

〈原著〉

TNF- α による好中球活性化のプライミング反応について

太田 安彦¹⁾、徳永 賢治¹⁾、秋山 佳織²⁾

Priming of neutrophil respiratory burst by tumor necrosis factor- α

Yasuhiko Ohota¹⁾, Kenji Tokunaga¹⁾ and Kaoru Akiyama²⁾

Summary It is known that the phenomenon called priming occurs in the O_2^- production by neutrophils. A certain stimulating factor leads to the priming of neutrophils, and another stimulating factor enhances the production of O_2^- significantly.

This phenomenon is considered to occur universally inside the living body at the time of inflammation. It functions to strengthen the biological defense mechanism by neutrophils. On the other hand, it has been reported that priming activates neutrophils and causes cellular disorder. However, the signaling of priming has not been clarified.

In this study, the author discussed the signaling of priming by TNF- α . In the signaling due to fMLP stimulation after priming, it was observed that the p38MAPK and Erk1/2 systems are activated via tyrosine kinase and then p47phox is phosphorylated. It was indicated that this signaling activates NADPH oxidase and enhances the production of O_2^- .

Key words: Priming, Neutrophil, NADPH oxidase, Tumor necrosis factor- α (TNF- α)
Formil-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP)

I. 序言

好中球は病原体の侵入に対して、走化因子の作用により感染局所に遊走し、病原体を貪食する。その際にNADPH酸化酵素が活性化され、活

性酸素の一種であるスーパーオキシド (O_2^-) を産生する。さらに O_2^- から派生する活性酸素種による殺菌が行われる。

一方、好中球の O_2^- 産生には、プライミングという現象が知られている。好中球があらかじめ

¹⁾香川県立保健医療大学 臨床検査学科
〒761-0123 香川県高松市牟礼町原281-1

²⁾香川県立中央病院中央検査部
〒761-0017 香川県高松市番町5-4-16

受領日 平成24年4月19日

受理日 平成24年7月10日

¹⁾Department of Clinical Medical Technology, Kagawa Prefectural College of Health Science
281-1 Hara, Mure-cho, Takamatsu-shi, Kagawa 761-0123, Japan

²⁾Central Clinical Laboratory, Kagawa Prefectural Central Hospital
5-4-16 Ban-cho, Takamatsu-shi, Kagawa 760-0017, Japan

特定の刺激因子の作用を受けるとプライミングされた状態になり、続いて異なる刺激因子の作用により O_2 産生の著しい亢進が起こる^{1,2)}。プライミング作用を有する因子として、IL-1、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor; TNF- α)、顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor; G-CSF)、顆粒球・マクロファージ刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; GM-CSF)、IL-8などのサイトカインがある^{3,4)}。この現象は生体内では特に炎症の際に生じていると考えられ、炎症病巣の好中球はプライミングされつつ集積した好中球である。このような好中球は、 O_2 の産生、血管内皮への付着、アズール顆粒、リソソームから酵素の遊出など、化学反応や形態変化をとまなうことが推測される。我々の以前の研究では、TNF- α によるプライミング後のformyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP)、phorbol myristate acetate (PMA) 刺激による O_2 の産生はPMAよりもfMLPで増強し、さらにMPO放出が増加した⁵⁾。これらの結果はプライミングにより細胞障害が高まることが考えられる。

TNF- α によるプライミング反応について、fMLPによる再刺激に対するリン酸化酵素の影響が調べられ、その作用がおもにチロシンキナーゼ活性に依存していることが示唆された⁶⁾。しかしながら、TNF- α のプライミングによるNADPH酸化酵素の活性化を増幅するシグナル伝達について、その分子機構は明らかでない。

今回、TNF- α によるプライミング、次いでfMLPの刺激によるシグナルが、どのような経路で伝達され、p47phoxのリン酸化さらにNADPH酸化酵素の活性化に至るのか、その機序について検討したので報告する。

II. 方法

1. 好中球活性化により生成する活性酸素種の測定および阻害剤の影響

fMLP並びにPMA刺激物質により好中球を活性化して、生成する活性酸素を測定した。発光試薬として、8-amino-5-chloro-7-phenylpyrido (3,4-d) pyridazine-1,4 (2H, 3H) dione (L-012 和光純薬) を用い、測定装置はルミネッセンサーPSN (アトー社) で発光強度を測定した。

1) 試薬

L-012は50 mmol/l Tris-HCl緩衝液pH7.5で20 mmol/lに溶解した。Ca²⁺-free KRP緩衝液は常法に従い、0.1 mol/lリン酸緩衝液 (pH7.4) 21容、0.15 mol/l NaCl 100容、0.154 mol/l KCl 4容、0.154 mol/l MgCl₂ 1容の割合で混合し、使用前に調整した。

刺激物質の調整は、PMA、fMLPともにエタノールで10 mmol/lに溶解し、使用時に0.5%エタノールCa²⁺-free KRP緩衝液を用いて、0.2 mmol/l PMA、0.2 mmol/l fMLPを作製した。

阻害剤として、GF109203Xの調整は、0.5%エタノールCa²⁺-free KRP緩衝液で0.25 mmol/lに溶解し、使用時に0.5%エタノールCa²⁺-free KRP緩衝液を用いて、0.5 μ mol/l、5 μ mol/lの溶液を作成した。ゲニステインの調整は、エタノールで1 mmol/lに溶解し、使用時にエタノールを用いて30 μ mol/l、100 μ mol/l溶液とした。PD98059の調整は、エタノールで5 mmol/lに溶解し、使用時にエタノールを用いて、50 μ mol/lを作成した。SB203580の調整は、ジメチルスルホキシドで1 mmol/lに溶解し、使用時にジメチルスルホキシドを用いて、10 μ mol/lの溶液を作製した。

グルコースは精製水に溶解し、1 mol/l溶液を作製した。

発光試薬L-012は、Ca²⁺-free KRP緩衝液で2.5 mmol/lに希釈したものを使用した。

2) 試料

①Mono-Polyを用いたヒト末梢好中球の分離法

プラスチック試験管にモノポリ分離剤3 mlを分注し、ヘパリン採血管に採血した全血3.5 mlを重層した。次いで400 \times g、20分間遠心後、血漿をパスツールピペットで除き、フラクション2 (好中球) を別の試験管に移した。試験管にCa²⁺-free KRP緩衝液5 mlを加えて混和し、400 \times g、5分間遠心後、上清をアスピレータで除いた。次いでCa²⁺-free KRP緩衝液5 mlを加え、400 \times g、5分間遠心した。赤血球が多い場合、次の操作を行った。0.033 mol/l NaCl溶液を5 ml加え混和、30秒後に0.2 7mol/l NaCl溶液を5 ml加え混和し、400 \times g、5分間遠心する。上清を除きCa²⁺-free KRP緩衝液を2.5 ml加え、150 \times g、5分間遠心後、アスピレータで上清を除き、Ca²⁺-free KRP緩衝液を加え、好中球液を作成した。

3) 活性酸素測定方法

①O₂の産生量

試験管にKRP緩衝液210 μl、発光試薬 5 μl、グルコース 5 μl、好中球20 μl (4 × 10⁵) を加え混和後、37℃、3分間インキュベーションし、刺激物質10 μl、KRP緩衝液25 μlを添加して反応を開始し、10分間の積算値、および、経時的変化を測定した。

②プライミング反応

試験管にKRP緩衝液200 μl、TNF-α 10 μl、グルコース 5 μl、好中球20 μl (4 × 10⁵) を加え混和後、37℃、20分間インキュベーションし、発光試薬 5 μl、刺激物質10 μl、KRP緩衝液25 μlを添加して反応を開始し、10分間の積算値、および、経時的変化を測定した。

③阻害反応

試験管にKRP緩衝液190 μl、阻害剤10 μl、グルコース 5 μl、好中球20 μl (4 × 10⁵) を加え混和後、37℃、30分間インキュベーションし、TNF-α 10 μlを加え混和後、37℃、20分間インキュベーションし、発光試薬 5 μl、刺激物質10 μl、KRP緩衝液25 μlを添加して反応を開始し、10分間の積算値、および経時的変化を測定した。

4) 免疫沈降

好中球を阻害剤で前処理を行い、プライミング後のSampleをLysis buffer (50 mmol/l Tris-HCl (pH7.5)、250 mmol/l NaCl、50 mmol/l MgCl₂、10 mmol/l EGTA、1/10容Glycerol、1/100容Triton-X100、1 mmol/l PMSF、1 mmol/l Na₂VO₄、1/100容アプロチニン)で溶解後、トリクロロ酢酸で濃縮したものに、抗p47phox抗体 (ウサギ、コスモバイオ)、抗p38MAPK抗体 (ウサギ、CST)、または抗Erk1/2抗体 (マウス、CST) の各1 μlとProtein Gで免疫沈降した。

5) SDS-PAGE

10%アクリルアミドゲルで、3 × Sample bufferを加えたサンプルを1 wellあたり10 μlアプライし、20 mAの定電流で泳動した。MarkerにはECL DualVue Western Blotting Markers (GEヘルスケア) を5 μlアプライした。

6) ブロッキング

PVDF膜に70 mA定電流で1時間ブロッキングした。

7) 抗体反応

1次抗体であるp47phox (phospho-ser345)

Antibody (コスモバイオ) と、phospho-p38MAPK Antibody (CST) は20,000倍希釈し、室温で1時間反応させた。Phospho-p44/42 MAPK(Erk1/2)Antibody (CST) は2,000倍希釈して、4℃、1昼夜反応させた。p47phoxとp38MAPKのリン酸化にともなうシグナル分子の増減はHRP標識2次抗体 (GEヘルスケア) を200,000倍希釈し、室温で1時間、Erk1/2についてはHRP標識2次抗体 (CST) を20,000倍希釈して、室温、1時間反応させ検出した。

8) 化学発光

ECL Plus Western Blotting Detection System (GEヘルスケア) 試薬キットを用いて、5分間反応させ、Amersham Hyperfilm ECLに10秒間転写後現像した。

Ⅲ. 結果

1. 活性酸素産生に対するゲニステインの影響

チロシンキナーゼ阻害剤であるゲニステインを用いて、活性酸素産生について検討した。ゲニステインで前処理後、TNF-αでプライミング、次いで刺激物質としてfMLPとPMAで好中球を活性化した。Fig. 1に示すとおり、PMA刺激においては活性酸素産生にともなう発光にラグタイムが認められた。しかしながら、総発光量において、t検定 (n=5) による有意差検定では有意差は認められなかった。fMLP刺激では、明らかに発光が低下しO₂の産生量が減少した。

2. 活性酸素産生に対するGF109203Xの影響

次にプロテインキナーゼの系について調べた。

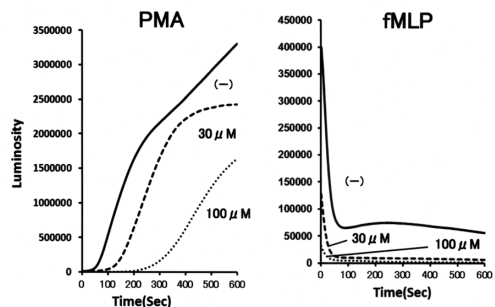


Fig. 1 Effects of genistein on the production of active oxygen.

PMAは直接プロテインキナーゼを活性化しO₂を産生する。そこでプロテインキナーゼの阻害剤であるGF109203Xにより前処理後、O₂産生について検討した。TNF- α プライミング後のPMA刺激ではO₂の産生を阻害した。一方、fMLP刺激はわずかに阻害がみられたが総発光量において、t検定 (n=5) による有意差検定では有意差は認めなかった (Fig. 2)。

3. p47phoxリン酸化に対するゲニステインの影響

チロシンキナーゼ阻害剤であるゲニステインがO₂産生を阻害する結果が得られたので、プライミングのシグナルがチロシンキナーゼを経てNADPH酸化酵素の細胞質成分であるp47phoxのリン酸化に作用するかどうかを検討した。Fig. 3に示すごとくゲニステインによる前処理は、fMLP刺激において濃度依存的にp47phoxのリン酸化を阻害した。一方、PMA刺激では阻害が認められなかった。

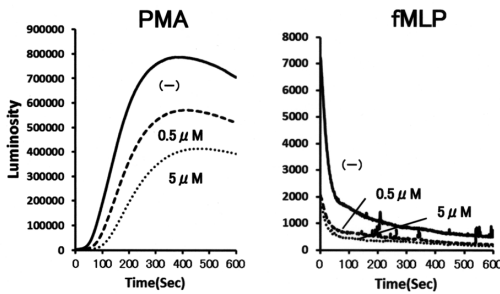


Fig. 2 Effects of GF109203X on the production of active oxygen.

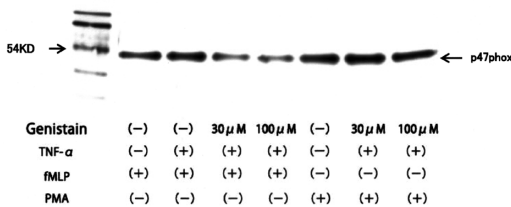


Fig. 3 Effects of Genistain on the phosphorylation of p47phox.

4. P38MAPKリン酸化に対するSB203580の影響

TNF- α によるプライミングのシグナル伝達を確認するため、チロシンキナーゼの下流のシグナルについて検討した。TNF- α によるプライミングはfMLP刺激に反応する結果が得られたので、以下は刺激物質としてfMLPを用いて検討した。p38MAPKの阻害剤であるSB203580で前処理後、TNF- α によるプライミング、次いでfMLP刺激における酵素のリン酸化を調べた。その結果、Fig. 4に示すとおり、p38MAPKのリン酸化を阻害した。

5. Erk1/2リン酸化に対するPD98059の影響

同様にチロシンキナーゼの下流に位置するErk1/2の阻害剤であるPD98059を用いTNF- α によるプライミング反応に対する関与について、Erk1/2のリン酸化を検討した。結果は、リン酸化がわずかに阻害された (Fig. 5)。

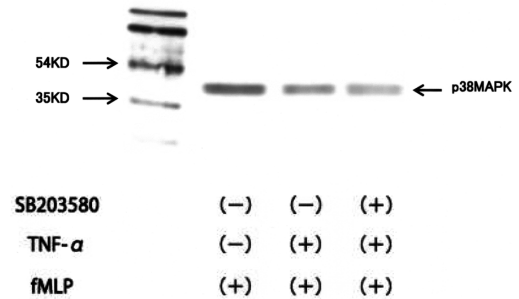


Fig. 4 Effects of SB203580 on the phosphorylation of p38MAPK.

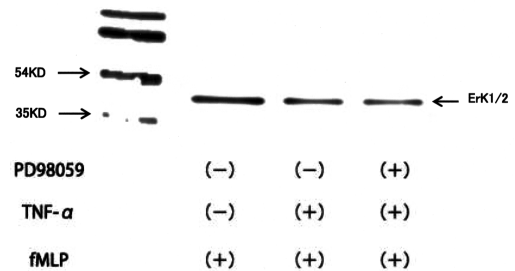


Fig. 5 Effects of PD98059 on the phosphorylation of Erk1/2.

6. 活性酸素産生に対するPD98059及びSB203580の影響

TNF- α によるプライミング、fMLP刺激によるシグナル伝達が、下流に位置するErk1/2、p38MAPKに伝達することが確認されたので、活性酸素産生への影響について検討した。Erk1/2の阻害剤であるPD98059、p38MAPKの阻害剤SB203580を用い、前処理後のプライミングに伴うO₂産生について調べた。結果はFig. 6に示すとおり、両阻害剤によりO₂の産生が阻害された。

IV. 考察

好中球の機能として活性酸素の産生は生体防御機能に重要な役割を果たしている。しかしながら、サイトカイン等によりプライミングされた好中球は過剰な活性酸素を産生し種々の組織障害を生じることが報告されている^{7,8,9,10}。その反応は、直接O₂産生酵素であるNADPH酸化酵素を活性化するシグナル伝達機構に関与する作用と刺激因子との相互作用によると考えられている。

好中球の活性酸素産生は、刺激物質により好中球を活性化するシグナル伝達の過程が異なる。刺激伝達系は主として、チロシンキナーゼとプロテインキナーゼ系のシグナル伝達が知られている。PMAによる刺激では直接、プロテインキナーゼを活性化し、fMLPはチロシンキナーゼを活性化する¹¹。

fMLPは、まず好中球膜上の受容体に結合す

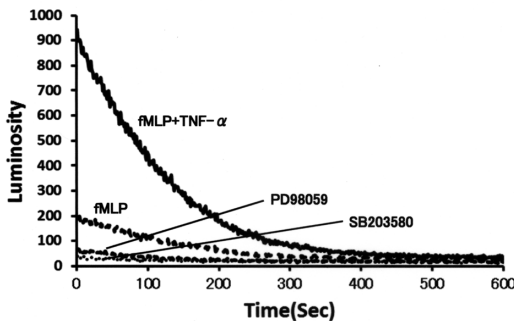


Fig. 6 Effects of PD98059 and SB203580 on the production of active oxygen.

る。この受容体はG蛋白共役型であり、刺激により細胞内情報伝達を開始する。すなわち、細胞膜貫通型の受容体はfMLPなどのリガンドが結合するとチロシンキナーゼを活性化し、リン酸化タンパク質を介してシグナルを伝達する^{12,13,14}。

一方、TNF- α は、O₂産生を増強するプライミング作用を有し¹⁵、この作用はfMLP刺激で増強することが確認されている。しかしながら、活性酸素産生の亢進に至るシグナル伝達機構については、十分に明らかになっていない。

そこで、TNF- α によるプライミング反応が、fMLP刺激による好中球活性化におけるシグナル伝達に作用する機序について、各種阻害剤を用いて研究した。

まず、チロシンキナーゼの阻害剤であるゲニステインで前処理を行い、TNF- α によるプライミング後、fMLP、PMAで刺激した。結果はFig. 1に示すごとくfMLP刺激により、O₂の産生が阻害された。次に、プロテインキナーゼの阻害剤であるGF10923Xによる前処理は、PMA刺激においてO₂の産生が阻害され、fMLP刺激では有意な阻害は認めなかった (Fig. 2)。この現象を確認するため、NADPH酸化酵素の活性化に係る細胞質成分であるp47phoxのリン酸化について検討した。結果は、fMLP刺激ではゲニステインによりp47phoxのリン酸化が、濃度依存的に阻害された。一方、PMA刺激では阻害が認められず、O₂産生と同様の結果が得られた。この点は、Dewasらも¹⁶ゲニステインによる阻害を報告している。これらの結果はTNF- α によるプライミングは、fMLPを介するチロシンキナーゼ系の刺激伝達を活性化することが示唆された。

次にチロシンキナーゼの下流の刺激伝達系について調べた。下流の刺激伝達には、Erk1/2、p38MAPK系が推定されているが、fMLPの下流の刺激伝達は、p38MAPKであり、Erk1/2ではないとする報告^{17,18,19}、あるいは、両刺激系を経て活性化するとの報告がある^{20,21}。

そこで、それぞれの酵素に対する阻害剤を用いてタンパクリン酸化について調べた。まず、p38MAPKの阻害剤であるSB203580による検討では、明らかにリン酸化の阻害が観察された (Fig. 4)。またErk1/2の阻害剤であるPD98059を用いて前処理後、Erk1/2のリン酸化についても、阻害が認められた。しかしながら、このErk1/2に

よる阻害はp38MAPKより弱い阻害を示した。したがって、両酵素のリン酸化の阻害から、TNF- α によるプライミング後のfMLPによる刺激伝達は、それぞれの酵素を経由するが、p38MAPKが主流であることが推測された。このシグナル伝達系を確認するために、両阻害剤を用いて、活性酸素産生について検討した。Fig. 6に示すごとく、それぞれの阻害剤によりO₂産生が減少した。

これらの結果は、TNF- α プライミング後のfMLP刺激によるO₂産生に対するシグナル伝達は、チロシンキナーゼを経て、p38MAPK、ErK1/2系の活性化によりp47phoxがリン酸化される。それにともないp47phoxの構造変化を経て、p47phoxが他の因子と共に膜に移動し、NADPH酸化酵素の活性化によりO₂の産生が亢進することが示唆された。

TNF- α による好中球プライミング反応のシグナル伝達の機序については、刺激伝達系の活性化以外にTNF- α がfMLP受容体の発現を増加させる報告²³⁾、さらに最近、prolyl isomerase pin1がfMLPにより活性化されp47phoxと結合し構造変化を惹起し好中球活性化に至ることが報告²³⁾された。今後、これらの反応とプライミングの関連性について、さらなる検討が必要である。

V. 結語

好中球は刺激因子の作用を受けるとプライミング状態になり、続いて異なる刺激因子により活性酸素の産生が亢進する。このことは生体内で炎症時に普遍的に生じていると考えられ、好中球による生体防御機構を増強する役割を果たしている。また、同時に細胞に対する障害作用を示す。しかしながら、プライミング作用の分子的機序については明らかでない。そこでTNF- α によるプライミング反応とfMLP刺激のシグナル伝達について検討した。プライミング状態の好中球に対するfMLP刺激のシグナル伝達について、チロシンキナーゼの活性化、p38MAPK、Erk1/2の両経路によるp47phoxのリン酸化を確認した。これらのシグナル伝達によりNADPH酸化酵素が活性化され、O₂の産生が亢進することが示唆された。

文献

- 1) Elbim C, Bailly S, Chollet Martin S, Hakim J, Gougerot-Pocidal MA: Differential priming effects of proinflammatory cytokines on human neutrophil oxidative burst in response to bacterial N-formyl peptides. *Infect Immun*, 62: 2195-2201, 1994.
- 2) Elbim C, Chollet Martin S, Bailly S, Hakim J, Gougerot-pocidal MA: Priming of polymorphonuclear neutrophils by tumor necrosis factor alpha in whole blood: identification of two polymorphonuclear neutrophil subpopulation in response to formyl-peptides. *Blood*, 82: 633-640, 1993.
- 3) Downey GP, Fukusima T, Fialkow L, Wadell TK: Intracellular signaling in neutrophil priming and activation. *Semin Cell Biol*, 6: 345-356, 1995.
- 4) Hallett MB, Lloyds DL: Neutrophil priming the cellular signals that say amber but not green. *Immunol Today*, 16: 264-268, 1995.
- 5) 太田安彦, 秋山佳織, 徳永賢治: ミエロペルオキシダーゼに由来する活性酸素による酸化障害. *生物試料分析*, 35: 133-139, 2012
- 6) Utumi T, klostergaard J, Akimaru K, Edashige K, Sato E, Utumi K: Modulation of TNF- α priming and stimulation dependent superoxide generation in human neutrophils by protein kinase inhibitors. *Arch Biochem Biophys*, 294: 271-278, 1992.
- 7) Guice KS, Oldham KT, Remick DG, Kunkel SL, Ward PA: Anti-tumor necrosis factor antibody augments edema formation in caerulein-induced acute pancreatitis. *J Surg Res*, 51: 495-499, 1991.
- 8) Casey LC, Balk RA, Bone RC: Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med*, 119: 771-778, 1993.
- 9) Chollet M, Montravers P, Gibert C, Elibim C, Desmont JM, Fagon JY, Gougerot Pocidal MA: Subpopulation of hyperresponsive polymorphonuclear neutrophils in patients with adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*, 146: 990-996, 1992.
- 10) Linas SI, Whittenburg DP, Parsons PE, Repine JE: Mild renal ischemia activates primed neutrophils to cause acute renal failure. *Kidney Int*, 42: 610-616, 1992.
- 11) Torres M, Hall F, Oneill K: Stimulation of human neutrophils with formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces tyrosine phosphorylation and activation of two distinct mitogen-activated protein-kinases. *J Immunol*, 150: 1563-1578, 1993.
- 12) 安井耕三: 好中球の細胞内情報伝達機構. *信州医誌*, 43(3): 241-252, 1995.

- 13) Rollet E, Caon A C, Roberge C J, Liao N W, Malawista S E, McColl S R, Naccache P H: Tyrosine phosphorylation in activated human neutrophils. *J Immunol*, 153:353-363, 1994.
- 14) Berkow R L, Dodson R W: Tyrosine-Specific protein phosphorylation during activation of human neutrophils. *Blood*, 75(12):2445-2452, 1990.
- 15) Berkow R, Wang D, Larrick J, Dason R W, Howard T H: Enhancement of neutrophil superoxide production by preincubation with recombinant human tumor necrosis factor. *J Immunol*, 139:3783-3791, 1987.
- 16) Dewas C, My-Chan Dag P, Gougerot-pocidallo M A, El-Benna J: TNF- α induces phosphorylation of p47phox in human neutrophils: partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF- α and Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol*, 171: 4392-4398, 2003.
- 17) Dang PM, Stensballe A, Boussetta T, Raad H, Dewas C, Kroviarski Y, Hayem G, Jensen O, El-Benna J: A specific p47phox-serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *J Clin Invest*, 116: 2033-2043, 2006.
- 18) Brown G, Stewart MQ, Bissonnette SA, Elia AE, Wilker E, Yaffe MB: Distinct ligand-dependent roles for p38 MAPK in priming and activation of the neutrophil NADPH oxidase. *J Biol Chem*, 279: 27059-27068, 2004.
- 19) Dang PM, Dewas C, Gaudry M, Fay M, Pedruzzi E, Gougerot-Pocidallo MA, El Benna J: Priming of human neutrophil respiratory burst by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF) involves partial phosphorylation of p47phox. *J Biol Chem*, 274: 20704-20708, 1999.
- 20) Dewas C, Fay M, Gougerot-Pocidallo MA, El Benna J: The mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway is involved in formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced p47phox phosphorylation in human neutrophils. *J Immunol*, 165: 5238-5244, 2000.
- 21) Rane M, Carrithers SL, Artur J, Klein J, Mcleish K: Formyl peptide receptors are coupled to multiple mitogen-activated protein kinase cascades by distinct signal transduction pathways. *J Immunol*, 159: 5070-5078, 1997.
- 22) Wittmann S, Rothe G, Schmitz G, Frohlich D: Cytokinen upregulation of surface antigens correlates to the priming of the neutrophil oxidative burst response. *Cytometry part A*, 57: 53-62, 2004.
- 23) Boussetta T, Gougerot-Pocidslo MA, Hayam G, Ciappelloni S, Raad H, Derkawi RA, Bournier O, Kroviarski Y, Zhou XZ, Malter JS, Lu P, bartegi A, Dang PM, Benna J: The prolyl isomerase pin1 acts as a novel molecular switch for TNF- α induced priming of the NADPH oxidase in human neutrophils. *Blood*, 116: 5795-5802, 2010.