

【原著・基礎】

ピコリン酸によるマクロファージの *Mycobacterium avium* 殺菌能増強作用と
アポトーシスとの関連性

多田 納 豊・清水 利朗・安元 剛・富岡 治明

島根大学医学部微生物・免疫学*

(平成 18 年 9 月 6 日受付・平成 19 年 5 月 29 日受理)

ピコリン酸は、マクロファージ (MΦ) の *Mycobacterium avium* に対する抗菌活性を増強する作用を有しているが、マウスの骨髄由来 MΦ の場合では、ピコリン酸の MΦ 殺菌能増強作用は MΦ アポトーシス誘導作用に連動したものであることが報告されている。今回は、このようなメカニズムがヒトの MΦ にもあてはまるものであるのか否かを知る目的で、THP-1 ヒト MΦ (THP-1 MΦ) を供試して、ピコリン酸の MΦ アポトーシス誘導能について DNA laddering 法と Annexin V 法を用いて検討した。その結果、Annexin V 法による検討では、ピコリン酸処理により THP-1 MΦ の Annexin V 反応性の増強、すなわちフォスファチジルセリンの細胞表面への移行という早期アポトーシスに特徴的な現象が誘導されることが明らかになった。他方、DNA laddering 法による検討では、ピコリン酸処理により中・後期アポトーシスに特徴的な DNA 分解・ヌクレオソームへの断片化が誘導されるような徴候は認められなかった。これらの成績は、ピコリン酸処理により THP-1 MΦ に早期アポトーシスが誘導されるが、このピコリン酸の作用は caspase-activated deoxyribonuclease による DNA 断片化という中・後期のアポトーシス誘導にはつながらないことを示唆している。

Key words: picolinic acid, macrophage, apoptosis, bactericidal activity, *Mycobacterium avium*

近年、多剤耐性結核や AIDS 患者での播種性 *Mycobacterium avium* complex (MAC) 感染症の増加が問題になっている。このため、既存のものよりも強力かつ交差耐性のない新規抗結核薬、抗 MAC 薬の開発が急務になっているが、そのような新しいタイプの抗菌薬の開発は遅々として進んでいない現状にある。このような状況下にあっては、既存の抗菌薬の治療効果を側面から増強するような補助薬剤を併用していくという strategy がより現実的であると思われる。

トリプトファン分解産物であるピコリン酸は、 Zn^{2+} や Fe^{2+} などの金属イオンに対してキレート活性を有し、腸管からの Zn^{2+} の吸収を促進する薬理作用が知られている。また、腸管から吸収されにくいクロムをピコリン酸と結合させたピコリン酸クロムは腸管からの吸収効率が著しく高く、体内に吸収された 3 価クロムはインスリンの分泌を高めその作用を強化する働きがあるため糖尿病の予防薬として用いられている。さらに、ピコリン酸クロムには脂質代謝系に働き中性脂肪・コレステロール値を正常化する作用もあるので動脈硬化や高血圧の予防薬としても有用である¹⁾。最近、Pais らにより、ピコリン酸を MAC 感染マクロファージ (MΦ) に作用させた場合には、MΦ の MAC に対する抗菌活性が増強することが報告されている²⁾。さらに著者らの検討でも、ピコリン酸には MΦ 内局在 MAC 菌に対するリファンピシン (RFP)/

クラリスロマイシン (CAM) 合剤やシタフロキサシン、ガチフロキサシン、レボフロキサシンなどのキノロン系薬、さらに抗原虫薬であるキナクリンの抗菌活性を増強する作用が認められている^{3,4)}。

ところで著者らの最近の検討では、ピコリン酸による MΦ の細胞内局在 MAC に対する抗菌活性の増強には、活性酸素、活性酸化窒素、遊離脂肪酸などの MΦ の殺菌性エフェクター分子は関与していないことが明らかになっている⁵⁾。さらに Pais らは、少なくともマウスの骨髄由来 MΦ (BM-MΦ) を供試した場合には、ピコリン酸の MΦ の細胞内局在 MAC に対する抗菌活性の増強作用は、ピコリン酸により誘導される MΦ アポトーシスと連動していると報告している⁶⁾。そこで今回は、ピコリン酸による MΦ 内局在 MAC の強い増殖抑制作用がピコリン酸による MΦ のアポトーシス誘導に連動したのか否かを確かめる目的で、ピコリン酸の MΦ アポトーシス誘導能について、Annexin V 法と DNA laddering 法を用いての検討を行ったので以下に報告する。

I. 材料と方法

1. 供試菌

供試菌としては、MAC 症患者より分離された *M. avium* N-444 株を用いた。

*島根県出雲市塩冶町 89-1

2. 供試細胞

供試細胞としては、THP-1 ヒト単球由来 M Φ 細胞株 (THP-1 M Φ) を用いた。この細胞の 1×10^6 個を浮遊させた 10% 牛胎児血清 (FBS) および 50 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 加 RPMI 1640 培地 (1 mL) を 15 mm 径の組織培養ウェルに撒き、37°C の CO₂ インキュベーター内で 22 時間培養後、次いで 2% FBS 加 ハンクス氏液 (HBSS) で洗浄して非付着性細胞を除いたものを、THP-1 M Φ として実験に供した。

3. M Φ におけるアポトーシスの検出

1) Annexin V 法

THP-1 M Φ (5×10^5 細胞/ウェル) に MOI=20 で供試 *M. avium* を 2 時間感染させ、次いで 2% FBS 加 HBSS で洗浄して非感染菌を除いた後、5% FBS 加 RPMI 培地中、20 mM ピコリン酸添加あるいは非添加の条件下で 37°C、24 時間培養後、細胞をセルスクレーパーで回収し、マニュアルに従って FITC 標識 Annexin V (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit Plus, Biovision) でラベルし、EPICS ELITE flow cytometer (Beckman Coulter) を用いて flow cytometry 解析を行った。

2) DNA laddering 法

上述と同様な条件で *M. avium* を感染させ、ピコリン酸添加あるいは非添加の条件下で 4 日間にわたって培養した THP-1 M Φ から常法により DNA を抽出し、これを 1.5% アガロース電気泳動にかけ、M Φ 細胞のアポトーシスに起因する DNA 断片化の有無とその程度を観察した。

4. ピコリン酸の抗 *M. avium* 抗菌活性の測定

ピコリン酸自体の MAC 菌に対する抗菌活性を知る目的で、MAC 菌を 0.02~20 mM ピコリン酸を含む 7H9 培地中で 7 日間にわたり培養し、生残生菌単位 (CFU) を 7H11 寒天平板上で計測した。

II. 結 果

最近の Pais らの報告では、マウス BM-M Φ ではピコリン酸によりアポトーシスが誘導されることから、ピコリン酸の M Φ 抗 MAC 殺菌能の増強作用はアポトーシスに連動したものであると結論づけられている^{2,6)}。今回は、ヒトの M Φ でも同様なことがいえるかどうかを調べる目的で、THP-1 M Φ を用いてピコリン酸が *M. avium* 感染 M Φ にアポトーシスを誘導するか否かについて検討した。すなわち、ピコリン酸処理による供試 M Φ におけるアポトーシス誘導の有無を、①早期アポトーシス細胞に特異的なフォスファチジルセリン (PS) の細胞表面への移行と⁷⁾、②中・後期アポトーシス細胞に特異的な DNA 断片化を指標として、各々 Annexin V 法と DNA laddering 法で調べた⁸⁾。

1. 早期アポトーシスの誘導

M. avium 感染あるいは非感染 THP-1 M Φ を、20 mM ピコリン酸の存在下あるいは非存在下で 24 時間培養し

た場合の Annexin V 法での flow cytometry 解析の結果を Fig. 1 に示すが、*M. avium* 感染によっては、M Φ の Annexin V との反応性に变化はみられなかった (Fig. 1 C)。他方、非感染 M Φ をピコリン酸処理した場合には、Annexin V との反応性の増強、すなわち PS の細胞表面への表出という現象が起こることが明らかになった (Fig. 1 D)。なお、Fig. 1 E に示すように、*M. avium* 感染 M Φ にピコリン酸処理を行った場合の Annexin V 反応性の増強は、ピコリン酸処理単独の場合と同程度であった。以上の結果より、THP-1 M Φ のピコリン酸処理により、早期アポトーシスが誘導されることが明らかになった。

2. 中・後期アポトーシスの誘導

THP-1 M Φ を上記の条件下で 4 日間に亘って培養した場合の DNA laddering 法での解析結果を Fig. 2 に示す。まず、シクロヘキシミドで処理した THP-1 M Φ から抽出した DNA では、培養 6 時間でその泳動像にアポトーシスに起因した DNA のヌクレオソームへの分解を示す典型的な laddering が認められたが、ピコリン酸処理によっては培養 24 時間でも僅かな laddering 傾向を認めただけであった (Fig. 2 A)。さらに、Fig. 2 B に示すように、少なくとも培養 4 日までの間では、*M. avium* 感染やピコリン酸処理の有無にかかわらず、明確な DNA 断片化現象は認められなかった。以上の成績は、THP-1 M Φ では、ピコリン酸により DNA 断片化、すなわち中・後期アポトーシスのプロセスが明確な形では惹起されないことを示唆している。

3. ピコリン酸の抗 *M. avium* 抗菌作用

ピコリン酸処理 M Φ においては抗 MAC 抗菌活性が増強するが^{2,3,5)}、この現象は M Φ のアポトーシスと関係するのではなく、ファゴソーム内に局在する MAC に対するピコリン酸自体の抗菌活性が反映されたものにすぎないという可能性も否定できない。このことを確かめる目的で、7H9 培地中で増殖している *M. avium* に対してピコリン酸がどのような作用を及ぼすのかについて検討した。その結果、Fig. 3 に示すように、*M. avium* の増殖は 20 mM 濃度のピコリン酸により強く阻害されることが明らかになった。

III. 考 察

今回の検討では、ピコリン酸処理により THP-1 M Φ に早期アポトーシスが誘導されるが、このピコリン酸の作用は caspase-activated deoxyribonuclease による DNA の分解・ヌクレオソームへの断片化という中・後期アポトーシスのプロセスは惹起しないことが明らかになった。すでに、Pais らや著者らが報告しているように、ピコリン酸は M Φ の細胞内 MAC に対する抗菌活性を増強させる作用を有している^{2,3,5)}。今回の成績から考えて、このようなピコリン酸による M Φ の抗 MAC 抗菌活性の増強という現象は、ピコリン酸により誘導される

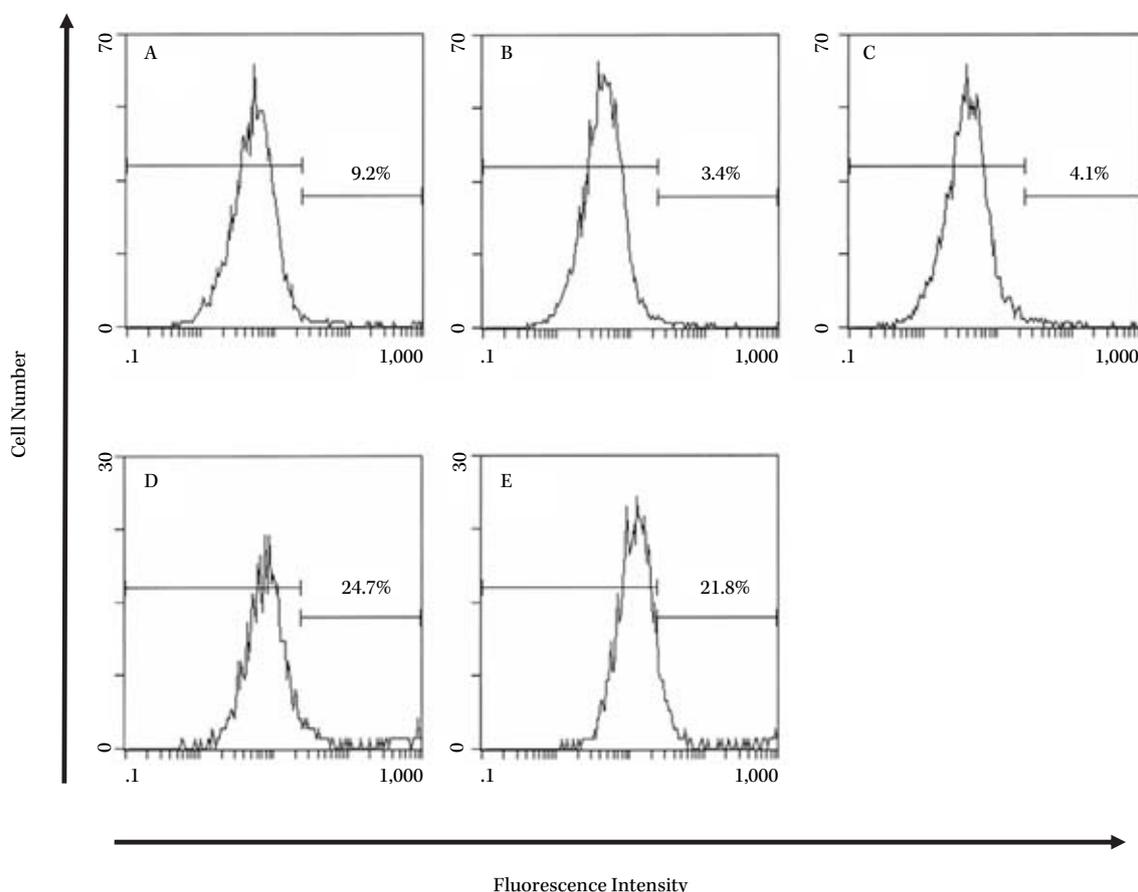


Fig. 1. Evidences that picolinic acid (PA) induces early phase apoptosis in THP-1 MΦs. The phosphatidylserine translocation to the outer leaflet of the cell membrane was measured by Annexin V assay. MΦs with or without *M. avium* infection were cultured in the medium in the presence or absence of 20 mM PA for up to 24 h. A, control MΦs (0 h); B, control MΦs (24 h); C, MΦs infected with *M. avium* (24 h); D, MΦs given PA treatment (24 h); E, MΦs infected with *M. avium* and given subsequent PA treatment (24 h). In all cases, MΦs were pretreated with 50 ng/mL PMA for 22 h before *M. avium* infection.

MΦ アポトーシスの早期プロセス, 特に細胞膜の流動化に関係している可能性が考えられるが, MΦ のアポトーシスの DNA 断片化などのような中・後期プロセスに連動したものは考えがたい。

ところで, ピコリン酸には MΦ を活性化しその機能を増強させる作用が知られており, Bosco らは, ピコリン酸はその Fe イオンキレート作用に依存した形での MΦ 活性化能を示し, マウス MΦ の MΦ inflammatory protein-1 (MIP-1) 産生能を up-regulate することを報告している^{9,10)}。また, ピコリン酸は, MΦ の抗腫瘍活性や抗真菌殺菌活性を増強すること, さらに MΦ の inducible nitric oxide synthase 誘導に働くことが知られており, ピコリン酸の MΦ 抗 MAC 抗菌活性の増強作用は, 少なくとも部分的にはピコリン酸の MΦ 活性化作用に依存したものと考えられる。以前から MΦ の細胞膜の流動性の増加や perturbation などの現象は MΦ 機能の活性化と連動することが知られているが¹¹⁾, このことを併せ考えると, 今回観察されたピコリン酸の MΦ の早期ア

ポトーシス誘導作用, すなわち細胞膜の mobility の増強作用が MΦ 機能の活性化に何らかの形で関係している可能性が高いように思われる。したがって, ピコリン酸による MΦ 抗 MAC 活性増強に関しての一つの可能性としては, ピコリン酸処理によって MΦ の殺菌能に関連した細胞機能が活性化されるというメカニズムが考えられる。

他方, 今回の検討で 20 mM 濃度のピコリン酸は *M. avium* の増殖を強く阻害することが明らかになったが (Fig. 3), この成績から考えて, ピコリン酸自体が抗菌活性を有し, MΦ のファゴソーム内に取り込まれたピコリン酸がファゴソーム内局在菌に対して抗菌的に作用するようなメカニズムが部分的にかかわっている可能性も否定できない。

以上の考察に関連して, TNF- α や H₂O₂ などの death signal, あるいは P2 レセプターを介する ATP シグナルによって, 結核菌群の弱毒株 (結核菌 H37Ra 株, *Mycobacterium bovis* BCG 株) や MAC に感染した MΦ に誘導

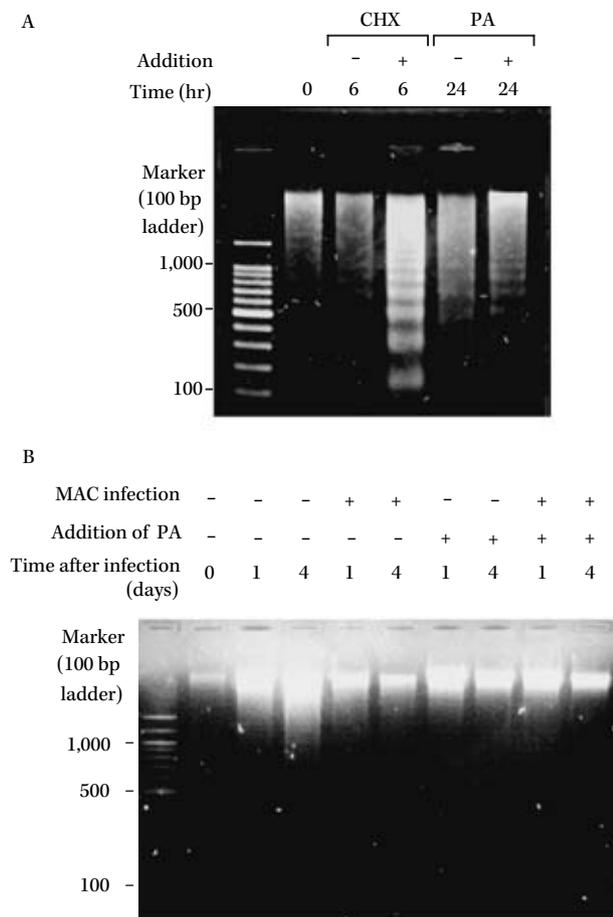


Fig. 2. Evidences that picolinic acid (PA) is lacking in the activity in inducing middle to late phase apoptosis in THP-1 MΦs. DNA-associated changes (DNA fragmentation) of test MΦs were measured by DNA laddering assay. *A*. THP-1 MΦs were cultured in the medium with or without 100 μ g/mL cycloheximide (CHX) or 20 mM PA for up to 24 h. *B*. THP-1 MΦs with or without MAC infection were cultured in the medium in the presence or absence of 20 mM PA for up to 4 days. In *B*, MΦs were pretreated with 50 ng/mL PMA for 22 h before *M. avium* infection.

されるアポトーシスは、MΦ内でのこれらの抗酸菌の殺菌と連動していると報告されており¹²⁾、同様に、今回使用したTHP-1 MΦについてもTNF- α で誘導されるアポトーシスに連動したBCGのMΦ内殺菌が報告されている。しかしながら、ATPシグナルで誘導されるMΦのBCGに対する殺菌活性は、必ずしもMΦアポトーシスとは連動していないとする成績も報告されており¹³⁾、これに今回の検討で得られた成績を加味して考えた場合、種々のシグナルを受けたMΦでの抗酸菌殺菌活性の増強という現象は、必ずしも常にMΦアポトーシスを前提にしたものであるとはいえないようである。なおPaisらは、ピコリン酸はマウスのBM-MΦにMAC殺菌機能の増強と連動した形でアポトーシスを誘導するとしてい

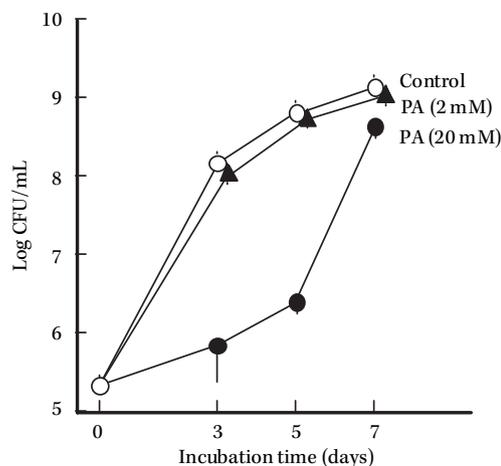


Fig. 3. Antimicrobial effects of picolinic acid (PA) at 2 and 20 mM concentrations against extracellular *M. avium* organisms growing in 7H9 medium.

るが^{2,6)}、近年Keaneらは、マウス腹腔MΦにTNF- α シグナルを与えた場合に誘導されるアポトーシスは、マウスの系統に強く依存していることを報告している¹⁴⁾。したがって、供試MΦの動物種や性状の違いによって、ピコリン酸によるアポトーシス誘導プロフィールは異なる可能性が示唆される。現在さまざまな種類のMΦを用いての検討を進めつつあるので、その成績については別の機会に報告したい。

文 献

- 1) Vincent J B: The potential value and toxicity of chromium picolinate as a nutritional supplement, weight loss agent and muscle development agent. *Sports Med* 2003; 33: 213-30
- 2) Pais T F, Appelberg R: Macrophage control of mycobacterial growth induced by picolinic acid is dependent on host cell apoptosis. *J Immunol* 2000; 164: 389-97
- 3) Cai S, Sato K, Shimizu T, Yamabe S, Sano C, Tomioka H, et al: Antimicrobial activity of picolinic acid against extracellular and intracellular *Mycobacterium avium* complex and its combined activity with clarithromycin, rifampicin and fluoroquinolones. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 85-93
- 4) Shimizu T, Tomioka H: Activity of picolinic acid in combination with the antiprotozoal drug quinacrine against *Mycobacterium avium* complex. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3186-8
- 5) Tomioka H, Shimizu T, Tatano Y: Effects of picolinic acid on the antimicrobial functions of host macrophages against *Mycobacterium avium* complex. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29: 460-4
- 6) Pais T F, Appelberg R: Induction of *Mycobacterium avium* growth restriction and inhibition of phagosome-endosome interactions during macrophage activation and apoptosis induction by picolinic acid plus IFN γ . *Microbiology* 2004; 150: 1507-

- 18
- 7) Zhang G, Gurtu V, Kain S R, Yan G: Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *Biotechniques* 1997; 23: 525-31
 - 8) Pepper C, Thomas A, Tucker H, Hoy T, Bentley P: Flow cytometric assessment of three different methods for the measurement of in vitro apoptosis. *Leuk Res* 1998; 22: 439-44
 - 9) Bosco M C, Rapisarda A, Massazza S, Melillo G, Young H, Varesio L: The tryptophan catabolite picolinic acid selectively induces the chemokines macrophage inflammatory protein-1 alpha and -1 beta in macrophages. *J Immunol* 2000; 164: 3283-91
 - 10) Bosco M C, Rapisarda A, Reffo G, Massazza S, Pastorino S, Varesio L: Macrophage activating properties of the tryptophan catabolite picolinic acid. *Adv Exp Med Biol* 2003; 527: 55-65
 - 11) Somers S D, Yuli I, Snyderman R, Adams D O: Altered cell-averaged microviscosity of murine peritoneal macrophages undergoing activation in vivo or in vitro. *Cell Immunol* 1987; 104: 232-44
 - 12) Molloy A, Laochumroonvorapong P, Kaplan G: Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guerin. *J Exp Med* 1994; 180: 1499-509
 - 13) Lammas D A, Stober C, Harvey C J, Kendrick N, Panchalingam S, Kumararatne D S: ATP-induced killing of mycobacteria by human macrophages is mediated by purinergic P2Z (P2X₇) receptors. *Immunity* 1997; 7: 433-44
 - 14) Keane J, Shurtleff B, Kornfeld H: TNF-dependent BALB/c murine macrophage apoptosis following *Mycobacterium tuberculosis* infection inhibits bacillary growth in an IFN- γ independent manner. *Tuberculosis (Edinb)* 2002; 82: 55-61

Relationship between the picolinic acid-induced potentiation of macrophage antimycobacterial activity and macrophage apoptosis

Yutaka Tatano, Toshiaki Shimizu, Ko Yasumoto and Haruaki Tomioka

Department of Microbiology and Immunology, Shimane University School of Medicine,
Enya-cho 89-1, Izumo, Shimane, Japan

It has been reported that picolinic acid (PA) potentiated the antimicrobial activity of mouse bone marrow-derived macrophages (M Φ s) against intracellular *Mycobacterium avium* complex (MAC) and that such PA effects were accompanied by PA-induced M Φ apoptosis. It is of interest to examine whether or not such a phenomenon is also observed for human M Φ s. In the present study, we examined PA activity in inducing apoptosis of THP-1 human M Φ s (THP-1 M Φ s) using the Annexin V and DNA laddering assay methods. Flow cytometric studies on test M Φ s stained with Annexin V demonstrated that PA treatment induced phosphatidylserine translocation to the outer leaflet of the cell membrane THP-1 M Φ s with or without *M. avium* infection. On the other hand, PA treatment did not cause significant levels of DNA laddering, even when test THP-1 M Φ s were infected with *M. avium*. These findings suggest that PA may induce the early phase apoptotic events in THP-1 M Φ s, without inducing DNA fragmentation characteristic to the middle to late phase apoptosis. Our present results provide insights into the possible role of M Φ apoptosis in the PA-induced potentiation of M Φ anti-MAC antimicrobial activity.