪食陽性細胞比率として簡単に定量評価できる。ヒト単球系培養細胞株THP-1は、通常は浮遊細胞であるため維持培養が容易である。今回示した方法はマクロファージの貪食能をすべて反映するものではないが、簡便かつ客観性に優れており、薬剤、化合物や患者血漿中成分の貪食に対する作用をスクリーニングする方法として有用性が示唆される。今後従来法との比較検討を行い評価する必要がある。

【結語】

4種類のBPが貪食能に及ぼす影響を検討した。N-BPではnon-N-BPより貪食抑制作用

が強力であった。N-BP3 種類の比較では、pamidronate と zoledronate は alendronate より食食抑制作用が強力であった。

高輝度蛍光ビーズとヒト単球系培養細胞株 THP-1 を用いる食食能評価法は、マクロファージ食食能のスクリーニング検査法として有用である可能性が示唆された。

謝辞

本研究に協力してくれた神戸常盤大学の卒業研究ゼミ学生達に深謝いたします。

本研究は、神戸常盤大学の平成 23 年度共同研究、平成 24 年度ジョイント研究として研究費助成を受けました。

【文献】

- 1 Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 2012; 122: 787-95.
- 2 Ortega-Gómez A, Perretti M, Soehnlein O. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med* 2013; 5: 661-74.
- 3 Tabas, Ira. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 36-46.
- 4 井本しおん 骨粗鬆症治療薬ビスホスホネートの新たな役割—抗腫瘍効果の可能性
神戸常盤大学紀要 2013; No. 6 : p9-19 <http://bulletin.kobe-tokiwa.ac.jp/2013.html>
- 5 Roelofs AJ, Thompson K, Ebetino FH, et al. Bisphosphonates: molecular mechanisms of action and effects on bone cells, monocytes and macrophages. *Curr Pharm Des.* 2010; 16: 2950-60.
- 6 Pazianas M. Osteonecrosis of the jaw and the role of macrophages. *J Natl Cancer Inst.* 2011; 103: 232-40.
- 7 Reid IR, Cornish J. Epidemiology and pathogenesis of osteonecrosis of the jaw. *Nat Rev Rheumatol.* 2011; 8: 90-6.
- 8 Miwa A, Takezako N, Hayakawa H, et al. YM-175 induces apoptosis of human native monocyte-lineage cells via inhibition of prenylation. *Am J Hematol* 2012; 87: 1084-8.
- 9 Moreau MF, Guillet C, Massin P, et al. Comparative effects of five bisphosphonates on apoptosis of macrophage cells in vitro. *Biochem Pharmacol.* 2007; 73: 718-23.
- 10 Schmidt-Weber CB, Rittig M, Buchner E, et al. Apoptotic cell death in activated monocytes following incorporation of clodronate-liposomes. *J Leukoc Biol.* 1996; 60: 230-44.

- 11 Wolf AM, Rumpold H, Tilg H, et al. The effect of zoledronic acid on the function and differentiation of myeloid cells. *Haematologica*. 2006; 91: 1165-71.
- 12 Caron E, Hall A. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science*. 1998; 282: 1717-21.
- 13 Cox D, Chang P, Zhang Q, et al. Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes. *J Exp Med*. 1997; 186: 1487-94.
- 14 Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 2002; 420: 629-35.
- 15 Underhill DM, Goodridge HS. Information processing during phagocytosis. *Nat Rev Immunol*. 2012; 12: 492-502.
- 16 Roelofs AJ, Coxon FP, Ebetino FH, et al. Fluorescent risedronate analogues reveal bisphosphonate uptake by bone marrow monocytes and localization around osteocytes in vivo. *J Bone Miner Res*. 2010; 25: 606-16.
- 17 Suganuma H, Fahey JW, Bryan KE, et al. Stimulation of phagocytosis by sulforaphane. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; 405: 146-51.
- 18 Lim J, Kim Y, Han K, et al. Flow cytometric monocyte phagocytic assay for predicting platelet transfusion outcome. *Transfusion*. 2002; 42: 309-16.
- 19 Ackerman ME, Moldt B, Wyatt RT, et al. A robust, high-throughput assay to determine the phagocytic activity of clinical antibody samples. *J Immunol Methods*. 2011; 366: 8-19.
- 20 酒井寛, 森勝志, 片山善章, 他. 蛍光標識生体粒子を用いた貪食能試験と蛍光標識ビーズとの貪食能の差異 *臨床病理* 1994; 42: 986-91

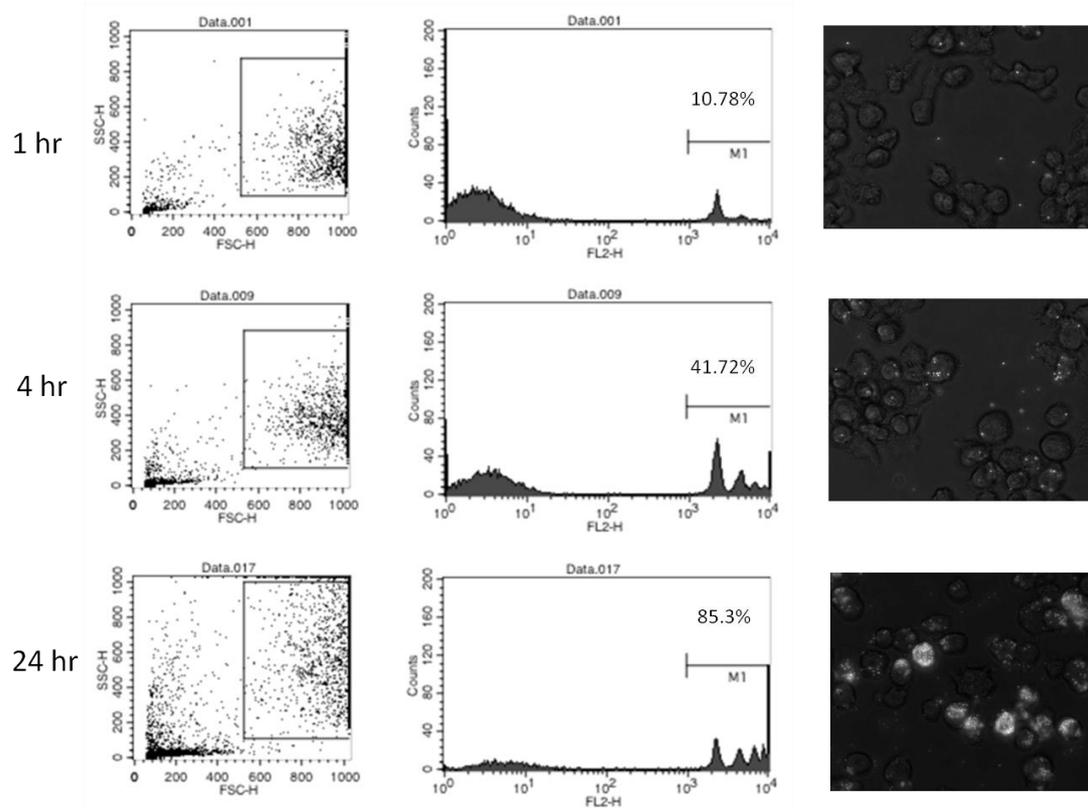


Fig. 1. Time-course of THP-1 phagocytosis

Uptake of fluorescence-labeled beads by THP-1 was measured with flow cytometry (left and middle columns) and fluorescence microscopy (right column), after incubation for 1 hr (upper lane), 4 hrs (middle lane), and 24 hrs (lower lane).

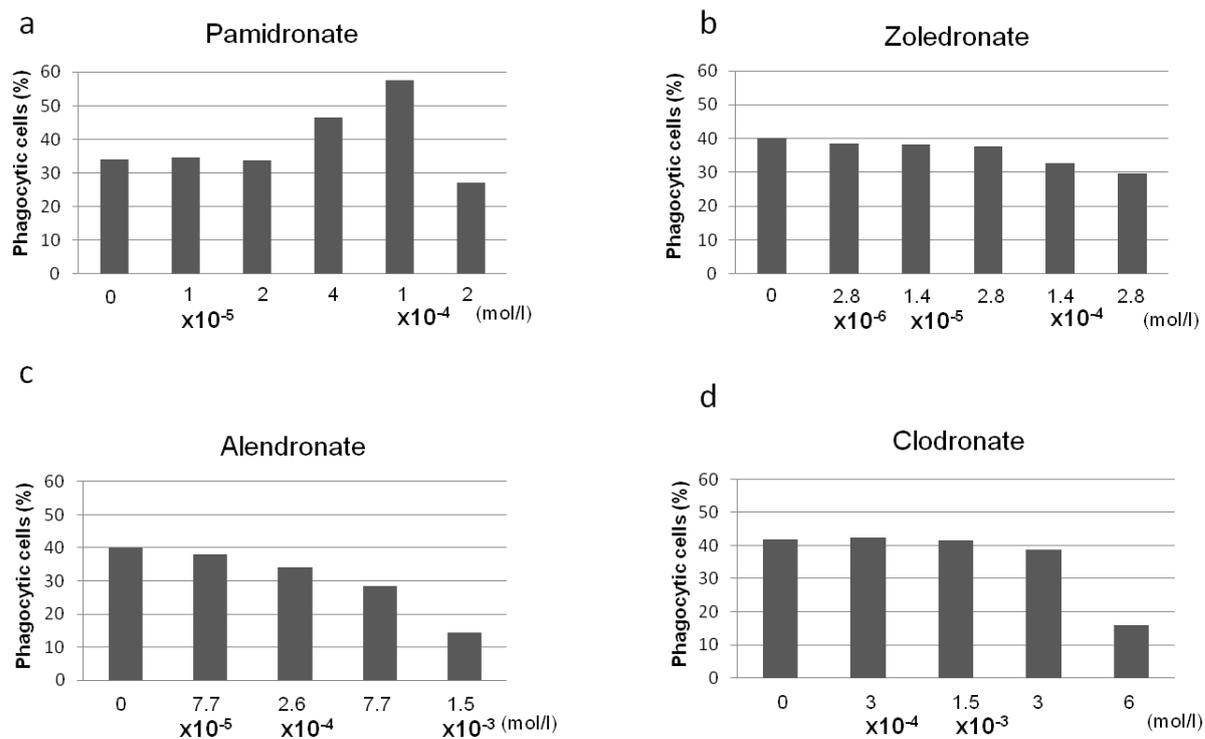


Fig. 2. Phagocytosis after BP treatment for 4 hr

BPs were added simultaneously with beads and phagocytosis was measured 4 hrs later.

Each experiment was performed in triplicate. Mean values are shown by columns.

A representative of four individual experiments is shown.

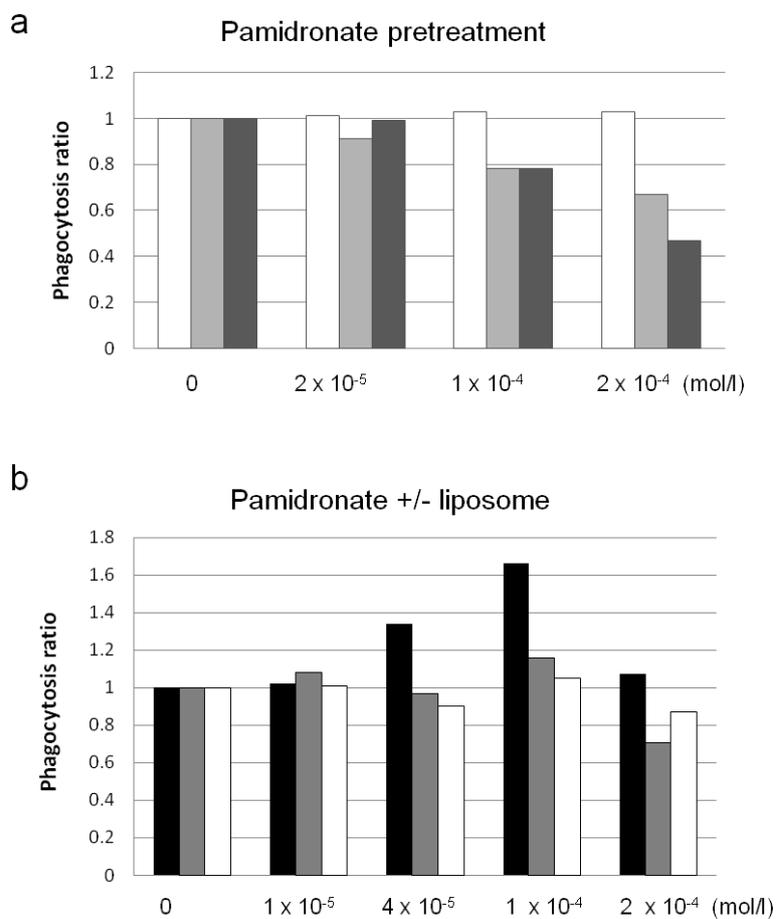


Fig. 3. Pamidronate treatment methods and phagocytosis

a: THP-1 was treated with pamidronate for 1 hr (□), 6 hrs (■), or 18 hrs (■). After washing, beads were added and phagocytosis was measured 4 hrs later. A representative of two independent experiments is shown.

b: Pamidronate with or without liposomal encapsulation was added simultaneously with beads and phagocytosis was measured 4 hrs later. ■ Pamidronate alone, ■ Liposomal pamidronate, □ Liposome alone. A representative of two independent experiments is shown.

In a and b, phagocytosis is shown as a relative ratio to the negative control (pamidronate, 0 mol/l).

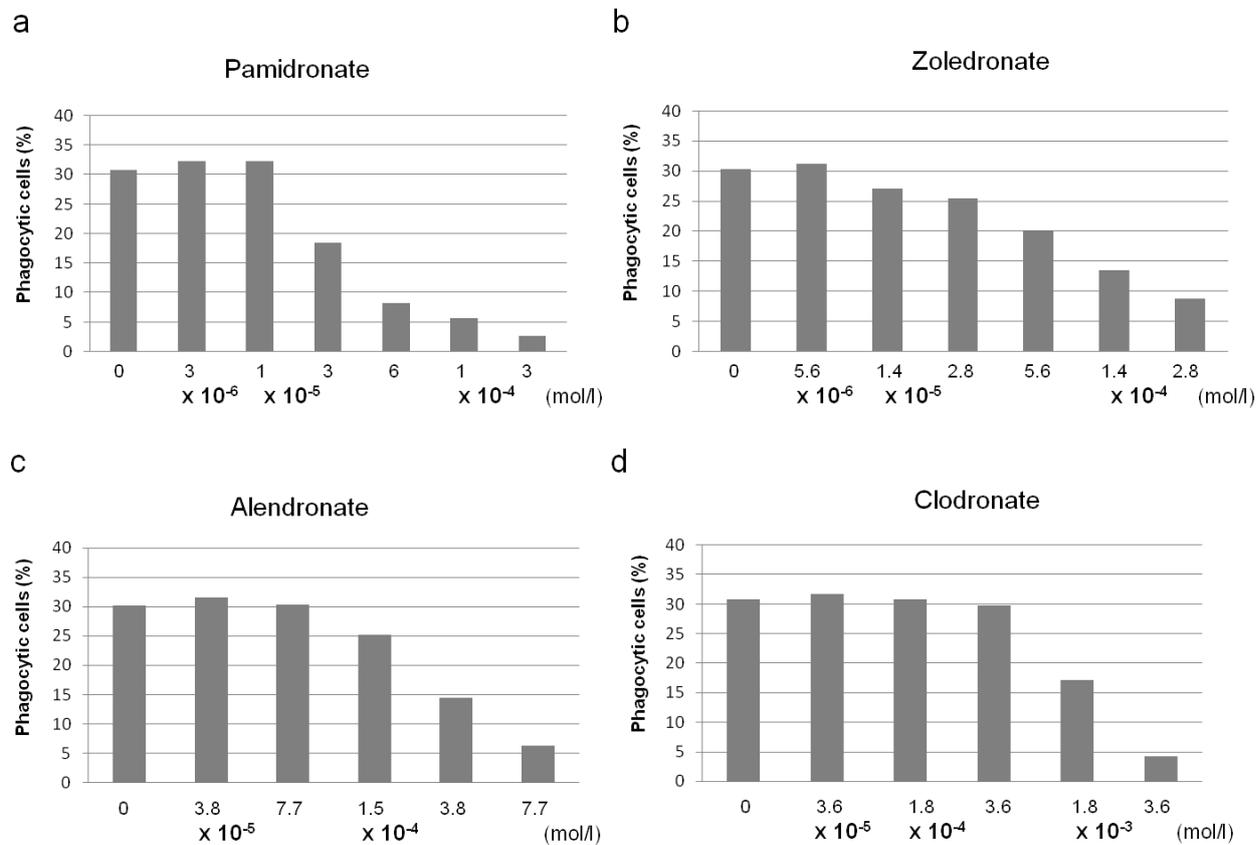


Fig. 4. Phagocytosis after BP treatment for 24 hr

THP-1 was treated with BP for 24 hr before the addition of beads. Each experiment was performed in triplicate. Mean values are shown by columns. A representative of three independent experiments is shown.

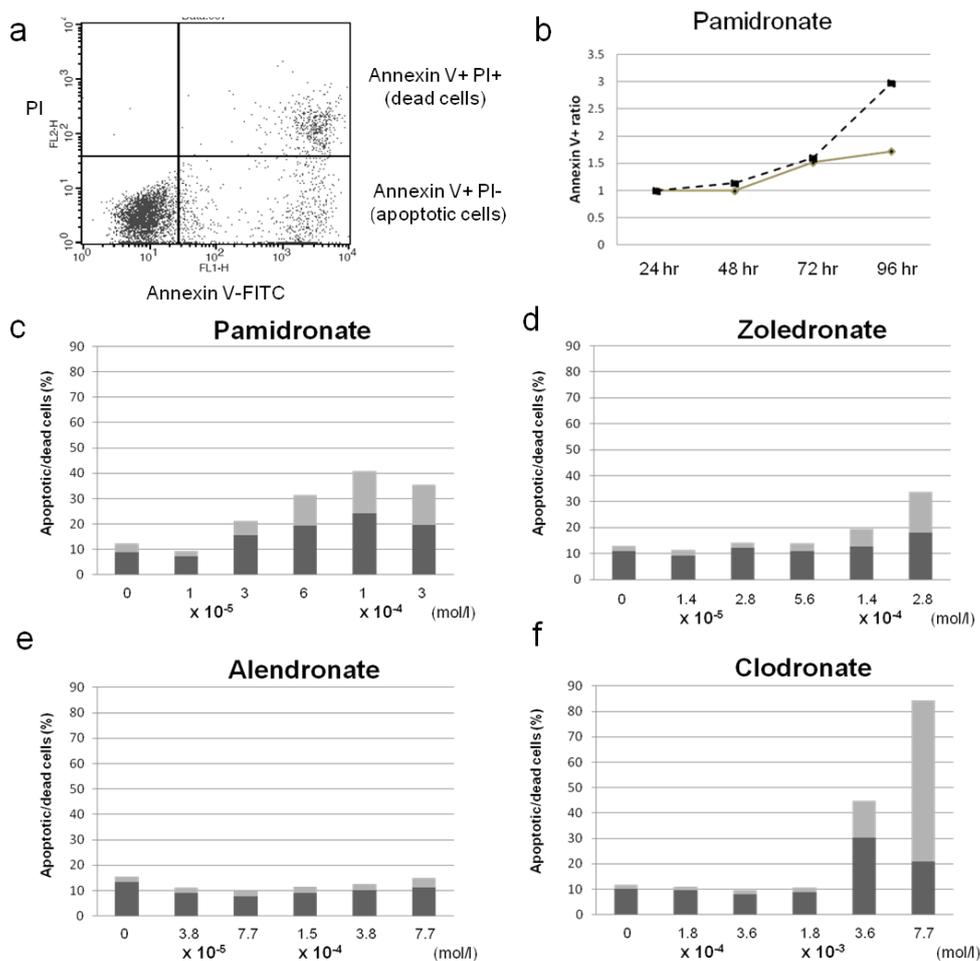


Fig. 5. Apoptosis after BP treatment

Apoptosis and cell death after BP treatment was measured with Annexin V and PI.

a: Cytogram after 3 days of zoledronate (1×10^{-4} mol/l) treatment. Apoptotic cells (Annexin V+PI-) in the lower right quadrant, dead cells (Annexin V+PI+) in the upper right quadrant.

b: Pamidronate treatment periods and the ratio of Annexin V+ cells to those of the negative control (pamidronate, 0 mol/l). Pamidronate at 3×10^{-5} mol/l is shown with a solid line and 1×10^{-4} mol/l with a broken line.

c-f: Rates of Annexin V+PI- (■) and Annexin V+PI+ (■) cells after 3 days of BP treatment. A representative of two independent experiments is shown.