

リポ多糖（LPS）によってマクロファージに短時間で  
誘導される細胞障害に関する研究

～ p38 MAPK の持続的リン酸化と MAP kinase phosphatase-1 (MKP-1)の関与 ～

小濱 清子

## 【抄録】

マクロファージ系細胞株 J774.1/JA-4 細胞にリポ多糖 (LPS) とタンパク質合成阻害剤である cycloheximide (CHX) や anisomycin を併用すると短時間でアポトーシスを介して細胞障害が誘導される。この細胞障害は、LPS 単独で処理した場合にみられるマクロファージの活性化を介さず、種々の炎症性サイトカインの産生を伴わない。この短時間で誘導される細胞障害について、LPS のシグナル伝達に焦点をあてて、p38 MAP kinase (p38 MAPK) と関連する脱リン酸化酵素に着目した。MAP kinase phosphatase-1 (MKP-1) はリン酸化された p38 MAPK (p-p38 MAPK) を脱リン酸化する酵素として知られており、その発現を抑制する化合物として triptolide がある。Triptolide と LPS を併用すると、CHX や anisomycin と同様に細胞障害を誘導した。その際、p-p38 MAPK は、LPS 単独で処理された時とは異なり、持続的に核内に局在した。LPS の初期のシグナル伝達の関係性については、toll-like receptor 4 (TLR4) に変異のある C3H/HeJ マウス由来腹腔マクロファージや CD14 の細胞表面の局在に異常があるマクロファージ系細胞変異株 LPS1916、LCR1-1、LCR1-3 を用いて検討を行った。いずれの細胞においても、親株で誘導された細胞障害は抑制された。これらの結果から、この短時間で誘導されるマクロファージの細胞障害は、LPS のシグナル伝達が重要であり、TLR4 と CD14 の両方を介して誘導され、MKP-1 の発現が活性化と細胞障害の分岐に関与している可能性が示唆された。また、triptolide と同様に抗炎症作用を持つ生薬成分 Shikonin についても、LPS 処理マクロファージに対して活性化を介さない細胞障害を誘導することが確認されている。これらの化合物が持つ抗炎症作用の作用機序として、細胞障害誘導を介した、炎症性サイトカインの産生細胞の除去という新たな可能性を示唆するものである。

キーワード : lipopolysaccharide (LPS), p38 MAP kinase (p38 MAPK), MAP kinase phosphatase-1 (MKP-1), cell death

## 【目次】

第1章 マクロファージの活性化を介さない LPS 処理マクロファージの細胞障害	3
1-1. 序論	3
1-2. 実験方法	5
1-2-1. 細胞培養	5
1-2-2. 細胞障害の誘導とその評価方法	5
1-2-3. タンパク質合成の定量	6
1-2-4. アポトーシスの検出	7
1-3. 実験結果	8
1-3-1. LPS とタンパク質合成阻害剤で誘導される細胞障害およびホスファターゼの関与についての検討	8
1-3-2. タンパク質合成の定量	10
1-3-3. アポトーシスの検出	10
1-4. 考察	11
第2章 LPS 処理刺激マクロファージにおける MKP-1 の誘導と TRIPTOLIDE による転写阻害	14
2-1. 序論	14
2-2. 実験方法	14
2-2-1. 定量的 RT-PCR	14
2-2-2. ウェスタンブロッティング法によるタンパク質の発現及びリン酸化の検出	16
2-2-3. リン酸化 p38 MAPK(p-p38 MAPK) の局在の確認	18
2-3. 実験結果	19
2-3-1. Triptolide による MKP-1 の転写抑制の測定	19
2-3-2. MAP kinase のリン酸化と MKP-1 の発現	19
2-3-3. リン酸化 p38 MAPK(p-p38 MAPK)の細胞内局在性の確認	20
2-4. 考察	21
第3章 LPS 耐性マクロファージ変異株および LPS 低反応性マクロファージにおける LPS +Triptolide による細胞障害の誘導抑制	23
3-1. 序論	23
3-2. 実験方法	24
3-2-1. 細胞培養	24
3-2-2. マウス腹腔マクロファージの回収	24
3-2-3. 細胞障害の誘導とその評価方法	25
3-3. 実験結果	25

3-4. 考察	27
総括	28
謝辞	32

## 第 1 章 マクロファージの活性化を介さない LPS 処理マクロファージの細胞障害

### 1-1. 序論

リポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) はグラム陰性菌の外膜成分であり、脂質と多糖から構成されている。その活性の本体は、リピド A と呼ばれるリン酸化されたアシルキトビオース構造をもつ脂質で、これに菌の外膜から外に向かって突き出した多糖構造をもつ糖鎖 (O 多糖)、及びリピド A と O 多糖を連結するコア糖鎖 (R コア) の 3 つの部分から LPS は構成されている。LPS の宿主への主な作用として、発熱性、血管拡張作用、血管内血液凝固作用、免疫賦活作用、及び抗腫瘍作用などがあり、その他、様々かつ強力な生理活性を有することが知られている<sup>1-4)</sup>。

これらの多様な LPS の生理活性は、LPS の直接作用によるものだけでなく、LPS が種々の標的細胞に作用した結果産生される炎症性サイトカインやケミカルメディエーターなどを介した二次的な作用によるものが多い<sup>5)</sup>。これらの標的細胞の中でも、特に免疫担当細胞であるマクロファージは、LPS の作用発現の中心的な役割を果たす<sup>5,6)</sup>。LPS のマクロファージに対する作用に関する研究の中で、マクロファージの活性化を介したサイトカインやケミカルメディエーター産生、及びそれらの二次的作用については、近年、活発に研究が進められてきた。例えば、TNF- $\alpha$  などのマクロファージが産生する炎症性サイトカインによって、全身の組織、器官にとどまらずマクロファージ自身にも作用して、マクロファージの細胞障害が誘導されるが、この現象については多くの研究が進められてきた<sup>7-9)</sup>。しかし、LPS がマクロファージの活性化を介さず、短時間かつ直接的に誘導する細胞障害機構については、依然不明な点が多い。

当研究室のこれまでの研究により、マウスマクロファージ系細胞株 J774.1 の亜株、JA-4 細胞を、タンパク質合成阻害剤である cycloheximide (CHX) や anisomycin の存在下で LPS と共に培養することで、短時間（4 時間以内）にマクロファージの活性化を伴わない細胞障害が誘導されることが報告されている<sup>10-15</sup>。この細胞障害は、LPS やタンパク質合成阻害剤について、それぞれ単独では細胞障害を示さない濃度において、同時に添加することによって誘導されることから、LPS によってマクロファージに誘導される、何らかの細胞障害抑制因子の生合成を CHX や anisomycin などのタンパク質合成阻害剤が阻害することによって誘導されると考えられる。更に、LPS と CHX による細胞障害は、LPS 処理から 60 分間以後に CHX を添加しても誘導されなくなることから、この細胞障害に関与する細胞障害抑制因子があるとすれば、LPS 刺激後 60 分間以内に生合成が誘導される因子であると考えられる。そこで、本章では、LPS シグナルの初期に誘導されるタンパク質について検討を行った。当研究室のこれまでの研究により、LPS 単独処理と LPS+CHX 処理との間で、シグナル伝達の様式で異なる活性化パターンを示す因子が見つかっている<sup>13,14</sup>。それが、Mitogen-activated protein (MAP) kinases の一つである p38 MAPK と JNK である。これらの MAP kinases は、LPS 刺激後、15 分間以内にリン酸化される。その後、リン酸化された MAP kinases は下流のシグナルからのフィードバックがかかり、急速に脱リン酸化が進む。しかしながら、CHX と LPS を同時に添加した場合、このフィードバックが起こらず、マクロファージの中で持続的にリン酸化された状態が続くことが確認されている<sup>13,14</sup>。更に、LPS と p38 MAPK の阻害剤である SB202190 との併用においても、LPS と CHX を添加した時と同様の細胞障害が起きる。この時は、SB202190 の添加により、LPS 刺激による p38 MAPK を介した下流の因子のリン酸化は阻害されるが、p38 MAPK のリン酸化自体は逆に持続している<sup>13</sup>。これらの実験結果から、この短時間で誘

導される細胞障害機構において、リン酸化された p38 MAPK が示す役割は、キナーゼ活性による下流へのシグナル伝達ではないと示唆され、活性化と細胞障害誘導との重要な分岐点であると考えた。そこで、リン酸化された p38 MAPK を脱リン酸化するホスファターゼに注目した。特に、LPS と CHX を添加することによって誘導されるリン酸化 p38 MAPK(p-p38 MAPK)は、核に局在していることが LSM を用いた蛍光顕微鏡観察により確認されているため、p-p38 MAPK や p-JNK を脱リン酸化するという報告があるホスファターゼの中でも、核内に存在するといわれている Protein Phosphatase 2A (PP2A) と MAP kinase phosphatase-1 (MKP-1) という二つのホスファターゼに焦点を当てて研究を行った<sup>16,17)</sup>。

## 1-2. 実験方法

### 1-2-1. 細胞培養

マウス由来のマクロファージ系細胞株、J774.1/JA-4 細胞は、非働化した 10%ウシ胎児血清 (Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A.)、50 U/mL penicillin 及び 50 µg/mL streptomycin (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を含む Ham's F-12 培地 (Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A.) を用いて、CO<sub>2</sub> インキュベーター内 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% humidified air) で培養した。JA-4 細胞の培養と継代には 100 mm ディッシュ (Falcon #1001, Corning, NY 14831, U.S.A.) を用い、2~3 日毎に継代した。LPS に対する応答性などの細胞の性質を安定して評価するため、細胞は細胞ストックから起こした後、約 5~20 継代分までを実験に用いた。

### 1-2-2. 細胞障害の誘導とその評価方法

JA-4 細胞を  $1 \times 10^5$  cells/well で 48 穴プレート (Corning #3548, Corning, NY 14831, U.S.A.) に播種し、数時間から一晩前培養した後、新しい培地に交換し、100 ng/mL



LPS from *Escherichia coli* O55:B5 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) の存在下または非存在下で、cycloheximide (和光製薬工業, Osaka, Japan)、anisomycin (和光製薬工業, Osaka, Japan) または triptolide from *Tripterygium wilfordii* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) を添加して 37°C、4 時間培養した。その後、上清をマイクロチューブに回収し、4°C、10,000 rpm で 1 分間遠心し、その上清を試料とした。培養上清中に遊離された乳酸脱水素酵素(LDH)量は、LDH アッセイキット (極東製薬工業, Tokyo, Japan または和光製薬工業, Osaka, Japan) を用いて定量した。なお、各試料中の LDH 量は、0.1% TritonX-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) で 37°C、15 分間処理した細胞から培養上清中に遊離された LDH 量を全 LDH 量 (total release; 100%) として対照にとり、また無添加 0 time における LDH 遊離量をバックグラウンド (BG release ; 0%) として差し引いた値を相対値として表した。

$$\text{LDH release (\% of total)} = \frac{(\text{Experimental release} - \text{BG release})}{(\text{Total release} - \text{BG release})} \times 100$$

### 1-2-3. タンパク質合成の定量

タンパク質合成は、メチオニンとシステインを含有しない RPMI1640 培地 (Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A.) に 10%非働化ウシ胎児血清 (Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A.) と 50 U/mL penicillin (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)、50 µg/mL streptomycin (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を添加した培地を用い、L-[<sup>35</sup>S]-methionine と L-[<sup>35</sup>S]-cysteine (GE Healthcare, Chicago, Illinois, U.S.A.) を添加して、細胞への取り込み量により評価した。

JA-4 細胞を  $1 \times 10^5$  cells/well/250µL で 48 穴プレートに播種し、一晩通常の Ham's F-12 培地で培養した後、0.2 µCi/well ずつアイソトープの入った培地と交換し、100 ng/ mL LPS from *Escherichia coli* O55:B5 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.)

の存在下で、cycloheximide (和光製薬工業, Osaka, Japan)、anisomycin (和光製薬工業, Osaka, Japan)または triptolide from *Tripterygium wilfordii* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) を添加して 37°C、60 分間培養した。その後、培地を除き、PBS (-) で洗浄後、氷冷した 10%トリクロロ酢酸 (trichloroacetic acid, TCA (和光製薬工業, Osaka, Japan)) を 250  $\mu$ L/well 添加し、氷上に 15 分間おいた後、上清を除き、5%TCA で 3 回洗った。0.1 M NaOH を 200  $\mu$ L 加えて細胞を溶解し、20  $\mu$ L の 1 M HCl で中和後、3 mL の ACS-II (GE Healthcare, Chicago, Illinois, U.S.A.) と混合し、液体シンチレーションカウンター (Tri-Carb 1600CA (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, U.S.A.)) で放射活性を測定した。各試薬処理時のタンパク質合成能は試薬を処理していない対照に対する割合で表した。

#### 1-2-4. アポトーシスの検出

8 穴の無蛍光スライドガラス (松浪硝子工業, Osaka, Japan) に JA-4 細胞を約  $1.5 \times 10^3$  cells/well ずつ接着させて前培養した後、培地を交換するとともに試薬を添加して 3.5 時間培養した。その後、10%ホルマリン液 (和光製薬工業, Osaka, Japan) を用いて 30 分間、室温で固定した。TUNEL 染色はアポトーシス *in situ* 検出キットワコー (和光製薬工業, Osaka, Japan)または *in situ* Apoptosis Detection Kit(Takara Bio, Shiga, Japan)を用いて行った。染色した細胞を光学顕微鏡下 (アポトーシス *in situ* 検出キットワコー使用時) または蛍光顕微鏡下 (*in situ* Apoptosis Detection Kit 使用時) で観察し、無作為に各群の 10 視野 (各視野 10 個以上の細胞) ずつを選び撮影した後、TUNEL 陽性細胞の割合を計算した。TUNEL 陽性率は、観察した総細胞数に対する TUNEL 陽性細胞の比率(%)で表した。なお、結果は 10 視野の平均値 $\pm$ 標準誤差(S.E.)で表した。

### 1-3. 実験結果

#### 1-3-1. LPS とタンパク質合成阻害剤で誘導される細胞障害およびホスファターゼの関与についての検討

J774.1/JA-4 細胞を 100 ng/mL LPS で 4 時間培養したところ、細胞が伸展し、細胞内に小胞が出現して活性化している像が観察された (Fig. 1b)。また、10  $\mu$ g/mL CHX 添加により、細胞は丸くなり、プレートへの接着性が低下している像が得られた (Fig. 1c)。しかし、いずれも単独での処理では細胞障害が見られなかった。しかし、LPS と CHX の両者を併用すると、細胞が縮小し、核や細胞質の断片化と細胞膜の破壊が確認でき、顕著な細胞障害が観察されるようになった (Fig. 1d)。この細胞障害を定量するため、4 時間培養した細胞の培養上清中に遊離された LDH 量を測定した。その結果、濃度が 10  $\mu$ g/mL 以下の CHX では、単独で処理した場合に JA-4 細胞からの有意な LDH の遊離を誘導しなかった。一方、100 ng/mL LPS を併用すると、CHX の濃度が 1  $\mu$ g/mL 以上で有意な LDH の遊離が見られた (Fig. 2)。また、CHX とは構造が異なるタンパク質合成阻害剤である anisomycin についてもこれと同様の検討を行った。その結果、濃度が 1.5  $\mu$ g/mL 以下において、anisomycin 単独では LDH の遊離が見られなかった。一方、100 ng/mL LPS と併用した時には、0.5  $\mu$ g/mL 以上の anisomycin において有意な LDH の遊離が観察された (Fig. 2)。これらの結果から、LPS 処理マクロファージにおける短時間で誘導される細胞障害においては、LPS だけではなく、何等かのタンパク質合成の阻害が必要であることが示唆された。

次に、CHX と LPS の添加による細胞障害の誘導に必要な培養時間を調べた (Fig. 3)。CHX と LPS を添加した後、培養時間依存的に細胞障害が現れ、LDH の遊離量が上昇した。そこで、LPS を添加した後、CHX を加えるまでの時間がマクロファージへの細胞障害の誘導にどのような影響を及ぼすか検討した。実験は、

LPS 添加から 0~75 分後に CHX を添加し、その後 4 時間で遊離される LDH 量を比較した。その結果、LPS を加えてから CHX を添加するまでに 30 分間を超過すると、その後 4 時間培養した細胞の培養上清中に遊離される LDH 量は減少し始め、75 分間になるとほぼバックラウンドレベルにまで低下した (Fig. 3)。Anisomycin の添加時間についても、CHX と同様に、LPS 添加後 75 分間になると LDH の遊離量がバックグラウンドレベルまで低下した (Fig. 3)。これらの結果はいずれも、LPS によるマクロファージの細胞障害の誘導にとって、LPS 添加後 30 分間までにタンパク質合成が阻害されていることが重要であることを示唆しており、従来の研究結果を再現するものである。

次に、LPS 処理した JA-4 細胞の細胞障害におけるホスファターゼの関与を調べるために、ホスファターゼ阻害剤等を用いた検討を行った。セリン/スレオニンホスファターゼである Protein Phosphatase 2A (PP2A) の阻害剤として endothall を用いた。一方、チロシン及びセリン/スレオニンを脱リン酸化できる二重特異性ホスファターゼである MAP kinase phosphatase-1 (MKP-1) の発現を抑制する薬剤として triptolide を用いた。その結果、LPS 処理した JA-4 細胞に endothall を添加しても、1  $\mu$ M 以下では細胞障害が起こらなかった。また、LPS 添加の 30 分前、60 分前に endothall を前処理しておいた場合でも、細胞障害は起こらなかった (Fig. 4)。これに対して、LPS 添加の 30 分前に triptolide を添加して、LPS を添加した後 4 時間培養した場合、LPS 未添加と比較して、有意な LDH 遊離が見られた (Fig. 4)。位相差顕微鏡下での観察においても、LPS と triptolide との併用によって細胞が断片化されてアポトーシス小体が出現し、細胞障害が誘導されている像が確認された (Fig. 5d)。培養時間についても、CHX の時と同様に、培養時間依存的に細胞障害が現れ、LDH の遊離量が上昇した (Fig. 6)。

また、前述のように、LPS 添加から 75 分後に CHX を添加した場合、LDH の遊

離量はバックラウンドレベルまで低下したが、triptolide の添加時間についても同様に、LPS 添加から時間がたつにつれ、LDH の遊離量は有意に低下し、30～60 分における添加では細胞障害は誘導されなかった (Fig. 7)。

### 1-3-2. タンパク質合成の定量

CHX や anisomycin はタンパク質合成阻害剤であり、これらを用いて LPS 処理マクロファージのタンパク質合成を阻害すると細胞障害が誘導されることが示唆された。そこで、LPS 処理マクロファージに対して CHX や anisomycin を添加した時のタンパク質合成阻害の割合と、細胞障害の関連について検討を行った。タンパク質合成能については、L-[<sup>35</sup>S]-methionine と L-[<sup>35</sup>S]-cysteine の取り込みにより測定した。また、同様に、triptolide についてもタンパク質合成阻害作用の有無を検証した。その結果、CHX や anisomycin 添加ではタンパク質合成阻害作用が確認され、少なくとも 90%以上タンパク質合成を阻害することにより、LDH の遊離によって示される細胞障害が誘導されることが示唆された (Fig. 8(A)(B))。一方、triptolide 添加では、細胞障害が誘導された濃度である 300 ng/mL において、タンパク質合成阻害は見られなかった (Fig. 8(C))。

### 1-3-3. アポトーシスの検出

LPS と CHX を併用してマクロファージを培養すると、細胞が縮小し、核や細胞質が断片化されている像が確認された (Fig. 1d)。このことから、LPS と CHX の併用によって誘導される細胞障害について、アポトーシスを介した細胞障害であると考えられる。そこで、LPS と triptolide によって誘導される細胞障害についてもアポトーシスを介するか検討を行った。LPS、CHX、triptolide は、それぞれ単独の添加では、TUNEL 陽性細胞数は上昇せず、LPS と CHX または triptolide の併用

によって TUNEL 陽性細胞数が上昇した (Fig. 9)。TUNEL 染色の陽性率は各群においてそれぞれ無作為に 10 視野ずつを選び、それぞれの視野中の全細胞数に対する TUNEL 陽性細胞数の割合 (%) を評価した。その結果、LPS と triptolide の併用においても、TUNEL 染色の陽性率が有意に上昇しており、LPS と CHX との併用と同様、アポトーシスが検出された (Fig. 9)。以上の結果から、LPS と triptolide の併用によって誘導される細胞障害は、アポトーシスを介して誘導されることが示唆された。

#### 1-4. 考察

本章では、LPS 処理マクロファージに短時間で誘導される細胞障害について、併用する CHX や anisomycin の役割について検討した。CHX や anisomycin はタンパク質合成阻害剤であり (Fig. 8(A))、更に、LPS との併用時に細胞障害が誘導された (Fig. 2) ことから、LPS によって誘導される何らかのタンパク質の合成を CHX や anisomycin が阻害することにより、細胞障害が誘導されている可能性が考えられる。また、CHX や anisomycin の添加が、LPS の添加から 60 分以後になると細胞障害が誘導されなくなった (Fig. 3) ことから、タンパク質合成阻害のターゲットは LPS の刺激後 60 分以内に誘導されるタンパク質だと考えられる。そこで、我々は LPS 刺激後、初期 (60 分以内) に起こるシグナル伝達に着目した。

本章の序文で述べた通り、LPS のシグナル伝達については、LPS 単独添加でのシグナル伝達と LPS と CHX を併用した際のシグナル伝達の違いについて検討がなされ、その特徴として、p38 MAPK と JNK の持続的なリン酸化が LPS と CHX の併用時に確認されている<sup>13,14)</sup>。

p38 MAPK および JNK は、ストレス応答性 MAP kinase のひとつで、白血球等に存在するセリン/スレオニンプロテインキナーゼのグループである<sup>18,19)</sup>。これら

は細胞の分化やストレス応答、宿主の免疫反応などの様々な細胞間相互作用において重要な役割を果たし、アポトーシスについてもその関与が報告されている<sup>18,20,21)</sup>。MAP kinase はリン酸化によって活性化されるので、ホスファターゼによる MAP kinase の脱リン酸化はキナーゼ活性を介したシグナル伝達の調節機構として非常に重要である。MAP kinase を脱リン酸化するホスファターゼは数多く存在する。その中でも、p38 MAPK の脱リン酸化に関与するものとして、PP2A と MKP-1 について検討を行った<sup>22-24)</sup>。最初に PP2A の阻害剤である endothall<sup>25)</sup>と MKP-1 の発現を阻害する triptolide<sup>26)</sup>を用いて検討を行った。その結果、LPS と endothall の併用では有意な LDH の遊離は見られなかったのに対し、LPS と triptolide の併用では 100ng/mL 以上の濃度の triptolide で有意な LDH の遊離量の上昇が見られた (Fig. 4)。これらの結果から、LPS 処理した JA-4 細胞の細胞障害の誘導には、PP2A よりも MKP-1 の阻害が関与している可能性が高いことが示唆された。MKPs (MAP Kinase Phosphatases)は二重特異性プロテインホスファターゼの一つで、リン酸化されて活性化された MAP kinase の脱リン酸化および不活性化に重要な役割を示すことが報告されている<sup>22)</sup>。特に、その一つである MKP-1 は、おもに核に存在し、マクロファージのストレス応答反応においては、Erk よりも p38 MAPK と JNK の脱リン酸化により選択的に関与すると言われている<sup>27,28)</sup>。我々の LPS の細胞障害性の研究結果からも、MAP kinase の中で、持続的にリン酸化しているのが p38 MAPK と JNK であることが確認されている。また、そのリン酸化 MAP kinase が核に局在していることとも一致する。更に、TUNEL 染色によって LPS と triptolide の併用によって誘導されるこの細胞障害がアポトーシスであることが確認された (Fig. 9)。これらの結果は、LPS と CHX との併用によって誘導されるマクロファージの細胞障害の誘導条件とも一致する。また、triptolide は CHX や anisomycin とは異なり、非特異的にタンパク質合成を阻害する作用は

ないことを確認した (Fig. 8(C))。以上の結果から、LPS で誘導されるマクロファージの細胞障害において、CHX によって阻害されると考えられるターゲットについては、PP2A よりも、triptolide が発現を阻害する MKP-1 である可能性が高いことが示唆された。



## 第2章 LPS 処理刺激マクロファージにおける MKP-1 の誘導と triptolide による転写阻害

### 2-1. 序論

LPS で誘導されるマクロファージの活性化を伴わない細胞障害機構については、LPS によってマクロファージに誘導される何らかのタンパク質の生合成を CHX や anisomycin などのタンパク質合成阻害剤が阻害することによって誘導されると考えられる。

前章では、CHX や anisomycin の代わりに triptolide を用いて同様の細胞障害が誘導されることを示した (Fig. 5-7)。Triptolide は MKP-1 の発現誘導を阻害することが知られており<sup>26)</sup>、MKP-1 は LPS の添加によりリン酸化された MAP kinase を脱リン酸化するダウンレギュレーションに重要な役割を示す<sup>22)</sup>。そのため、MKP-1 の阻害がもたらす p38 MAPK や JNK の持続的なリン酸化は、LPS によるマクロファージの活性化と活性化を介さない細胞障害の分岐点に関与していると考えられる。

本章では、MKP-1 との関係性に焦点を当てて、triptolide で誘導される LPS 処理マクロファージの細胞障害について更に検討した。

### 2-2. 実験方法

#### 2-2-1. 定量的 RT-PCR

##### 2-2-1-1. RNA の抽出

JA-4 細胞を 60 mm シャーレ (Corning#430166, Corning, NY 14831, U.S.A.) に  $2 \times 10^6$  cells/dish ずつ播種し、一晩前培養して接着させた後、新しい培地と交換し、100 ng/mL LPS および 300 ng/mL triptolide と 37°C で 0、15、30、60 分間培養した。

その後、培地を取り除き、PBS(-)で洗浄してからセパゾール® (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を加え、細胞を溶解した。溶解した細胞をセルスクレーパーでかき集め、1 mL シリンジ (Terumo, Tokyo, Japan) と 21 G 注射針 (Terumo, Tokyo, Japan) を用いて吸入と排出を繰り返して、細胞を破碎した。次にクロロホルム (和光製薬工業, Osaka, Japan) 200  $\mu$ L を加えて転倒混和し、4°C、15,000 rpm、15 分間遠心した後、上層 (水層) を新しい滅菌チューブに分取した。これに 500  $\mu$ L のイソプロパノール (和光製薬工業, Osaka, Japan) を加え、転倒混和し、4°C、15,000 rpm、15 分間の遠心を行った後、上清を除去した。得られた沈殿に 1 mL の 70%エタノールを加え、4°C、15,000 rpm、15 分間の遠心を行った後、上清を除去し、風乾した。沈殿に 10 $\mu$ L の注射用蒸留水 (大塚製薬工場, Chiba, Japan) を加えて、RNA を溶解させた。RNA の収量と精製度を確認するため、260 nm 及び 280 nm の吸光度を測定した。なお、RNA の精製度が不十分である場合は、RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いてクリーンアップを行った。

#### 2-2-2-2. 逆転写反応

Total RNA から cDNA への逆転写反応は、Prime Script™ RT reagent Kit (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて行った。Thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, California, U.S.A.) にて、逆転写反応を 37 °C、15 分間、逆転写酵素を熱失活させるために、85 °C、5 秒間、反応させた。

#### 2-2-2-3. PCR 反応

SYBR® Premix Ex Taq (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて、各サンプルの cDNA と各プライマーを混ぜ、インターカレーター法により Light Cycler (Roche, Basel, Switzerland)を用いて、初期変性 (5°C、10 秒) 1 サイクル、PCR 反応 (変性 95°C、

5 秒、アニーリング 60 °C、20 秒間) 40 サイクルを行った。

各プライマーの配列は下記の通りである。

#### Primers used for PCR and their nucleotide sequences

Primers	sequence
MKP-1/F	5'- GTGCCTGACAGTGCAGAATC -3'
MKP-1/R	5'- CACTGCCCAGGTACAGGAAG -3'
GAPDH/F	5'- GGAAAGCTGTGGCGTGATG -3'
GAPDH/	5'- CCAGTGAGCTTCCCGTTCAG -3'

( /F : forward ; /R : reverse )

### 2-2-2. ウェスタンブロッティング法によるタンパク質の発現及びリン酸化の検出

#### 2-2-2-1. 細胞の抽出

JA-4 細胞を 60 mm シャーレ (Corning #430166, Corning, NY 14831, U.S.A.) に  $2 \times 10^6$  cells/dish 播種し、一晩前培養して接着させた後、新しい培地と交換し、LPS、CHX および triptolide を加えて 37 °C で培養した。一定時間後、培地を取り除き、PBS(-)で洗浄した後、Lysis Buffer (20mM Tris-HCl, pH 7.4/150 mM NaCl/2 mM EDTA/10% glycerol/1% Triton-X 100/1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ /50  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ /50 mM NaF/protease inhibitor cocktail ( Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)) を 400  $\mu\text{L}$  ずつ加えて細胞を溶解した。溶解した細胞をセルスクレーパーでかき集め、1 mL シリンジ (Terumo, Tokyo, Japan) と 21 G 注射針(Terumo, Tokyo, Japan) を用いて、吸入と排

出を繰り返して細胞を破砕した。破砕した細胞液を 4 °C、15,000 rpm、15 分間遠心して上清を回収した。回収したサンプル中のタンパク質濃度を Pierce®BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A) を用いて定量した。その後、×5 Sample Buffer (10% SDS/25% β-mercaptoethanol/20% glycerol/0.2 M Tris-HCl, pH 6.8 /0.05% Bromophenol blue) を用いて、タンパク質量が均一になるように調製した。調製したサンプルは、95 °C、5 分間加熱し、泳動用サンプルとした。

### 2-2-2-2. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動には、5-20%SDS-ポリアクリルアミドゲル(e-PAGEL™, Atto, Tokyo, Japan)を用いて行い、定電流(Stacking gel では 15 mA/gel, Running gel では 40 mA/gel)で泳動を行った。

### 2-2-2-3. ウェスタンブロッティング

SDS-PAGE を行った後、ゲルに PVDF membrane (Immobilon P™, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) を重ね、ゲル内のタンパク質を転写し、3%のスキムミルク(雪印メグミルク, Tokyo, Japan) でブロッキングを行った。リン酸化タンパク質の検出では、ブロッキングワンプ(Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を用いてブロッキングを行った。次に、一次抗体を加えて、4 °C で一晩反応させた。一次抗体には、抗 p38MAPK 抗体(Cell Signaling: #9211, Danver, MA, U.S.A.)、抗 p-p38 MAPK 抗体(Cell Signaling: #9212, Danver, MA, U.S.A.)、抗 p-SPAK/JNK (p-JNK1/2) 抗体 (Cell Signaling: #9251, Danver, MA, U.S.A.)、抗 p-p44/42(p-Erk1/2) 抗体 (Cell Signaling: #9101, Danver, MA, U.S.A.)、抗 MKP-1 抗体(Santa Cruz Biotechnology: sc-1199)、抗 PP2A 抗体 (Upstate: 05-421) を用いた。更に PVDF membrane をリンスバッファー(0.1% TritonX-100/10 mM Tris -HCl, pH7.4/1 mM EDTA/150 mM NaCl) で 5 分間ず

つ 3 回洗浄した後、リンスバッファー中で 1,000 倍に希釈した Horseradish Peroxidase 標識抗ウサギ IgG (Cell Signaling: #7074) または Horseradish Peroxidase 標識抗マウス IgG (Cell Signaling: #7076) と室温で 1 時間反応させた。洗浄後、PVDF membrane 上の抗原抗体複合体を ECL Plus Western Blotting Detection System (#RPN2132, GE Healthcare, Chicago, Illinois, U.S.A.) を用いて発色反応させ、生じた化学発光をバイオイメージアナライザー (LAS-1000, Fuji Film, Tokyo, Japan) で検出した。

### 2-2-3. リン酸化 p38 MAPK(p-p38 MAPK) の局在の確認

8 穴無蛍光スライドガラス (松浪硝子工業, Osaka, Japan) に JA-4 細胞を接着させて前培養した後、試薬を添加して培養した。その後、4%パラホルムアルデヒドを含む固定液を用いて 30 分間、室温で固定した。その後、PBS(-)で洗浄後、メタノール:アセトン (1:1) 溶液で-20°C、10 分間浸透化処理を行った。更に、PBS(-)で洗浄し、3% BSA/PBS を用いて、室温で 30 分間ブロッキングを行った。0.1%BSA/PBS を用いて洗浄し、一次抗体である抗 p-p38 MAPK 抗体と室温で 1 時間反応させた。0.1%BSA/PBS で洗浄後、二次抗体である FITC 標識抗ウサギ抗体 (Jackson Immno Research: 11-096-003) と室温で 1 時間反応させた。更に、0.1% BSA/PBS を用いて洗浄し、0.67 ng/mL 4',6-diamidino-2-2phenylinole (DAPI) を加えて室温で 10 分間反応させ、核を染色した。その後、0.1%BSA/PBS で洗浄し、蒸留水で一回洗浄し、封入剤を用いてカバーガラス (松浪硝子工業, Osaka, Japan) とマニキュアで封じた。サンプルは共焦点レーザー顕微鏡 LSM700 (Carl Zeiss MicroImaging GHBH, Jena, Germany) で観察した。

## 2-3. 実験結果

### 2-3-1. Triptolide による MKP-1 の転写抑制の測定

Triptolide はジテルペノイドトリエポキシド<sup>26)</sup>であり、マクロファージでは、RAW264.7 細胞や MH-S 細胞において、LPS によって誘導される MKP-1 のレベルを転写段階で抑制することが報告されている<sup>29,30)</sup>。今回 triptolide が、JA-4 細胞においても同様の作用を示すか否かを、リアルタイム RT-PCR 法により MKP-1 mRNA を定量し、検討を行った。Triptolide は LPS 添加の 30 分前に添加し、LPS 添加後のタイムコースをとった。対照にハウスキーピング遺伝子として GAPDH を用い、結果は GAPDH mRNA 発現量との相対値で示した。その結果、MKP-1 mRNA は、LPS 単独処理において 30 分をピークに発現が定常時の 2 倍以上に上昇していた。この上昇は、LPS を添加する前に triptolide を前処理することによって強く阻害された(Fig. 10)。以上の結果は、JA-4 細胞においても、これまで報告されていたマクロファージと同様に LPS 刺激によって MKP-1 mRNA が上昇することと、triptolide の添加によって MKP-1 の誘導と発現が転写段階で強く抑制されることを示す。

### 2-3-2. MAP kinase のリン酸化と MKP-1 の発現

LPS と CHX の時と同様に、LPS と triptolide の処理によって MAP kinase のリン酸化が持続するか否かを、ウエスタンブロッティング法によって調べた。Triptolide は LPS 添加の 30 分前に添加した。その結果、LPS、LPS+CHX、LPS+triptolide 群のいずれにおいても、LPS の添加 15 分後に p38 MAPK、JNK1/2、Erk1/2 の各 MAP kinase がリン酸化された。しかし、LPS 添加 60 分後では、LPS 単独処理の場合には、p38 MAPK、JNK、及び Erk の脱リン酸化が進んだのに対し、CHX または triptolide を LPS と併用した場合には、p38 MAPK と JNK については脱リン酸化が

進まず、持続的にリン酸化されていることが確認された。一方、Erk については、CHX または triptolide の LPS との併用によるリン酸化状態は LPS 単独処理の場合と比べ、差が見られなかった (Fig. 11)。これらの結果から、LPS と triptolide との併用においても、LPS と CHX の併用と同様に、p38 MAPK、JNK の持続的なリン酸化が起きることが確認された。また、MKP-1 のタンパク質レベルでの発現をウエスタンブロッティング法により確認した結果、LPS 単独処理によって、60 分後に MKP-1 の発現上昇が確認された。これに対して、LPS と CHX または triptolide を併用したときには、LPS による 60 分後の発現誘導が見られず、発現が抑制されていることが確認された (Fig. 11)。また、PP2A については LPS 処理による発現の変化は見られず、本研究の目的とする因子としての関与は低いと思われた (Fig. 11)。

### 2-3-3. リン酸化 p38 MAPK(p-p38 MAPK)の細胞内局在性の確認

LPS とタンパク質合成阻害剤によって誘導される細胞障害において、MAP kinase の持続的なリン酸化が特徴的であることについて述べてきた。中でも、p38 MAP kinase については、リン酸化された状態で核に集積していることが、これまでの当研究室の研究により示されている。今回、新たに見出された LPS と triptolide との併用によってもこの現象が起こるかについて、蛍光免疫染色法を用いて検討した。その結果、これまでのウエスタンブロッティングの結果と同様に、LPS 単独では、p38 MAPK は LPS 添加後 15 分以内にリン酸化されて p-p38 MAPK となり、60 分ではほぼ脱リン酸化されて p-p38 MAPK は細胞内から消失していた。これに対し、LPS と CHX との併用、または LPS と triptolide との併用はいずれも、ウエスタンブロッティングの結果と同様に、p38 MAPK は LPS 添加後 60 分後にも持続してリン酸化されて p-p38 MAPK として存在することが確認された。更に、

その時の p-p38 MAPK の細胞内局在については、DAPI による染色像との重ね画像 (merge) を確認したところ、LPS と CHX との併用および、LPS と triptolide との併用のいずれにおいても p-p38 MAPK は核に局在していることが明らかになった (Fig. 12)。

#### 2-4. 考察

今回、MKP-1 の関与について更に検討するため、マクロファージ細胞内の MKP-1 の発現を、mRNA とタンパク質の検出によって解析した。その結果、これまで JA-4 細胞においても、triptolide の処理により LPS による MKP-1 の誘導が抑制されていることが示された (Fig. 10, 11)。一方、LPS と triptolide の併用は、LPS と CHX の併用と同様に、核内で p38 MAPK が持続的にリン酸化され p-p38 MAPK として存在することをウエスタンブロッティングと抗体免疫染色によって確認した (Fig. 11, 12)。

ウエスタンブロッティングの結果から、LPS と CHX 併用は MKP-1 の合成を阻害することを確認している (Fig. 11)。また、LPS 添加後、CHX の添加時間を遅らせると細胞障害の誘導が低下したが (Fig. 3)、これと同様の現象が、LPS と triptolide の併用の場合にも観察された (Fig. 7)。CHX の添加時間を変えたタイムコースの結果から、CHX が標的にするタンパク質は LPS 刺激から 75 分以内に合成されるものであると推測される。この点に関しても、MKP-1 は LPS 刺激から 60 分以内に合成されることがウエスタンブロッティング (Fig. 11) によって示されているので、細胞障害抑制因子の条件に合致する。このように、LPS 処理マクロファージの細胞障害には、タンパク質合成阻害時と triptolide 併用時に共通の特徴が多数あるため、これらの細胞障害が同様の機構もしくは過程を含む可能性が示唆された。MKP-1 はその鍵を握るタンパク質として重要な候補であると同時に、



MKP-1 の作用を阻害することが LPS 処理マクロファージの細胞障害の誘導に重要であることが示唆された。

### 第3章 LPS 耐性マクロファージ変異株および LPS 低反応性マクロファージにおける LPS + triptolide による細胞障害の誘導抑制

#### 3-1. 序論

前章では、LPS によって誘導されるマクロファージの活性化を介さない細胞死において、MKP-1 の阻害が鍵を握っている可能性が示唆された。本章では、LPS 耐性マクロファージ変異株を使用し、LPS 刺激によるシグナル伝達とそれに関与する triptolide 併用時の細胞障害について更に検討を加えた。

当研究室で樹立した LPS1916 細胞株は、J774.1/JA-4 細胞を親株として変異剤処理し、高濃度の LPS 耐性で選択したマクロファージ変異株であり<sup>31)</sup>、一方、LCR1-1 及び LCR3-1 変異株は、同じく JA-4 細胞を親株として樹立した、LPS+CHX で誘導される細胞死に耐性を示す変異株である<sup>32)</sup>。

LPS1916、LCR 変異株はいずれも、LPS と LBP ( LPS Binding Protein ) の複合体と結合する細胞表面の CD14 の発現に異常があり、LPS のマクロファージへの結合の経路の一つが阻害されている。これまでの研究から、LPS1916 および LCR 変異株は LPS と CHX で誘導される細胞障害に耐性を示すことが分かっており<sup>32)</sup>、今回、LPS と triptolide で誘導される細胞障害についても同様の耐性を持つか否かを検討した。

また、C3H/HeN および C3H/HeJ マウス腹腔マクロファージを用いて同様の検討を行った。C3H/HeJ マウスは Wild Type の C3H/HeN と異なり、TLR4 が欠損しており、腹腔由来の常在性マクロファージは LPS シグナルに対して低応答性を示す<sup>33)</sup>。C3H/HeJ マウス腹腔マクロファージも、LPS と CHX によって誘導される細胞障害に対して耐性があることが分かっており、LPS + triptolide で誘導される細胞障害についても同様の耐性を持つことが想定された。

## 3-2. 実験方法

### 3-2-1. 細胞培養

JA-4、LPS1916、LCR1-1 および LCR3-1 細胞は、非働化した 10%ウシ胎児血清、50 U/mL penicillin 及び 50 µg/mL streptomycin を含む Ham's F-12 培地を用いて、CO<sub>2</sub> インキュベーター内 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% humidified air) で培養した。100 mm ディッシュ (FALCON) を用い、2~3 日毎に継代した。これを細胞ストックから起こして約 5~20 継代分までを実験に用いた。

### 3-2-2. マウス腹腔マクロファージの回収

日本エスエルシー株式会社より入手した C3H/HeN と C3H/HeJ (雌、6 週齢) の SPF マウスを頸椎脱臼によって安楽死させ、腹腔外皮を剥離し、腹腔膜を露出するように開腹した。氷冷した生理食塩水 (大塚製薬工場, Chiba, Japan) を腹腔内に注入し、軽く腹部をマッサージしてマクロファージを浮遊させた。その後、マクロファージ浮遊液を無菌的に回収し、4°C、2,000 rpm で 3 分間遠心し、氷冷した生理食塩水で洗った。その後、細胞沈殿に、滅菌蒸留水 (大塚製薬工場, Chiba, Japan) で 1/3 に希釈した生理食塩水 5 mL を加えて懸濁し、1 分間氷上に静置後、5mL の生理食塩水を加えて混入赤血球を低浸透圧処理 (オスモティックショック) により破裂させた。細胞懸濁液を 2,000 rpm で 3 分間遠心し、細胞沈殿を非働化した 10%ウシ胎児血清 (Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A.)、50 U/mL penicillin 及び 50 µg/mL streptomycin を含む Ham's F-12 培地 (GIBCO) に再懸濁した。ギムザ染色 (Merck) によりマクロファージを同定してカウントし、98%以上の細胞がマクロファージであることを確認した。細胞を Costar の 48 穴プレートに播種し、1 時間 37°C で培養し、非接着細胞 (リンパ球など) を除去し、接着細胞を得た。

### 3-2-3. 細胞障害の誘導とその評価方法

基本的な操作方法は、上述の 2-2-2.の方法に準拠した。

### 3-3. 実験結果

JA-4 細胞を 100 ng/mL LPS で 4 時間培養したところ、細胞が伸展し、細胞内に小胞が出現してマクロファージの活性化像が観察された。また、10 µg/mL CHX、あるいは 300 ng/mL triptolide の添加により、細胞は丸くなり、プレートへの接着性が低下している像が得られた。しかし、いずれも単独での処理では細胞障害が見られなかった。しかし、LPS と CHX または LPS と triptolide を併用すると顕著な細胞障害が観察されるようになった (Fig. 13(A))。一方、LPS1916、LCR1-1 および LCR3-1 細胞について、同様に、LPS、CHX または triptolide で 4 時間培養した結果、LPS 単独、CHX または triptolide 単独処理においては、JA-4 細胞の結果と同様に、細胞障害が見られなかったのに対し、LPS+CHX または LPS+triptolide の処理では、JA-4 細胞の場合とは異なり、顕著な細胞障害が観察されなかった (Fig. 13(B)-(D))。また、この細胞障害を定量するため、LPS 添加後 4 時間培養した細胞の培養上清中に遊離された LDH 量を測定した結果、JA-4 細胞においては、100 ng/mL LPS と共に 10 µg/mL CHX または 300 ng/mL triptolide を併用した時には、それぞれ単独処理の時と比較して有意な LDH の遊離が観察された (Fig. 14)。一方、LPS1916、LCR1-1、LCR3-1 細胞株については、それぞれ、LPS と CHX または triptolide の併用による有意な LDH の遊離は確認されなかった (Fig. 14)。LPS1916、LCR 変異株はいずれも、LPS とマクロファージ細胞の結合に参与する CD14 の発現に異常があること、および、CHX あるいは triptolide 共存下で JA-4 細胞に細胞死を誘導することができる LPS の濃度は 10 ng/mL 以上が必要であるこ

とから、LPS 存在下でのマクロファージに急速に誘導される細胞障害機構には、高濃度の LPS と CD14 が関与するシグナル伝達経路が関係することが示唆される。

また、C3H/HeN 由来腹腔マクロファージに 100 ng/mL LPS 単独処理をして 4 時間培養したところ、細胞が伸展し、細胞内に小胞が出現して活性化している像が観察された (Fig. 15e)。これに対し C3H/HeJ 由来腹腔マクロファージでは、細胞の伸展や小胞の出現は C3H/HeN よりも少なかった (Fig. 15m)。

さらに、C3H/HeN、C3H/HeJ とともに、1  $\mu$ g/mL CHX または 100 ng/mL triptolide の単独処理では、細胞が丸くなり接着性が低下している像が見られたが、いずれも単独での処理では細胞障害は認められなかった (Fig. 15b,d)。Triptolide については、300 ng/mL まで濃度を上昇させると単独処理でも細胞障害が確認された (Fig. 15c,k)。その障害の程度としては、C3H/HeN のほうが顕著であった (Fig. 15c)。

10  $\mu$ g/mL CHX または 100 ng/mL triptolide を添加して 1 時間前培養し、その後 100 ng/mL LPS を添加すると、C3H/HeN 由来腹腔マクロファージでは顕著な細胞障害が観察されるようになった (Fig. 15f,h)。一方、C3H/HeJ 由来腹腔マクロファージでは、C3H/HeN 由来と比較して障害を受けた細胞数は少なかった (Fig. 15n,p)。

次に、C3H/HeN および C3H/HeJ 由来腹腔マクロファージの細胞障害を定量するため、CHX または triptolide を添加して 1 時間、前培養し、次に LPS を添加して 4 時間培養した細胞の培養上清中に遊離された LDH 量を測定した。Triptolide は 0、10、30、100、300 ng/mL で 60 分間前培養し、その後、100 ng/mL LPS を添加して 4 時間培養した。その結果、C3H/HeN 由来腹腔マクロファージにおいては、triptolide は単独投与であっても濃度依存的に LDH 遊離量が上昇し、100 ng/mL では 12~18% の LDH 遊離が見られた (Fig. 16, 17)。一方、triptolide を LPS と併用

することによって LDH 遊離が 30~35%に上昇した ( Fig. 16, 17 )。これに対し、C3H/HeJ 由来腹腔マクロファージでは、100 ng/mL 以上の triptolide と 100 ng/mL LPS の併用による LDH 遊離の上昇は見られなかった ( Fig. 16, 17 )。

#### 3-4. 考察

本章では、LPS のシグナル伝達に対して CD14 の細胞表面における発現に異常をもつ3つのマクロファージ変異株を使用し、LPS によるシグナル伝達とそれに対する triptolide 併用時の細胞障害について検討した。また、TLR4 の発現異常がある C3H/HeJ 由来腹腔マクロファージを用いて、同様に LPS シグナル伝達と LPS +triptolide による細胞障害の関連を検討した。その結果、細胞株とそれから分離樹立した耐性変異株だけでなく、LPS 低応答性を持つマウス由来の腹腔マクロファージにおいても、LPS +triptolide の併用による細胞障害の誘導が起こらないことが確認された。また、CD14 の発現異常をもつマクロファージやおよび TLR4 欠損マクロファージでは、親株や野生型マウスのマクロファージと異なり、LPS と CHX、および LPS と triptolide で誘導される細胞障害が有意に抑制されたことから、LPS と CHX の細胞障害と同様、LPS と triptolide の併用によって誘導される細胞障害についても、LPS シグナルの正常な伝達が必要であることが示唆された。また、その経路には、CD14 および TLR4 が含まれることが示唆された。

## 総括

本研究において、LPS によって短時間で誘導されるマクロファージの細胞障害について、おもに J774.1/JA-4 細胞株を用いて検討を行った。これまでに観察されてきた、LPS と CHX との併用による細胞死、更には CHX とは構造の異なるタンパク質合成阻害剤の anisomycin と LPS の併用においても、マクロファージは細胞障害を受けることが明らかになった。これらの結果から、LPS 処理によって誘導される何らかの「細胞障害抑制因子」(タンパク質)の生合成を阻害することが、LPS 処理マクロファージの細胞障害の誘導の鍵を握る重要な点であると仮説を立てた。この「細胞障害抑制因子」の候補として、今回、MKP-1 に着目して検討を行った。MKP-1 は MAP kinase のフィードバック制御を担う重要な役割を果たすことが知られており、リン酸化を受けて活性化された MAP kinase の脱リン酸化と不活性化を通じて過剰なサイトカイン産生やショックを抑制している<sup>22)</sup>。MKP-1 と細胞障害の関係についても報告があり、LPS に関連するものとしては、エンドトキシンショックとの関係が注目されており、MKP-1 ノックアウトマウスでは LPS 曝露実験でのマウスの生存率が有意に低下している<sup>34)</sup>。これは、TNF- $\alpha$  産生などの炎症応答を負のフィードバックにより調節する MKP-1 の機能が働かなくなることで過剰なサイトカイン産生が誘発され、ショックが憎悪したものと考えられている。しかしながら、今回、LPS 刺激と共に triptolide 添加による MKP-1 の阻害がマクロファージにアポトーシスを誘導する可能性が示唆されたことから、上述の報告にあるマウスの敗血症ショックの実験でも、LPS 曝露あるいはグラム陰性菌感染時の細胞障害機構として、サイトカイン産生亢進による二次的な作用とは別に、免疫細胞に対する直接的な細胞障害の誘導が関与してマウスの生存率の低下が起きた可能性も考えられる。

また、今回、MAP kinase のリン酸化の持続が細胞障害の特徴として確認された。MAP kinase の中でも p38 MAPK に注目して研究を進めてきたが、LPS 処理マクロファージにおいて、CHX との併用と同様に、triptolide との併用によっても、p38 MAPK 以外に、JNK も持続的にリン酸化されている。JNK もアポトーシス促進因子として数多く報告されている<sup>35-37</sup>。本研究におけるアポトーシスの誘導において、p38 MAPK と JNK のどちらの寄与が大きいのか、あるいはこれら両方のリン酸化が必要なのかは明確ではない。また、別のアポトーシス開始シグナルが介在しており、p38 MAPK や JNK の持続的リン酸化はその結果起こる二次的な変化である可能性も否定できない。今後は、JNK の関与について JNK 阻害剤を用いた検討を行うとともに、LCR 変異株などの細胞障害耐性変異株に p-p38 MAPK や p-JNK を導入することで、細胞障害が誘導されるか検討することで、直接的に p-p38 MAPK または p-JNK の関与を検討できると考える。

一方、第 1 章の序論でも述べたが、LPS と p38 MAPK の阻害剤である SB202190 との併用においても、LPS と CHX を添加した時に誘導される LDH の遊離と同様の細胞障害が起きることを確認している。この時、LPS と CHX を併用した場合は異なり、SB202190 の添加により、LPS 刺激による p38 MAPK を介した下流の hsp27 のリン酸化は阻害される<sup>14</sup>。一方で、LPS と CHX や triptolide を併用した時と同様に、p38 MAPK のリン酸化自体は持続していた。これらの結果から、これまでの報告にあるようなリン酸化カスケードを構成するキナーゼとしての p38 MAPK の役割とは異なる調節機構が存在する可能性が考えられる。すなわち、下流のキナーゼカスケードの活性化ではなく、p38 MAPK の持続的なリン酸化自体がアポトーシス誘導へ分岐する可能性である。

MKP-1 については、MKP-1 欠損マウス由来の線維芽細胞では細胞増殖が減少し、細胞死が誘導されるという報告がある<sup>38</sup>。また、大腸がんなどの一部のがん



細胞については MKP-1 が過剰発現していることが確認されており、このことがアポトーシスの減少に繋がるものとして研究が進められている<sup>39,40</sup>。LPS 処理マクロファージの中で MKP-1 がサイトカインの過剰産生抑制だけでなく、細胞の生存シグナルの調節においてどのような役割を果たしているか、今後も継続して研究を行い、考察していく必要がある。

また、Triptolide は MKP-1 への選択的阻害剤ではない。そのため、選択的な発現抑制を目的として、siRNA でマクロファージの MKP-1 の発現を抑制した後に、LPS 処理を行ったが、siRNA 処理では MKP-1 の誘導を LPS 未処理レベルまで抑えることができず、細胞障害も誘導されなかった (Data not shown)。MKP-1 の発現抑制の割合については、CHX や anisomycin を添加して LPS とともに培養する実験系では、タンパク質合成が少なくとも 90%抑制されて初めて細胞障害が出現したこと (Fig. 8)、および triptolide の添加はマクロファージ系細胞株の MKP-1 の転写をほぼ完全に阻害した (Fig. 10) ことから、少なくとも LPS 未処理レベルまで MKP-1 の発現を抑制する必要があると考えられる。これについては、CRISPR-Cas9 のシステムを用いて MKP-1 の遺伝子ノックアウトを行うことで、MKP-1 としての役割を更に検討する必要がある。

以上の結果を総合すると、LPS 刺激によって誘導される MKP-1 はマクロファージの細胞障害を抑制するとともに、MAPkinase カスケードの中でストレス応答ならびに炎症応答を主に担う p38 MAPK、JNK の過剰なリン酸化を抑制するという点において、マクロファージの LPS 応答反応を微調整して、マクロファージの働きを制御しているものと考えられる。

また、triptolide については、臨床応用がいろいろ試みられてきた。Li らは triptolide の抗腫瘍活性に着目し、胃癌治療におけるシスプラチンとの併用療法への展開を報告している<sup>41,42</sup>。これまでの LPS のシグナル伝達に関連した治療薬のターゲッ

トは、主にシグナル伝達を介して発生するケミカルメディエーターやサイトカインの作用を抑制することに主眼があり、本研究のように、炎症反応を担うマクロファージの細胞死を誘導して炎症を沈静化させるものは少ない。一方で、生薬成分由来の抗炎症作用を示す **Shikonin** についても LPS 処理マクロファージへの細胞障害が確認され<sup>43)</sup>、その細胞障害作用の誘導についても **MKP-1** の発現抑制が関連しているか検討する必要がある。本研究の更なる推進と発展により、LPS によって誘導される比較的初期の調節が可能になり、この点に着目した新しい型の創薬ターゲットの開発が期待できると考えられる。

## 謝辞

本研究は、学位申請者が大阪薬科大学薬学部（2008 年度）ならびに大学院生命薬学専攻修士課程（2009~2010 年度）において行なった研究を中心にまとめたものです。更にそれらの成果を発展させて学術論文に掲載された主論文 4 報で報告した内容を基盤としています。研究の推進にあたり、終始懇切丁寧な指導をしてくださった大阪薬科大学生体防御学研究室の天野富美夫教授、小池敦資助教ならびに病態生化学研究室の藤森功教授に心より感謝申し上げます。また、本学学生・大学生の方々から実験上の助言や示唆をいただいたことに対して感謝いたします。

また、シコニン及びその誘導体を精製して研究材料として提供して下さっただけでなく、triptolide の起源植物であるクロヅル(*Tripterygium regelii*)から有効成分の抽出と精製を行って下さった大阪薬科大学生薬科学研究室の芝野真喜雄准教授に深く感謝申し上げます。

本学位の申請に際しては、現在所属するシスメックス株式会社の方々から、勤務における研究とともに本研究を継続して行い、学術論文及び学位論文にまとめることへの多くの理解ならびに支援をいただきました。

最後に、本研究に携わったすべての方々に心より御礼申し上げます。

## 【引用文献】

- 1) Gutknecht MF, Bouton AH. Functional significance of mononuclear phagocyte populations generated through adult hematopoiesis. *J. Leukocyte Biol.* 96 (6) 969-80, 2014.
- 2) Alexander P, Evans R. Endotoxin and double-stranded RNA render macrophage cytotoxic. *Nature New Biol.* 232 (29) 76-78, 1971.
- 3) Galanos C, Lüderitz O, Rietschel ET, Westphal O, Brade H, Brade L, Freudenberg M, Schade U, Imoto M, and Yoshimura H, Kusumoto S, Shiba T. Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur.J.Biochem.* 148(1) 1-5, 1985.
- 4) 池澤宏郎編集 「21 世紀の考える薬学微生物学 第2版」 廣川書店 (2007年)
- 5) Rossol M, Heine H, Meusch U, Quandt D, Klein C, Sweet MJ, Hauschildt S. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit Rev Immunol.* 31(5) 379-446, 2011.
- 6) Arango Duque G, Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol.* 491(5)1-9, 2014.
- 7) Ahmed AE, Aronson J, Jacob S. Induction of oxidative stress and TNF-alpha secretion by dichloroacetonitrile, a water disinfectant by-product, as possible mediators of apoptosis or necrosis in a murine macrophage cell line (RAW). *Toxicol In Vitro.* 14(3) 199-210, 2000.
- 8) Xaus J, Comalada M, Valledor AF, Lloberas J, López-Soriano F, Argilés JM, Bogdan C, Celada A. LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF-alpha. *Blood.* 95(12) 3823-3831, 2000.
- 9) Soler C, Valdés R, Garcia-Manteiga J, Xaus J, Comalada M, Casado FJ, Modolell M, Nicholson B, MacLeod C, Felipe A, Celada A, Pastor-Anglada M. Lipopolysaccharide-induced apoptosis of macrophages determines the up-regulation of concentrative nucleoside transporters Cnt1 and Cnt2 through tumor necrosis factor-alpha-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem.* 276(32) 30043-30049, 2001.

- 10) Amano F, Karahashi H. A cytotoxic effect of lipopolysaccharide (LPS) on a macrophage-like cell line, J774.1, in the presence of cycloheximide. *J. Endotoxin Res.* 3 (5) 415–423, 1996.
- 11) Karahashi H, Amano F. Apoptotic changes preceding necrosis in lipopolysaccharide-treated macrophages in the presence of cycloheximide. *Exp. Cell Res.* 241 (2) 373–383, 1998.
- 12) Karahashi H, Amano F. Changes of caspase activities involved in apoptosis of a macrophage-like cell line J774.1/JA-4 treated with lipopolysaccharide (LPS) and cycloheximide. *Biol.Pharm.Bull.* 23 (2)140-144, 2000.
- 13) Karahashi H, Nagata K, Ishii K, Amano F. A selective inhibitor of p38 MAP kinase, SB202190, induced apoptotic cell death of a lipopolysaccharide-treated macrophage-like cell line, J774.1. *Biochim. Biophys. Acta.* 1502 (2) 207-223, 2000.
- 14) Karahashi H, Amano F. Endotoxin-tolerance to the cytotoxicity toward a macrophage-like cell line, J774.1, induced by lipopolysaccharide and cycloheximide: role of p38 MAPK in induction of the cytotoxicity. *Biol.Pharm.Bull.* 26 (9) 1249-1259, 2003.
- 15) Karahashi H, Amano F. LPS-induced signals in activation of a caspase-3-like protease, a key enzyme regulating cell damage in a macrophage-like cell line, J774.1, in the presence of cycloheximide. *J. Leukocyte Biol.* 66 (4) 689-696, 1999.
- 16) Law AH, Tam AH, Lee DC, Lau AS. A role for protein phosphatase 2A in regulating p38 mitogen activated protein kinase activation and tumor necrosis factor-alpha expression during influenza virus infection. *Int J Mol Sci.* 14(4)7327-7340, 2013.
- 17) Owens DM, Keyse SM. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene.* 26(22) 3203-13, 2007.
- 18) 坂内 千尋, 服部 一輝, 一條 秀憲 「生体の科学」 66 卷 5 号 (2015 年)
- 19) Kim HG, Yoon DH, Lee WH, Han SK, Shrestha B, Kim CH, Lim MH, Chang W, Lim S, Choi S, Song WO, Sung JM, Hwang KC, Kim TW. *Phellinus linteus* inhibits

- inflammatory mediators by suppressing redox-based NF-kappaB and MAPKs activation in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophage. *Journal of ethnopharmacology*. 114(3) 307–315, 2007.
- 20) Shao Q, Han F, Peng S, He B. Nur77 inhibits oxLDL induced apoptosis of macrophages via the p38 MAPK signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 471(4) 633-638, 2016.
- 21) Bonay M, Roux AL, Floquet J, Retory Y, Herrmann JL, Lofaso F, Deramautd TB. Caspase-independent apoptosis in infected macrophages triggered by sulforaphane via Nrf2/p38 signaling pathways. *Cell Death Discov*. 15022(1), 2015
- 22) Caunt CJ, Keyse SM. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): shaping the outcome of MAP kinase signalling. *FEBS J*. 280(2) 489-504, 2013.
- 23) Zhang Y, Liang J, Sun L, Guo Z, Xu L. Inhibition of PP2A and the consequent activation of JNK/c-Jun are involved in tributyltin-induced apoptosis in human amnionic cells. *Environ Toxicol*. 28(7) 390-400, 2013.
- 24) Li JY, Huang JY, Li M, Zhang H, Xing B, Chen G, Wei D, Gu PY, Hu WX. Anisomycin induces glioma cell death via down-regulation of PP2A catalytic subunit in vitro. *Acta Pharmacol Sin*. 33(7) 935-940, 2012.
- 25) Li YM, Mackintosh C, Casida JE. Protein phosphatase 2A and its [3H]cantharidin/[3H]endothall thioanhydride binding site. Inhibitor specificity of cantharidin and ATP analogues. *Biochem Pharmacol*. 46(8) 1435-1443, 1993.
- 26) Liu Q. Triptolide and its expanding multiple pharmacological functions. *Int Immunopharmacol*. 11(3) 377-383, 2011.
- 27) Hu JH, Chen T, Zhuang ZH, Kong L, Yu MC, Liu Y, Zang JW, Ge BX. Feedback control of MKP-1 expression by p38. *Cell Signal*. 19(2) 393-400, 2007.
- 28) Taylor DM(1), Moser R, Régulier E, Breuillaud L, Dixon M, Beesen AA, Elliston L, Silva Santos Mde F, Kim J, Jones L, Goldstein DR, Ferrante RJ, Luthi-Carter R. MAP kinase phosphatase 1 (MKP-1/DUSP1) is neuroprotective in Huntington's disease via

- additive effects of JNK and p38 inhibition. *J Neurosci.* 33(6) 2313-2325, 2013.
- 29) Chen P, Li J, Barnes J, Kokkonen GC, Lee JC, Liu Y. Restraint of proinflammatory cytokine biosynthesis by mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Immunol.* 169(11) 6408-6416, 2002.
- 30) Zhao Q, Shepherd EG, Manson ME, Nelin LD, Sorokin A, Liu Y. The role of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in the response of alveolar macrophages to lipopolysaccharide: attenuation of proinflammatory cytokine biosynthesis via feedback control of p38. *J Biol Chem.* 280(9) 8101-8108, 2005.
- 31) Amano F, Akamatsu, Y. A lipopolysaccharide(LPS)-resistant mutant isolated from a macrophagelike cell line, J774.1, exhibits an altered activated-macrophage phenotype in response to LPS. *Infect Immun.* 59(6) 2166-2174, 1991.
- 32) Amano F, Tsukabe S, Teshima R, Waku K, Kohama K, Characterization of macrophage mutants established by their resistance to LPS and cycloheximide-induced apoptotic cell death. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3 (6A) 770-781, 2012.
- 33) Karahashi H, Amano F. Lipopolysaccharide (LPS)-induced cell death of C3H mouse peritoneal macrophages in the presence of cycloheximide: different susceptibilities of C3H/HeN and C3H/HeJ mice macrophages. *J. Endotoxin Res.*, 6 (1) 33–39, 2000.
- 34) Qun Zhao, Xianxi Wang, Leif D.Nelin, Yongxue Yao, Ranyia Matta, Mary E. Manson, Reshma S. Baliga, Xiaomei Meng, Charles V. Smith, John A. Bhauer, Cheong - Hee Chang, and Yusen Liu. MAP kinase phosphatase 1 controls innate immune responses and suppresses endotoxic shock. *J. Exp. Med.* 203, 131-140, 2006.
- 35) Venugopal SK, Chen J, Zhang Y, Clemens D, Follenzi A, Zern MA. Role of MAPK phosphatase-1 in sustained activation of JNK during ethanol-induced apoptosis in hepatocyte-like VL-17A cells. *J. Biol. Chem.* 282(44) 31900-31908, 2007.
- 36) Schwabe RF, Bradham CA, Uehara T, Hatano E, Bennett BL, Schoonhoven R, Brenner DA. c-Jun-N-terminal kinase drives cyclin D1 expression and proliferation during liver regeneration. *Hepatology.* 37(4) 824-832, 2003.

- 37) Yang F, Nam S, Zhao R, Tian Y, Liu L, Horne DA, Jove R. A novel synthetic derivative of the natural product berbamine inhibits cell viability and induces apoptosis of human osteosarcoma cells, associated with activation of JNK/AP-1 signaling. *Cancer Biol Ther.* 14(11) 1024-1031, 2013.
- 38) Wu JJ, Bennett AM. Essential role for mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 in stress-responsive MAP kinase and cell survival signaling. *J Biol Chem.* 280(16) 16461-16466, 2005.
- 39) Kundu S1, Fan K, Cao M, Lindner DJ, Tuthill R, Liu L, Gerson S, Borden E, Yi T. Tyrosine phosphatase inhibitor-3 sensitizes melanoma and colon cancer to biotherapeutics and chemotherapeutics. *Mol Cancer Ther.* 9(8) 2287-2296, 2010.
- 40) Wu GS. Role of mitogen-activated protein kinase phosphatases (MKPs) in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 26, 3-4, 2007.
- 41) Zhu W, Li J, Wu S, Li S, Le L, Su X, Qiu P, Hu H, Yan G. Triptolide cooperates with Cisplatin to induce apoptosis in gemcitabine-resistant pancreatic cancer. *Pancreas.* 41(7) 1029-1038, 2012.
- 42) Ho JN, Byun SS, Lee S, Oh JJ, Hong SK, Lee SE, Yeon JS. Synergistic antitumor effect of triptolide and cisplatin in cisplatin resistant human bladder cancer cells. *J Urol.* 193(3) 1016-1022, 2015.
- 43) Koike A, Shibano M, Mori H, Kohama K, Fujimori K, Amano F. Simultaneous addition of Shikonin and its derivatives with lipopolysaccharide induces rapid macrophage death. *Biol. Pharm. Bull.*, 39 (6) 969–976, 2016.



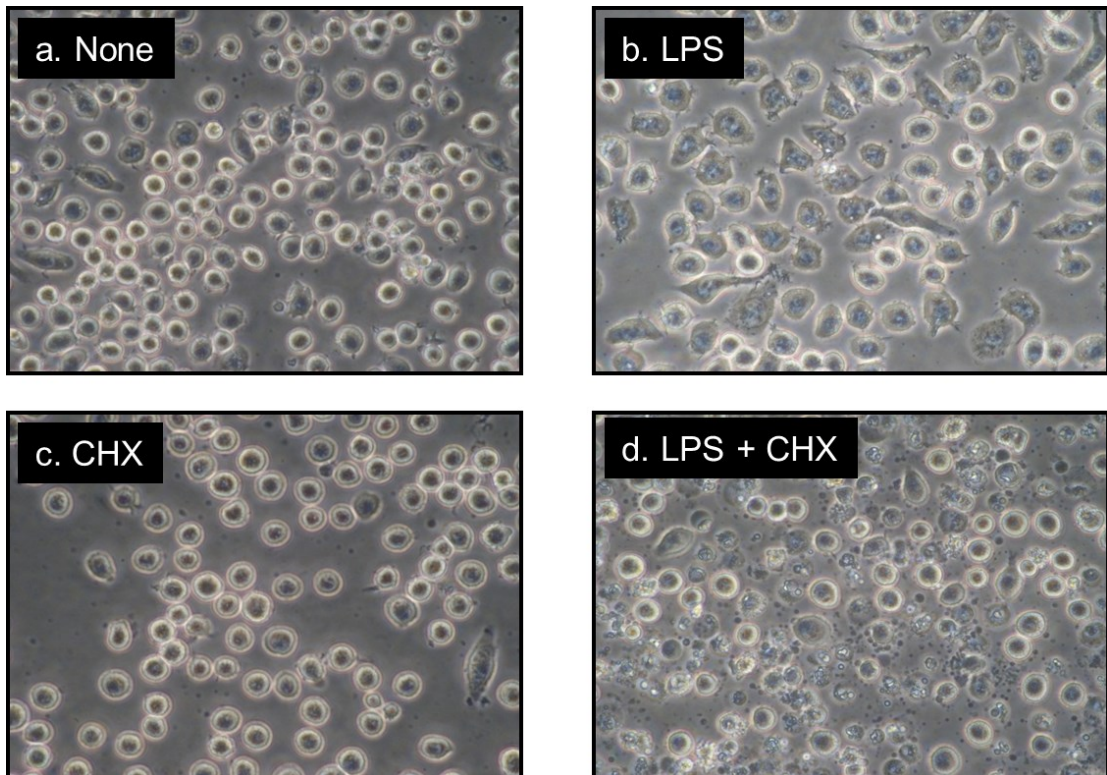


Fig. 1. Morphological changes of J774.1/JA-4 cells treated with LPS and/or CHX

JA-4 cells were treated with a) nothing, b) 100 ng/mL LPS, c) 10  $\mu$ g/mL CHX, or d) LPS+CHX at 37°C for 4 h, and observed under a phase - contrast microscope as described in the text. Note that only the cells treated with LPS+CHX were severely damaged.

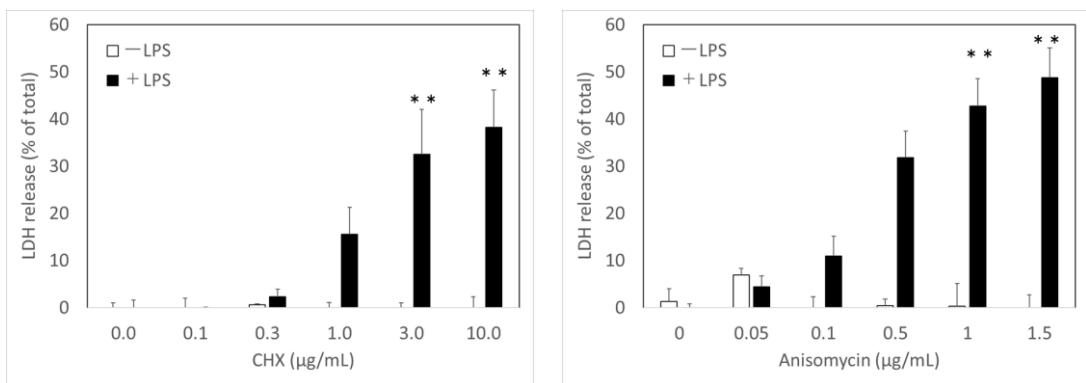


Fig. 2. Influence of protein synthesis inhibitors on the induction of cell death treated with LPS.

CHX (left) or anisomycin (right) was added to JA-4 macrophage cell culture in the absence (open bars) or presence (closed bars) of 100 ng/mL LPS, followed by incubation at 37°C for 4 h. The cell death was examined by the release of LDH, as described in the text. The results are shown as means  $\pm$  S.E. for three (CHX) or two (anisomycin) independent experiments. \*\*  $p < 0.01$ , versus without LPS (analysis of Tukey-Kramer)

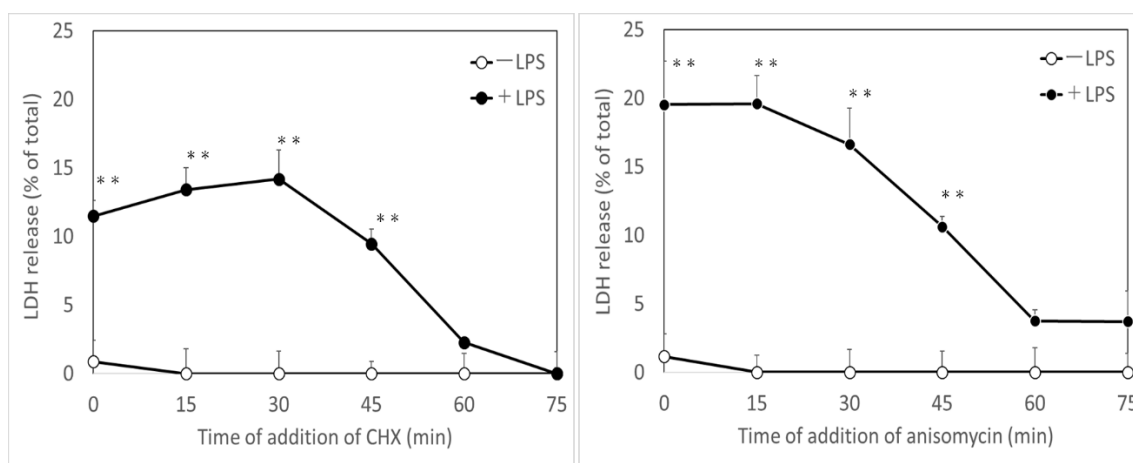


Fig. 3. Influence of the delay of the time of protein synthesis inhibitors addition to LPS treated JA-4 cells.

JA-4 macrophages were treated with either 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CHX (left) or 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  anisomycin (right) by adding just before LPS addition at time 0, or at 0, 15, 30, 45, 60 or 75 min after LPS addition (closed circles). Incubation was continued at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 4 h after the addition of CHX or anisomycin. The results are expressed by LDH release with means  $\pm$  S.E. for 3 independent experiments. \*\*  $p < 0.01$ , versus without LPS (open circles) (analysis of Tukey-Kramer)

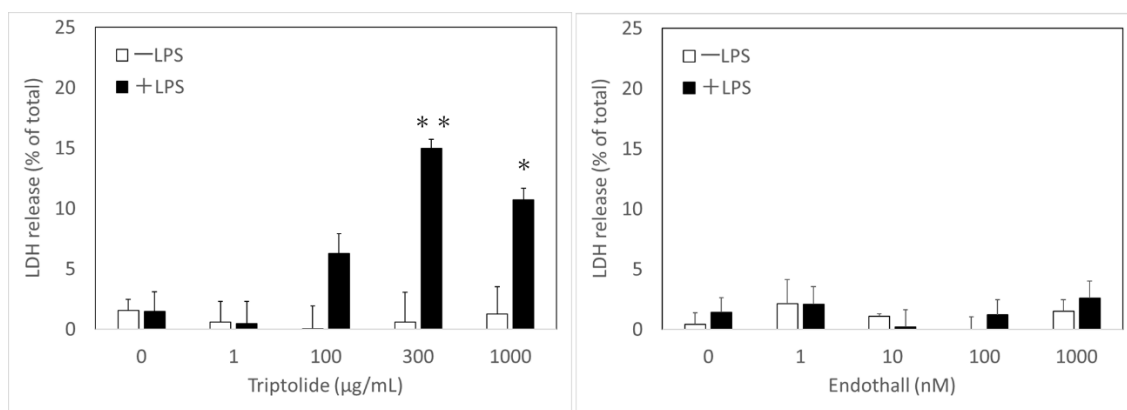


Fig.4. Induction of cell death in the presence or absence of LPS and/or triptolide and endothall

To verify the involvement of protein phosphatases in the induction of cytotoxicity of LPS-treated macrophages, we added either triptolide, a chemical agent to suppress expression of MKP-1 (left), or endothall, a PP2A inhibitor (right), at 1-1000 ng/mL or 1-1000 nM, respectively, to the cells 30 min before addition of 100 ng/mL LPS. The cells were then incubated at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 4 h. Cell damage of JA-4 cells was quantitatively estimated in terms of LDH release, as described in the text. The significance of difference between the groups with and without LPS addition at each concentration was estimated by using Tukey-Kramer test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

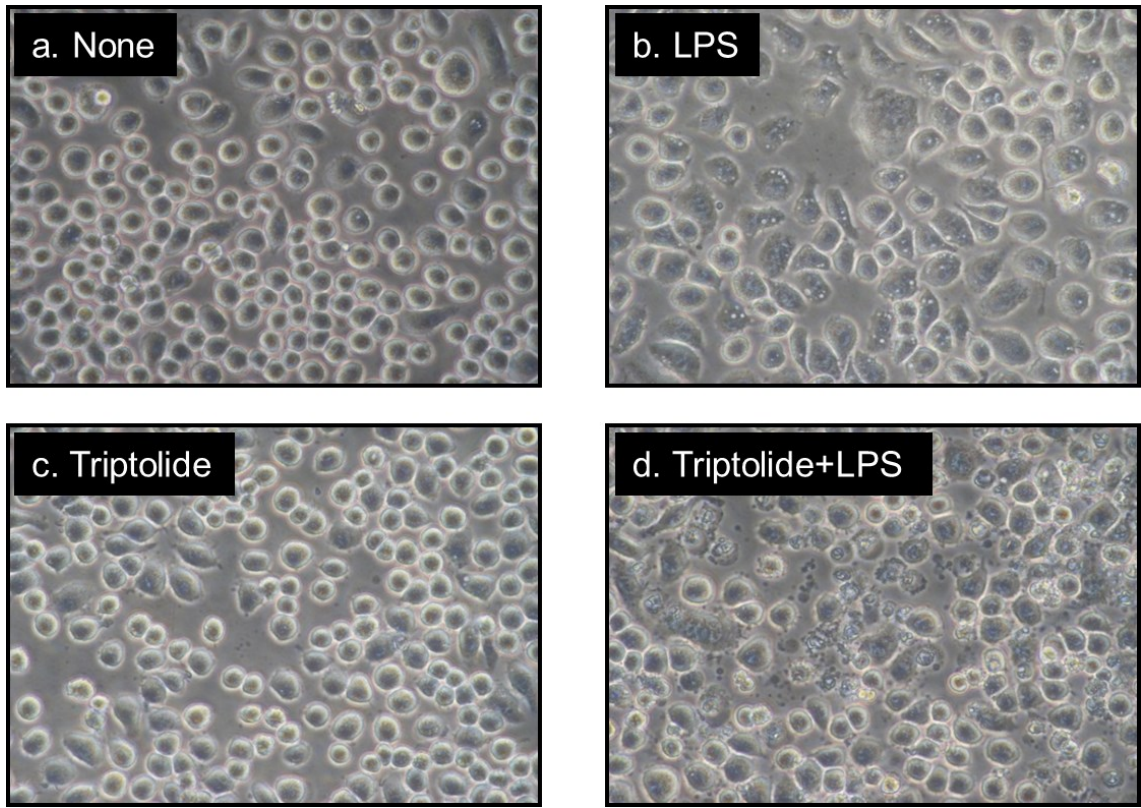


Fig.5. Phase - contrast micrograms of JA-4 cells treated with LPS and/or triptolide

The cells were treated with nothing or 300 ng/mL triptolide at 37 °C for 30 min, then incubated with or without 100 ng/mL LPS at 37 °C for 4 h. Photograms were taken in random fields under a phase - contrast microscope, and each representative one is shown. Magnification, ×400.

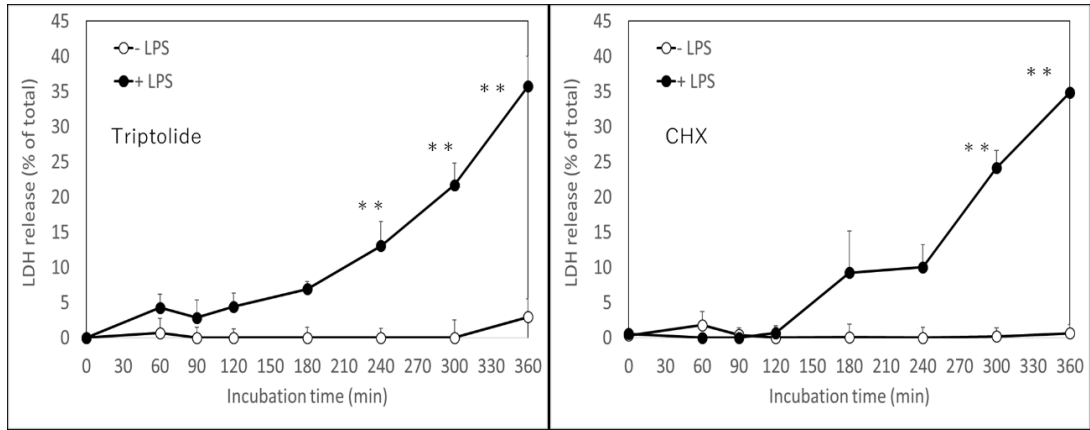


Fig.6. Time-course of induction of cell death by triptolide and CHX

The time-course of induction of cell death by 300 ng/mL triptolide was examined in the presence or absence of 100 ng/mL LPS (left). Triptolide was added to the cells 30 min prior to addition of LPS at 0 time. For the control, the time-course was also examined when 10  $\mu$ g/mL CHX was used in the presence (closed circles) or absence (open circles) of LPS similarly as for the triptolide experiment except that CHX was added simultaneously with 100 ng/mL LPS at 0 time (right). The results are shown as the means $\pm$ SE for 3 independent experiments performed separately on different days. The significance of difference between the groups with and without LPS addition at each time was estimated by using Tukey-Kramer test, and is shown as \*\*  $P < 0.01$ , respectively.

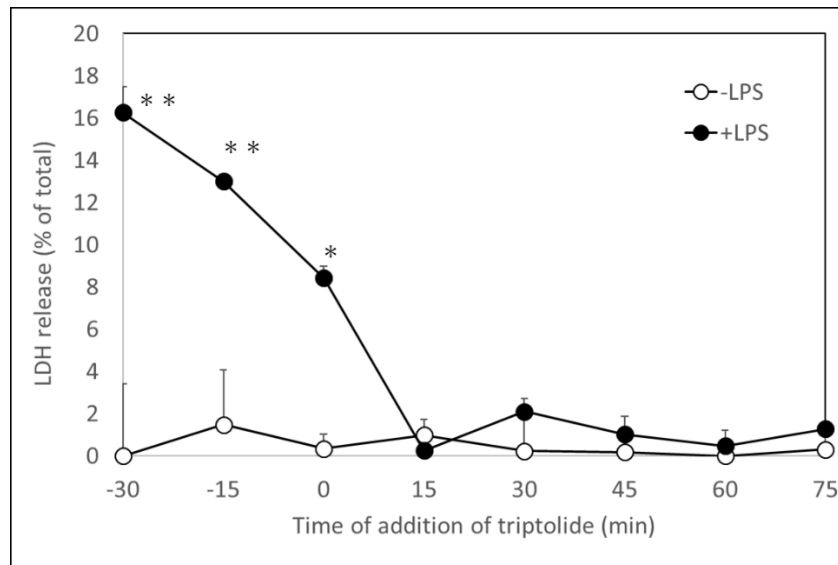
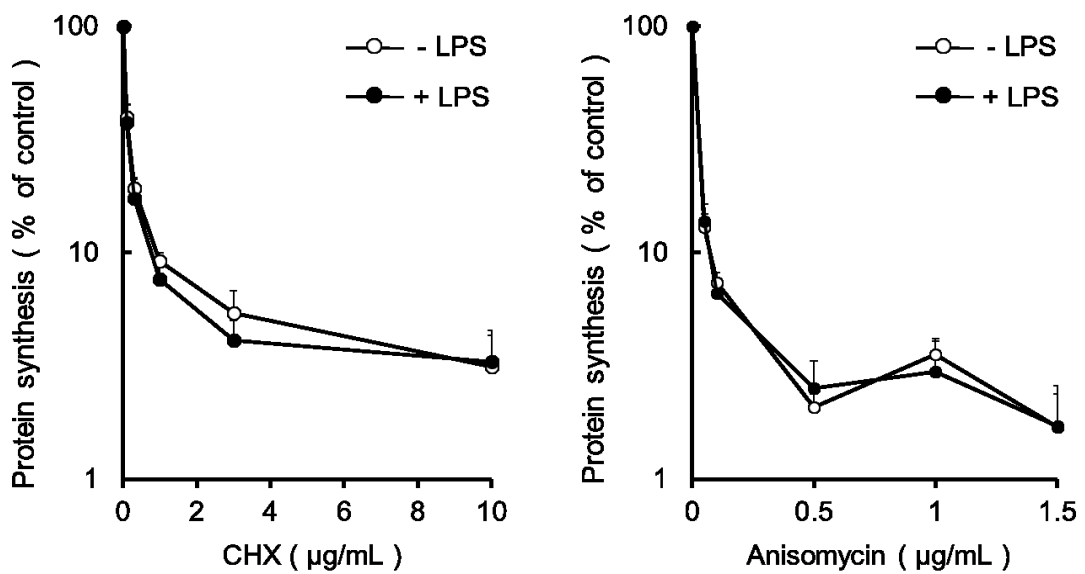


Fig.7. Influence of the time of triptolide addition on induction of the cell damage in LPS-treated JA-4 cells

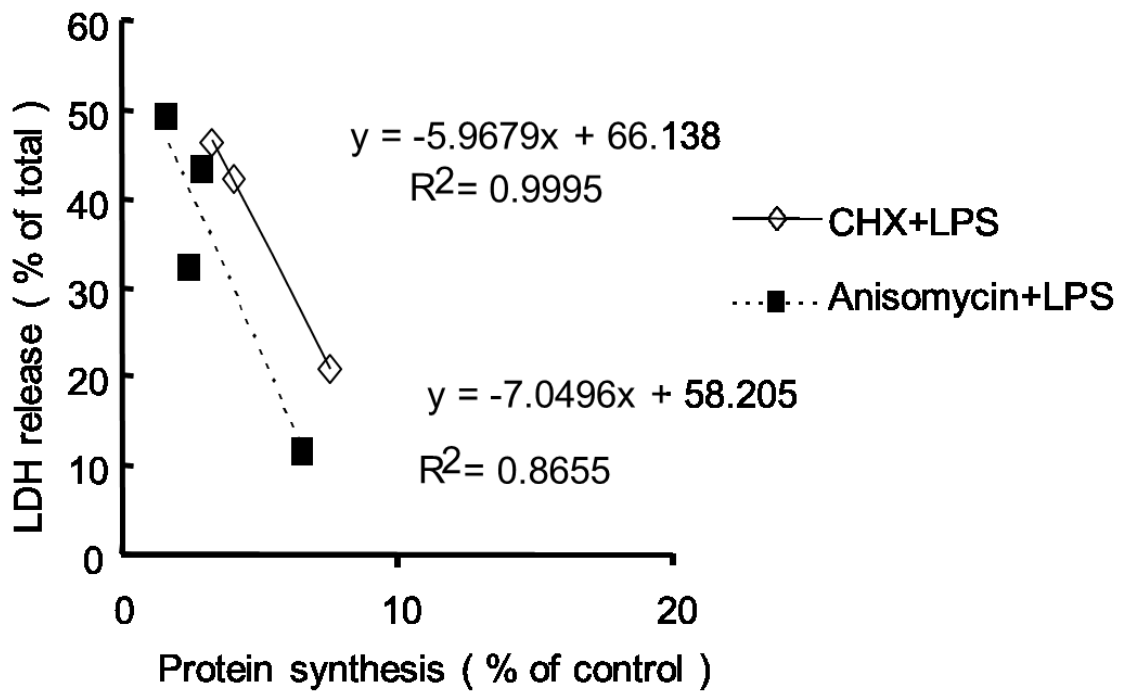
To optimize the conditions of triptolide addition to the cells, we added 300 ng/mL triptolide at 30 or 15 min before, simultaneously, or at 15, 30, 45, 60 or 75 min after the addition of 100 ng/mL LPS (closed circles). Cell culture supernatants were then obtained and subjected to the LDH assay,

as described above. For the negative controls, the triptolide was added but without LPS addition (open circles). The significance of difference between the groups with and without LPS addition at each time was estimated by using Tukey-Kramer test and is shown as \* P<0.05 and \*\* P<0.01, respectively.

(A)



(B)



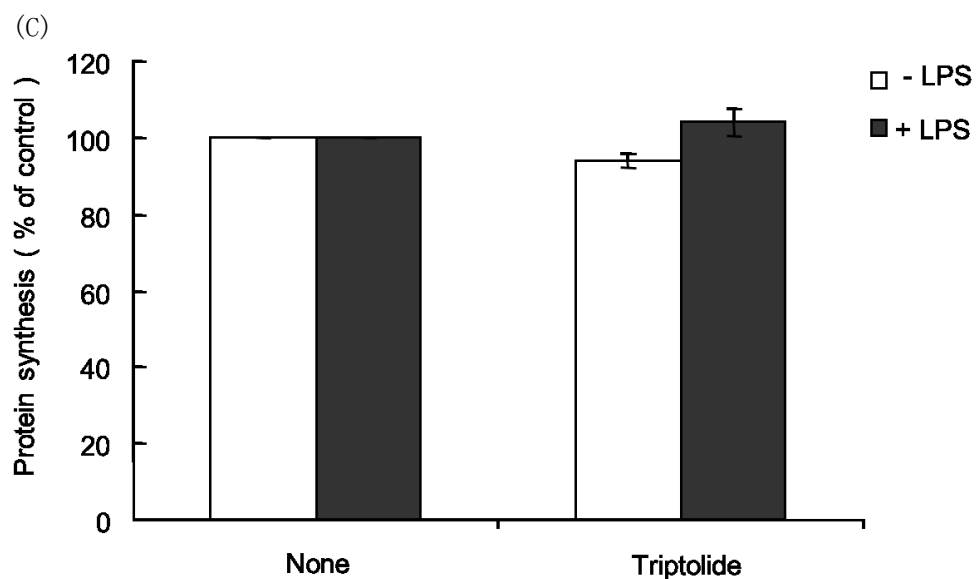


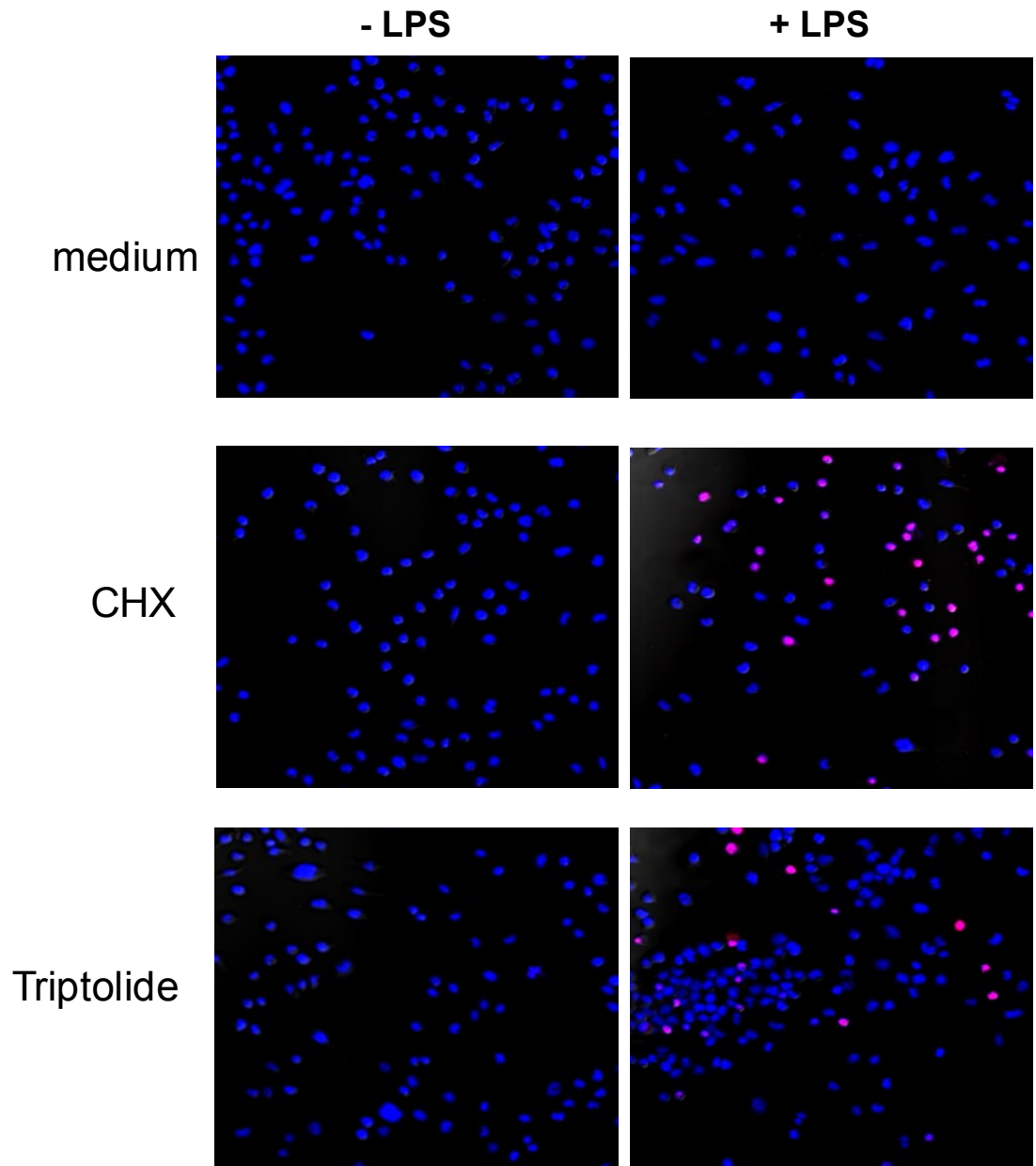
Fig.8. Effects of the inhibitors on the protein synthesis of JA-4 cells

(A) CHX (left) or anisomycin (right) was added to JA-4 cells in [<sup>35</sup>S] Met, Cys - containing labeling medium in the absence (open circles) or presence (closed circles) of 100 ng/mL LPS, as described in the text. After incubation at 37 °C for 1h, the radioactivity in the cells was determined as in the text, and the results were shown as relative (%) to the control without inhibitors. The results are the means ± S.E. for three independent experiments.

(B) Effects of CHX and anisomycin on the protein synthesis and the induction of LDH release in LPS- treated JA-4 cells. The extents of LDH release were compared with those of protein synthesis in LPS - treated macrophages in the presence of CHX (◇) or anisomycin (■). Correlation between them was then analyzed by regression curves for either CHX (—) or anisomycin (----) – treated JA-4 cells.

(C) The JA-4 cells were incubated with nothing or 300 ng/mL triptolide at 37 °C for 1 h in the medium containing [<sup>35</sup>S] methionine and [<sup>35</sup>S] cysteine in the absence (open bars) or presence (closed bars) of 100 ng/mL LPS. The results are shown as % of the control without triptolide, with means ± S.E. for three independent experiments.

(A) TUNEL staining of the JA-4 cells treated with or without LPS and/or CHX, triptolide



(B) Population of TUNEL (+) cells

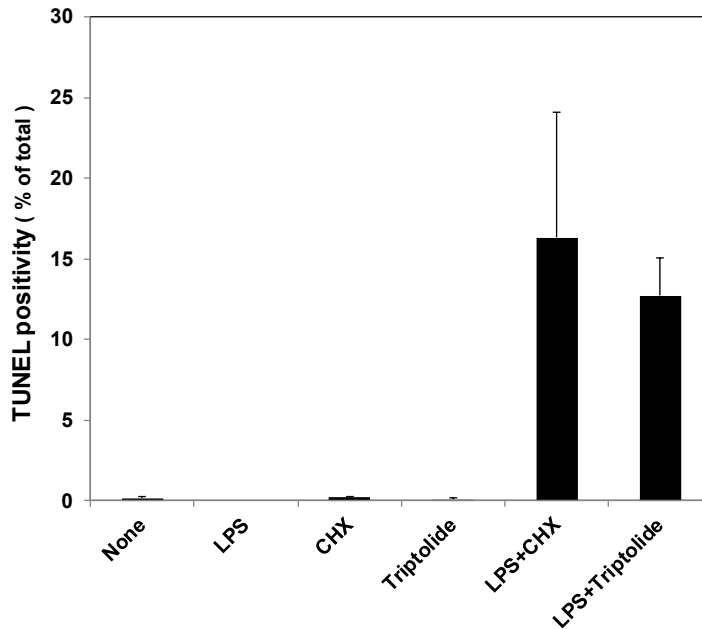


Fig.9. Induction of apoptosis in LPS-treated macrophages by triptolide or CHX

Apoptotic cell death was detected by TUNEL staining as described in the text. The cells were pre-incubated with 300 ng/mL triptolide at 37 °C for 30 min, and then 100 ng/mL LPS was added, followed by incubation at 37 °C for 4 h. As for the negative as well as positive controls, the cells were incubated without or with 10 µg/mL CHX in the presence or absence of 100 ng/mL LPS at 37 °C for 4h. Fixation and subsequent processes for TUNEL staining were as described in the text. (A), TUNEL (+) cells are shown with red fluorescence, and every cell shows blue fluorescence by DAPI-staining. (B), Both TUNEL (+) and (-) cells were photographed and counted in 10 different fields after incubation with or without LPS, and/or CHX or triptolide at 37 °C for 4 h; and the population of TUNEL (+) cells was scored in each field. The results are given as the means  $\pm$ S.D. for 2 independent experiments performed on separate days.



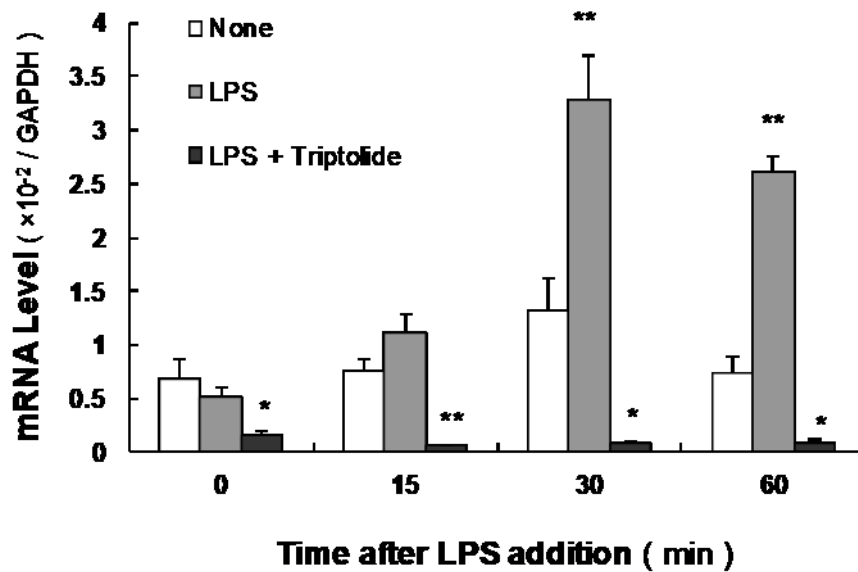


Fig.10. Inhibition of MKP-1 mRNA induction by triptolide in LPS-treated JA-4 cells

The cells were untreated or pre-incubated with 300 ng/mL triptolide at 37 °C for 30 min, and then were left untreated or incubated with 100 ng/mL LPS in the untreated medium with triptolide or LPS and triptolide in the pre-incubated with triptolide at 37 °C for 0, 15, 30 or 60 min. After the cells had been harvested and washed, the cellular RNA was extracted and subjected to RT-PCR, as described in the text. The MKP-1 mRNA levels relative to the GAPDH mRNA level were estimated in each experiment, and the results are expressed as the means  $\pm$  S.E. for 3 independent experiments performed separately on different days. The significance of difference between the groups with LPS in the presence or absence of triptolide versus the untreated cells at each time was estimated by Tukey-Kramer test and are shown as \*  $P < 0.05$ , and \*\*  $P < 0.01$ , respectively.

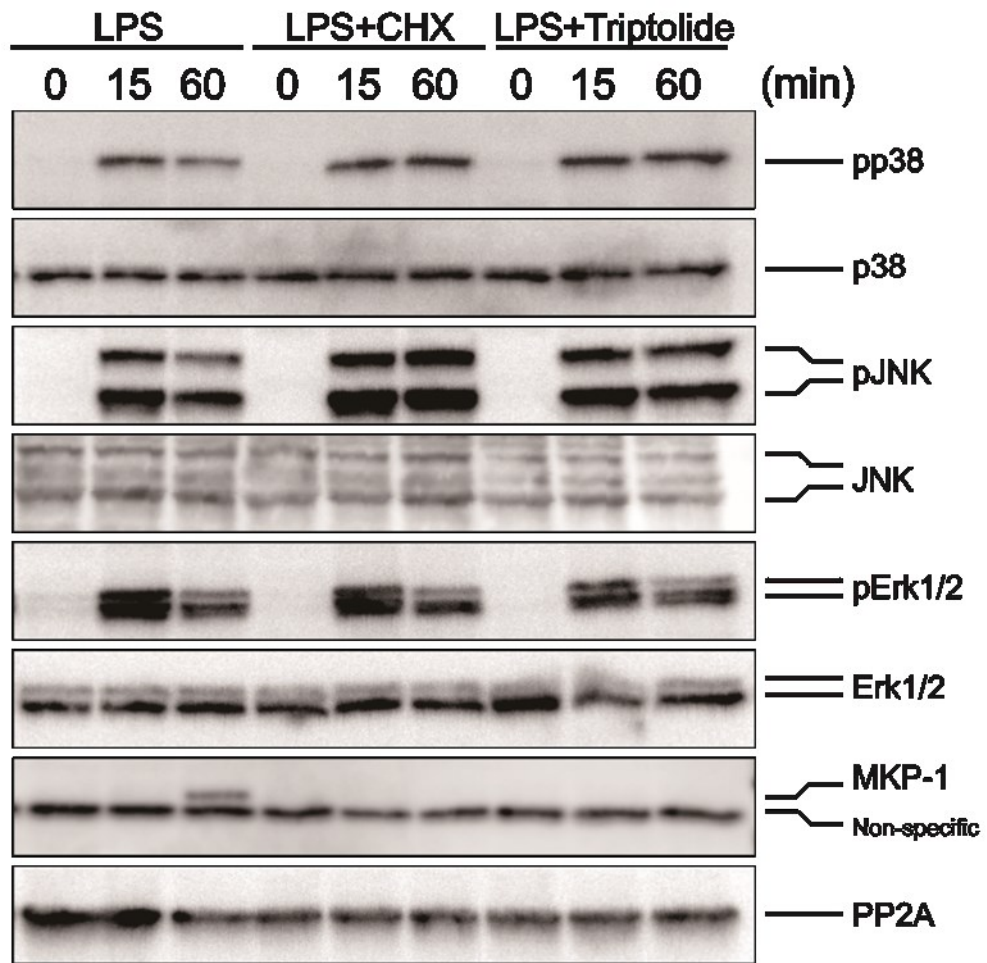


Fig. 11. Summary of this study concerning induction of apoptosis and sustained phosphorylation of p38 by CHX or triptolide in LPS-treated JA-4 cells

LPS rapidly induces MKK3/6 activation, resulting in phosphorylation of p38; and pp38 is translocated into the nuclei. MKP-1, but not PP2A, is also induced transcriptionally by LPS signaling and involved in dephosphorylation of pp38MAPK into p38MAPK by its protein phosphatase activity. This transcriptional induction of MKP-1 mRNA is strongly inhibited by triptolide. The turnover of MKP-1 protein is rather rapid and thus CHX decreases the MKP-1 level by inhibiting protein synthesis. Taken together, CHX and triptolide induce sustained phosphorylation of p38MAPK in LPS-treated cells, in which pp38MAPK is accumulated in the nuclei. The pathways for apoptosis induction in these cells, however, remain unclear.

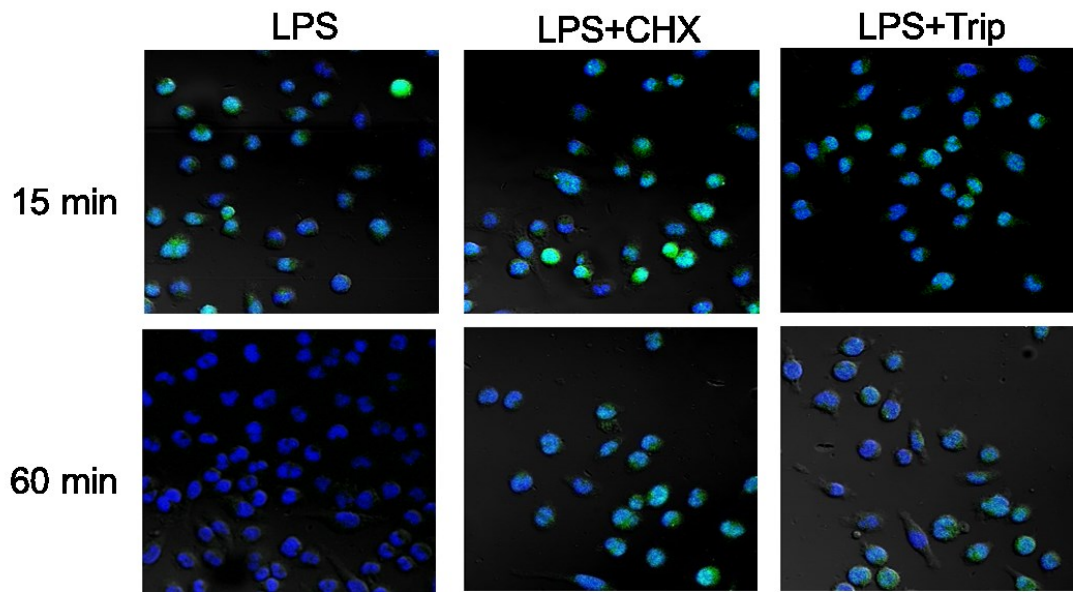
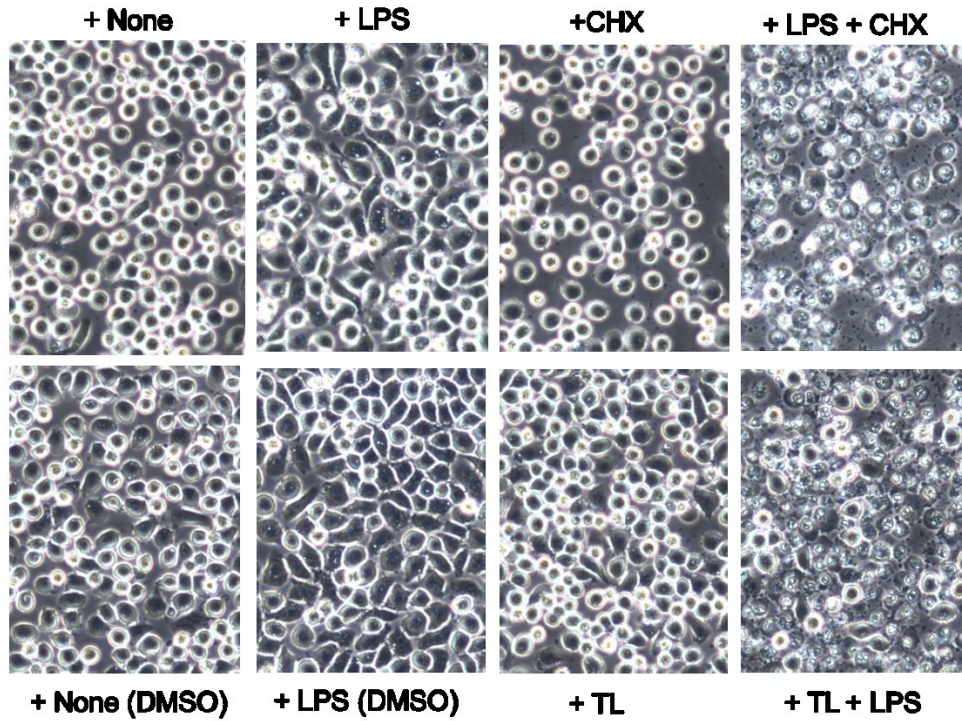


Fig.12. Elevated and sustained phosphorylation of p38 MAPK in the nuclei of LPS-treated JA-4 cells in the presence of CHX or triptolide

Localization of phosphorylated p38 (pp38) is shown in the nuclei of the macrophages treated with 100 ng/mL LPS alone, LPS and 10  $\mu$ g/mL CHX or LPS and 300 ng/mL triptolide after incubation for 15 or 60 min after LPS addition. Green fluorescence indicates p-p38 MAPK, and blue fluorescence, nuclei, as described in the text. Note that most of the green fluorescence is localized in the nuclei and that the fluorescence has disappeared from nuclei of LPS-treated cells but, instead, is localized in nuclei of the cells treated with LPS + triptolide or with LPS + CHX.

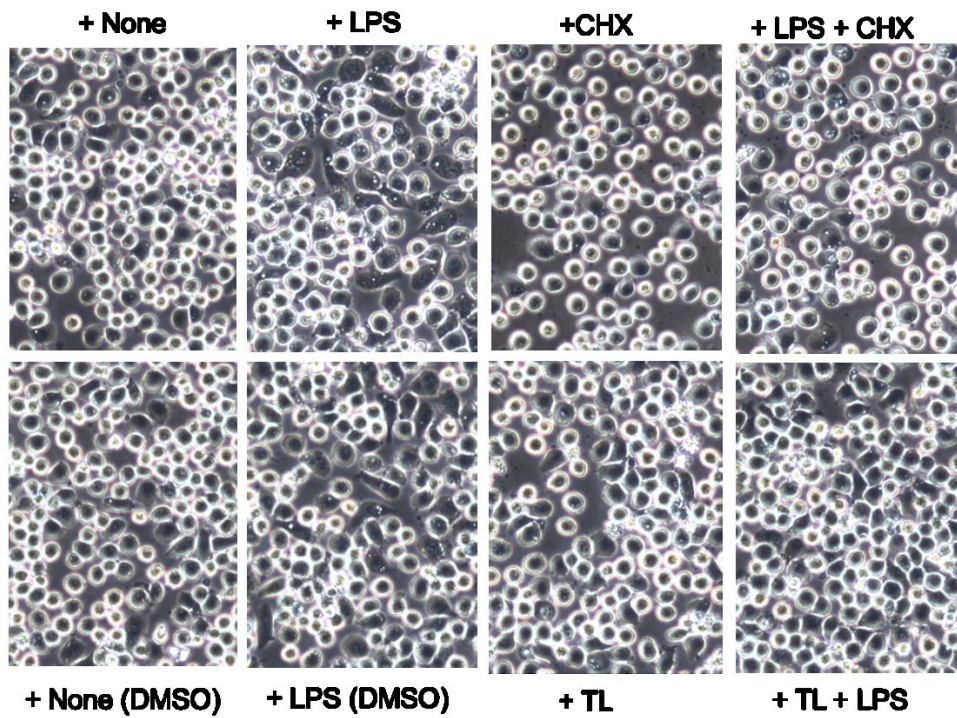
(A)

JA-4



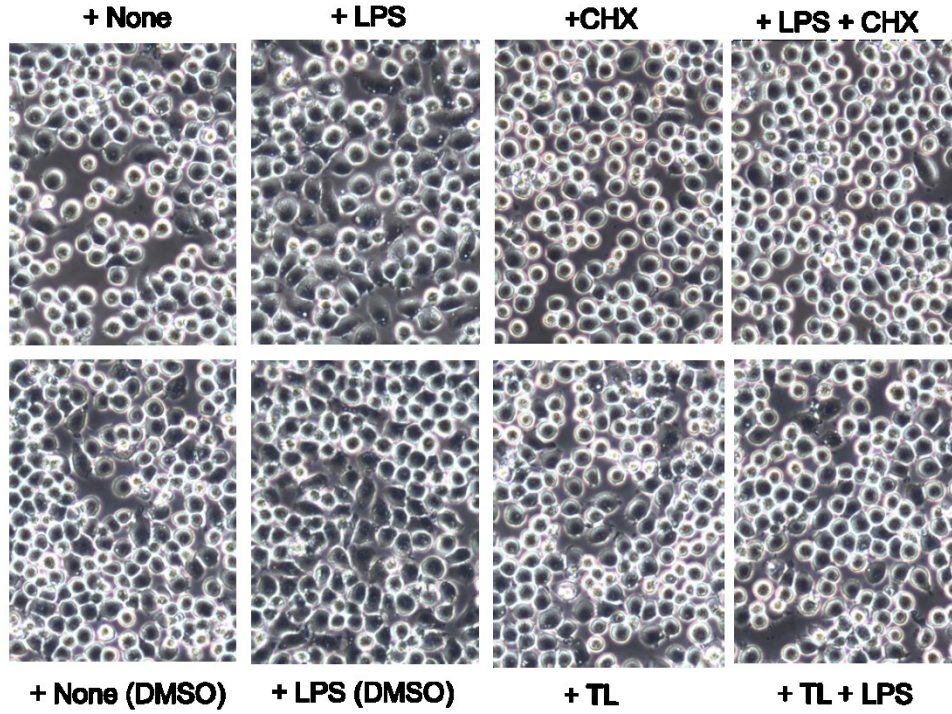
(B)

LPS1916



(C)

LCR1-1



(D)

LCR3-1

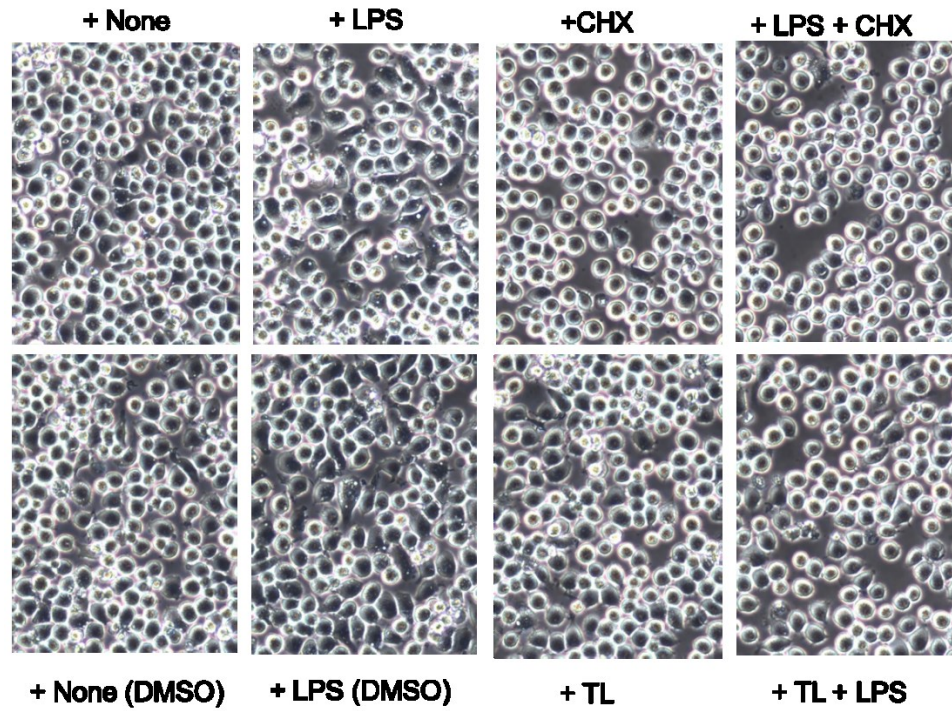


Fig.13. Phase - contrast micrograms of JA-4 cells (parent strain), LPS1916 cells, LCR1-1 cells and LCR3-1 cells treated with LPS in the presence or absence of triptolide or CHX

The cells were seeded, pre-cultured at 37°C for 2-4 h, then the medium was changed with fresh one containing nothing or 10µg/mL CHX in the presence or absence of 100 ng/mL LPS at 37°C for 4 h. For the treatment of the cells with triptolide, the medium of the pre-cultured cells was changed with fresh one containing 0.5% DMSO or 300 ng/mL triptolide at 37°C for 30 min, followed by addition of 100 ng/mL LPS and the further incubation at 37°C for 4 h. Photograms were taken in random fields under a phase - contrast microscope, and each representative one is shown. Magnification, ×400.

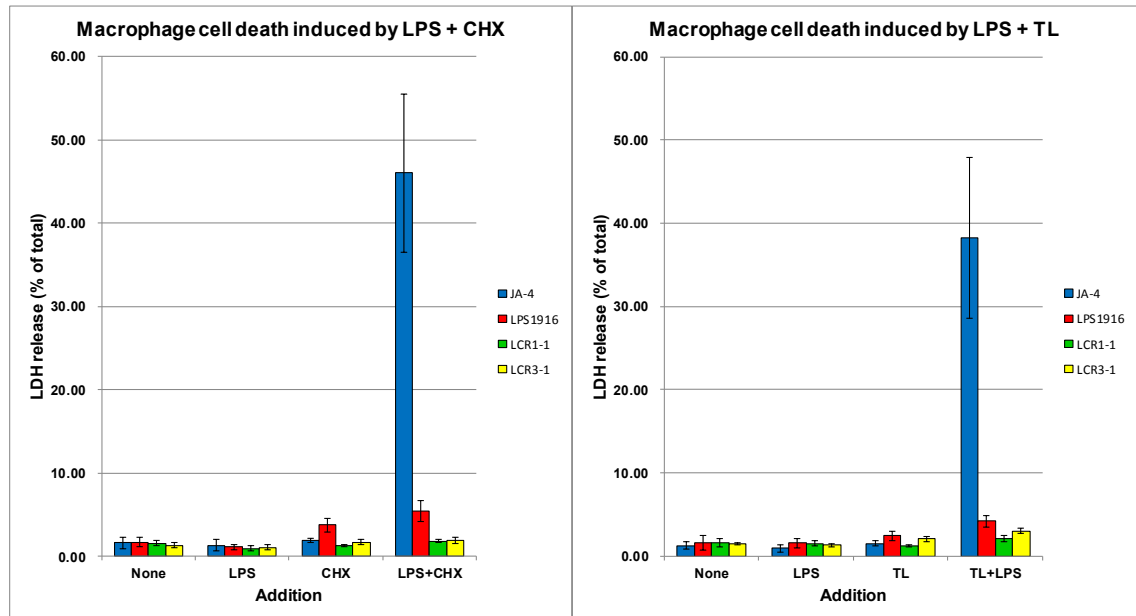


Fig. 14. Influence of CHX or triptolide(TL) on LPS-treated JA-4 cells, LPS1916 and LCR mutants

CHX (left) or triptolide (right) was added to JA-4 cells, LPS1916 cells and LCR mutants in the absence or presence of 100 ng/mL LPS, followed by incubation at 37°C for 4 h. The cell death was examined by the release of LDH, as described in the text. The results are shown as means ± S.D. for three independent experiments.

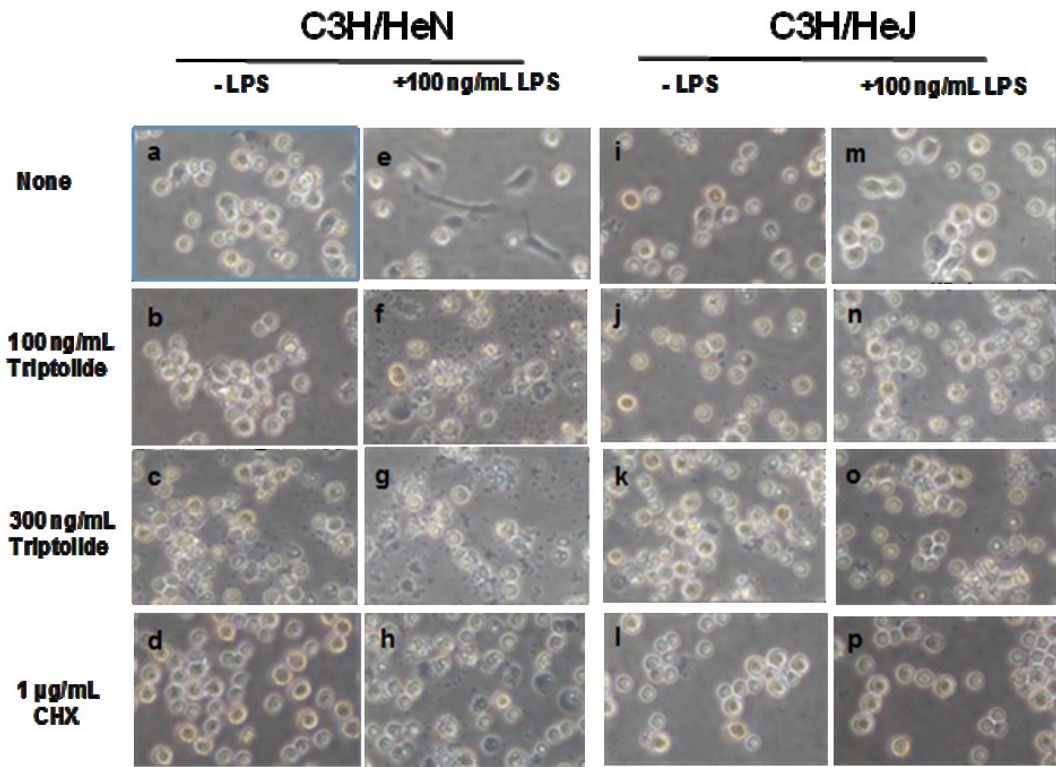


Fig.15. Morphological changes of the macrophages from C3H/HeN(wild-type) and C3H/HeJ mouse after treatment with triptolide and LPS

The peritoneal macrophages from C3H/HeN (a-h) and C3H/HeJ (i-p) mice were pre-cultured and treated either with 100 ng/mL (b, f, j, n) or 300 ng/mL (c, g, k, o) triptolide for 30 min, then incubated in the absence (b, c, j, k) or presence (f, g, n, o) of 100 ng/mL LPS at 37°C for 240 min. As the negative and positive controls, the cells were either treated with nothing (a, e, i, m) or with 1 µg/mL CHX (d, h, l, p), simultaneously without (a, d, i, l) or with (e, h, m, p) 100 ng/mL LPS, respectively; and then the cells were incubated at 37°C for 240 min. Photographs of random fields were taken, and typical ones are shown. Original magnification, x 100.

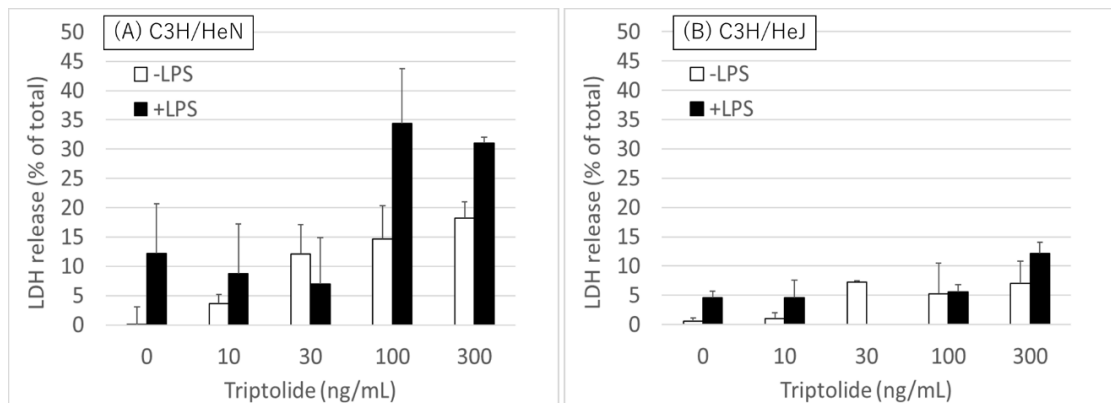


Fig.16. Dose-dependent effects of triptolide on induction of cell death of LPS-treated macrophages from C3H/HeN and C3H/HeJ mouse

Resident peritoneal macrophages were collected from C3H/HeN (A) and C3H/HeJ (B) mice, pre-cultured in the culture medium at 37°C for 60 min, and pre-incubated with 0, 10, 30, 100, or 300 ng/mL triptolide. Then the cells were incubated further with (open bars) or without (closed bars) 100 ng/mL LPS at 37°C for 240 min, and the cell damage was estimated by LDH release. The results are shown as the means  $\pm$  S.E. for 2 independent experiments performed separately on different days.

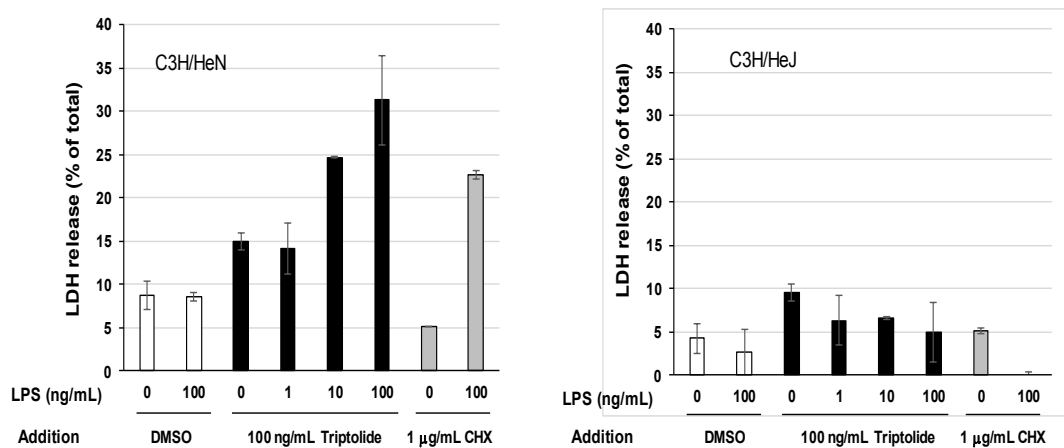


Fig.17. Effects of triptolide on LPS-treated macrophages from C3H/HeN and C3H/HeJ mice

Resident peritoneal macrophages were collected from C3H/HeN (left) and C3H/HeJ (right) mice as described in the text and were pre-cultured in the culture medium at 37°C for 60 min. After changing fresh culture medium, the cells were preincubated with (solid bars) or without (open bars) 100 ng/mL triptolide at 37°C for 60 min. Then 0, 1, 10, or 100 ng/mL LPS was added to the culture, followed by incubation at 37°C for 240 min. As the controls, the cells were incubated without preincubation but with 1 µg/mL CHX (gray bars) in the presence or absence of 100 ng/mL LPS at 37°C for 240 min. Cell damage was estimated by LDH release and the results are shown as the means  $\pm$  SD for independent 2 experiments performed separately on different days.