血小板と多核好中球の相互作用による leukotriene B₄ 産生の機序について

金地 研二* 牛首 文隆* 杉山 建生*
千先 茂樹* 大熊 稔* 内野 治人*

Studies on the mechanism of leukotriene B₄ biosynthesis by platelet-polymorphonuclear neutrophil interactions

Kenji KANAJI*, Fumitaka USHIKUBI*, Tateo SUGIYAMA*,
Shigeki SENSAKI*, Minoru OKUMA* and Haruto UCHINO*

Key words: platelet-polymorphonuclear neutrophil interaction, arachidonate metabolism, leukotriene B₄, FMLP, platelet lipoxygenase

We studied the synthesis of 5-lipoxygenase metabolites, especially the mechanism for enhanced leukotriene B₄ (LTB₄) synthesis by the interaction between human platelets and polymorphonuclear neutrophils (PMNN). Washed cell suspensions (3×10^7 PMNN and $0-75 \times 10^7$ platelets per ml) were incubated with arachidonic acid (AA) and formylmethionylleucylphenylalanine (FMLP) in the presence of cytochalasin B, and the synthesis of 5-lipoxygenase products was analysed by the reversed-phase high-performance liquid chromatography.

While incubation of PMNN alone with these stimulants led to the formation of small amounts of the AA metabolites including LTB₄, LTB₄ production was remarkably activated in the presence of platelets, bearing comparison with that obtained by the incubation of PMNN with calcium ionophore A 23187 and AA. The maximal activation of LTB₄ biosynthesis required a definite platelet/PMNN ratio (5-15), FMLP (10 μ M), cytochalasin B (more than 1 μ g/ml) and AA (more than 60 μ M). The maximal LTB₄ synthesis was obtained at 3 to 5-min-incubations and decreased thereafter, while the concentration of 5 S, 12 S-dihydroxyeicosatetraenoic acid (5 S, 12 S-diHETE) reached a steady level at 1 to 3-min-incubations and did not decrease thereafter. Platelet-release products, such as adenine nucleotides, could not substitute platelets themselves for the stimulatory

* 京都大学医学部第一内科 [〒606 京都市左京区聖護院川原町 54], The First Division, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan.

effect. Prolongation of the interval between the addition of AA and that of FMLP to the cell suspension reduced the LTB_4 production. The addition of aspirin to the incubation mixture did not alter the activating effect of platelets. In contrast, lipoxxygenase-deficient platelets from a patient with essential thrombocytopenia scarcely activated LTB_4 biosynthesis.

These findings indicate that a labile AA metabolite produced by platelet lipoxxygenase, possibly 12-hydroperoxyeicosatetraenoic acid, could potentiate LTB_4 biosynthesis in FMLP-stimulated PMNN, and that this platelet-PMNN interaction may play an important role in inflammation and vascular lesions.

緒 言

leukotriene B_4 (LTB_4) は、多核好中球 (PMNN) 等における主要な arachidonic acid (AA) 代謝産物であり、PMNN に対し強い刺激作用を有し、炎症反応などの主要な mediator と考えられている¹⁾。この LTB_4 生成に関与する酵素である 5-lipoxygenase は、その酵素活性発現に Ca^{2+} イオンを要求するため、in vitro における LTB_4 産生を検討する際には、calcium ionophore である A23187 が刺激剤として通常用いられている²⁾。しかし生体内において、いかなる物質が calcium ionophore として作用しているのかについては不明の点が多い。一方、AA 代謝における血小板と PMNN の相互作用が存在することが Marcus らにより報告され³⁾、さらに Maclouf らにより血小板 lipoxxygenase 代謝産物による PMNN の LTB_4 産生刺激作用が報ぜられ⁴⁾、炎症や血管病変における血小板の役割が、 LTB_4 産生の観点からも注目されるようになった。

今日われわれは、formylmethionylleucylphenylalanine (FMLP)・cytochalasin B・AA を刺激とした時の、血小板と PMNN の相互作用による LTB_4 産生について検討を加えた。

I. 材料および方法

1. 血小板・PMNN の分離・洗浄

健康成人から 1/10 量の 3.8% クエン酸ナトリウムを混じて静脈血を採取した。既報^{5,6)} に準じて洗浄血小板・洗浄 PMNN を調製し、それぞれをトリス緩衝液 (TBS; 101 mM NaCl,

50 mM Tris-Cl, 5 mM glucose, 1 mM $CaCl_2$, pH 7.4) に浮遊させた。位相差顕微鏡による鏡検では、血小板浮遊液中への赤血球・白血球の混入は微量であったが、PMNN 浮遊液中へは、100 個の PMNN に対し 10-30 個の血小板の混入を認めた。また PMNN の純度や viability は既報⁶⁾ と同じく良好であった。lipoxxygenase 活性の低下した血小板は、thiobarbituric acid (TBA) 法⁷⁾により血小板 lipoxxygenase 低下症例⁸⁾と確認された本態性血小板血症患者から得た。

2. 反応および反応産物の抽出

3×10^7 個の PMNN と、この 0-25 倍 (0-75 $\times 10^7$ 個) の血小板を混合したものを 37°C に加温し、通常 cytochalasin B (5 μ g/ml) を加え 5 分間反応させたのち、10 μ M FMLP と 60 μ M AA を同時に加えて全体量を 1.0 ml とし、同温度での反応を 5 分間行ない、塩酸によって pH 3.0 とした後、4 倍量の酢酸エチルを加えてそれを終了させた。internal standard として 450 ng の prostaglandin B_2 (PGB_2) を加えた後、既報⁹⁾ のように反応産物の抽出を行ない、有機溶媒を蒸発させた残渣を 30 μ l のメタノールに溶解して、高速液体クロマトグラフィーによる分析に供した。

3. 逆相高速液体クロマトグラフィーによる反応産物の分離・同定・定量

カラムは Nucleosil γ -C₁₈ (4.6 $\times$ 250 mm, Macherey-Nagel, Düren, Germany) を使用。同一の検体を小分けし solvent を変えて 2 回分析した。すなわち、solvent A の組成は、メタノール/水/酢酸 (75 : 25 : 0.01, v/v) であり、これによって 12-hydroxyheptadecatrienoic

Fig. 1 RP-HPLC chromatograms of AA metabolites obtained from incubation of PMNN (3×10^7 cells/ml) with FMLP ($10 \mu\text{M}$), cytochalasin B ($5 \mu\text{g/ml}$) and AA ($60 \mu\text{M}$) in the presence (PMNN + PLT) or absence (PMNN alone) of platelets (45×10^7 cells/ml). Cells were preincubated with cytochalasin B for 5 min at 37°C and incubated with FMLP and AA for another 5 min. Solvent A, methanol/water/acetic acid (75 : 25 : 0.01, v/v); solvent B, tetrahydrofuran/methanol/water/acetic acid (25 : 30 : 45 : 0.1, v/v).

acid (HHT)・12-hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE)・5-hydroxyeicosatetraenoic acid (5-HETE) の分析を行ない⁶⁾, solvent A では分離不可能な LTB_4 と 5S, 12S-dihydroxyeicosatetraenoic acid (5S, 12S-diHETE)⁸⁾⁹⁾ の分析のために, テトラヒドロフラン/メタノール/水/酢酸 (25 : 30 : 45 : 0.1, v/v) からなる solvent B¹⁰⁾を使用した. 流速は solvent A については 1.0 ml/min , solvent B については

0.9 ml/min であり, PGB_2 ・ LTB_4 ・5S, 12S-diHETE は 270 nm , HHT・12-HETE・5-HETE は 235 nm の紫外線の吸光度で測定した. 反応産物の同定は gas chromatography-mass spectrometry⁶⁾ および authentic sample との co-chromatography によって行ない, 定量はピークの面積を PGB_2 の面積に対する比率として arbitrary unit で示した⁶⁾.

4. 試 薬

FMLP (Sigma, USA), cytochalasin B (Sigma, USA) は DMSO に溶解 (2 mg/ml) し, -20°C にて保存, TBS で希釈して使用した (DMSO の終濃度 0.25 %). authentic 5S, 12S-di-HETE は山本尚三教授 (徳島大学) より恵与. その他の試薬は既報⁶⁾の通りである.

II. 結 果

図 1 に示すように, PMNN のみを cytochalasin B の存在下に FMLP と AA で刺激しても LTB_4 の産生量は少ないが, これに血小板を加えることにより LTB_4 の産生量は約 5 倍に増加した. しかし血小板のみを同じ条件で刺激しても HHT と 12-HETE のピークしか検出されず (データ略), この LTB_4 の増加分は血小板によって直接産生されたものではなく, 血小板の存在によって PMNN の AA 代謝が亢進したことによるものと推定され, 以下の検討を行なった.

血小板の添加比率と AA 代謝産物の産生量との関係を見ると, LTB_4 や 5-HETE は血小板の添加比率を上げると共に増加し, 血小板数/PMNN 数=5-15 で最大となり, その後は減少を示した. これに対し, 5S, 12S-diHETE や

Fig. 2 Effects of platelet numbers added on the synthesis of AA metabolites by platelet-PMNN interactions. PMNN suspensions (3×10^7 cells/ml) were incubated as described in Fig. 1 except for the addition of varying numbers of platelets as indicated. ●—●, LTB_4 ; ○—○, 5-HETE; △—△, 5S, 12S-diHETE; ●·····●, HHT; ○·····○, 12-HETE.

HHT・12-HETE は血小板の添加比率に比例して増加した(図 2). このように LTB_4 産生が

Fig. 3 Effects of stimulant concentrations on the synthesis of 5-lipoxygenase products by platelet-PMNN interactions. Cell suspensions containing 3×10^7 PMNN and 45×10^7 platelets per ml were incubated with varying concentrations of FMLP (A), cytochalasin B (B) or AA (C) as indicated in the presence of fixed concentrations of other two stimulants. The concentrations of FMLP, cytochalasin B and AA were 10 μM, 5 μg/ml and 60 μM, respectively. Symbols and other experimental conditions are the same as those in Fig. 2.

Fig. 4 Time-courses for the synthesis of 5-lipoxygenase products by platelet-PMNN interactions. Symbols and experimental conditions are the same as those in Fig. 2 except for the cell suspension containing 3×10^7 PMNN and 45×10^7 platelets per ml and varying incubation time with AA and FMLP as indicated.

最も刺激されるための至適血小板添加比率が存在し、この時の LTB_4 産生量は、同じ PMNN を血小板の添加を行わずに、 $10 \mu M$ A 23187 と $60 \mu M$ AA で刺激した時の LTB_4 産生量に匹敵するものであった（データ略）。

次に血小板数/PMNN 数を 15 にした場合の 5-lipoxygenase 系代謝産物の産生量に対する各刺激物質の濃度の影響を検討した（図 3）。cytochalasin B $5 \mu g/ml$, $60 \mu M$ AA において、 LTB_4 の産生量は FMLP の濃度を上げると共に増加し、 $10 \mu M$ の FMLP にて最大となり（図 3, A）, $10 \mu M$ FMLP, $60 \mu M$ AA のもとでは、 $1-5 \mu g/ml$ の cytochalasin B の濃度において 5-lipoxygenase 系代謝産物の産生量は一定であった（図 3, B）。また cytochalasin B $5 \mu g/ml$, $10 \mu M$ FMLP の条件下で、 LTB_4 産生量は AA 濃度 $0-60 \mu M$ において直線的に増加したが、 $60-120 \mu M$ の AA 濃度においては大きな変化を認めなかった（図 3, C）。

PMNN の 15 倍数の血小板を加えた条件下

Fig. 5 Effects of time intervals between the addition of AA and of FMLP on the synthesis of 5-lipoxygenase products by platelet-PMNN interactions. Cell suspensions containing 3×10^7 PMNN and 45×10^7 platelets per ml in the presence of cytochalasin B ($5 \mu g/ml$) were incubated with $60 \mu M$ AA for varying time intervals as indicated, and then the incubation was continued for further 5 min after the addition of $10 \mu M$ FMLP. Symbols are the same as those in Fig. 2.

で、反応の時間経過をみると、 LTB_4 の量は 3～5 分で、5-HETE の量は 1 分でそれぞれ最大となり、その後は減少した。これに対し、5S, 12S-diHETE は 1～10 分の間で大きな変化を認めなかった（図 4）。

この血小板による LTB_4 産生刺激作用の機序について検討を加えた。第一に、血小板の α 顆粒あるいは濃染顆粒から放出された物質によるものではないかと考え、洗浄血小板 (10^6 個/ μl) を凝集計のセル内で 0.5 単位/ ml の thrombin によって 5 分間凝集させ、その遠心上清を得た。PMNN (3×10^7 個) の浮遊液に、この遠心上清 $0.5 ml$ を加えた反応系と、対照として TBS に同量の thrombin を添加したものを $0.5 ml$ 加えた反応系を作製し、cytochalasin B・FMLP・AA で刺激した時（全体量 $1.0 ml$ ）の AA 代謝産物を測定したが、両者の間に差を認

Fig. 6 Effects of lipoxigenase-deficient platelets on the synthesis of 5-lipoxygenase products by platelet-PMNN interactions. The experimental conditions were the same as those in Fig. 2 except that platelet/PMNN ratios were 5 or 15 and that platelets used were obtained from a patient with platelet lipoxigenase-deficiency (dotted column) or normal subjects (open column, $M \pm SD$, $n=7$).

めず、10-30 μM の ADP あるいは ATP の添加も上記の AA 代謝に全く影響を認めなかった(データ略)。

また PMNN の 15 倍数の血小板を加えた条件において、AA の添加後、一定の間隔 (0~10 分) で FMLP を加えて 5 分間反応させた実験では、LTB₄ の産生量は AA と FMLP を同時に加えた時、すなわち 0 分の間隔時に最大となり、その間隔を延ばると共に減少して 10 分の間隔では、ほとんど検出不能となった。これとほぼ同様の变化を 5-HETE の産生量についても認めたが、5S, 12S-diHETE は 1 分の間隔時に産生量が最大となり、間隔時間の延長と共に減少した(図 5)。このことから血小板における AA の不安定な中間代謝産物が、この刺激効果に関与していることが示唆された。

cytochalasin B の添加 5 分前に 500 μM の aspirin を反応系に加えて、cyclo-oxygenase 系代謝を完全に阻害しても、5-lipoxygenase による AA 代謝産物の産生量に有意な影響を認めなかった(データ略)が、lipoxygenase 活性の低下

した症例の血小板を用いた場合には、正常人血小板を用いた場合に比べて、5-lipoxygenase 系代謝産物の産生刺激効果の明らかな減弱を認めた(図 6)。

III. 考察および結論

合成ホルミル化ペプチドである FMLP は、PMNN 機能の検討に用いられることが多いが、その PMNN 刺激作用に 5-lipoxygenase 系代謝の関与が推定されている⁽¹¹⁾⁽¹²⁾。しかし PMNN を FMLP のみ、あるいは FMLP と cytochalasin B で刺激した場合の LTB₄ 産生量は、A 23187 を刺激した場合に比べ、かなり少ないと報告されており⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾、われわれも preliminary な検討において同様の結果を得た。ところが、PMNN を血小板と共に FMLP・cytochalasin B・AA で適当な条件下に刺激することによって、著明な LTB₄ 産生効果がもたらされることが今回見出された。この効果の発現のためには血小板の存在が不可欠であるが、血小板自体には LTB₄ 産生能は存在しないので、血小板に由来する何らかの因子が FMLP 等と共に PMNN を刺激し、著明な LTB₄ 産生をもたらすものと考えられた。また、この反応系における LTB₄ 産生のための至適条件は、血小板の添加比率が PMNN の 5~15 倍で、FMLP・cytochalasin B・AA の濃度がそれぞれ 10 μM ・1-5 $\mu g/ml$ ・60-120 μM であることが明らかとなり、この至適条件での反応の時間経過は、PMNN を A 23187 のみ、あるいは A 23187 と AA で刺激した場合⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾と大きな差を認めなかった。

この血小板による LTB₄ 産生刺激作用の機序が興味のあるところであるが、Ochi ら⁽¹⁶⁾によりモルモットの多核白血球から分離された 5-lipoxygenase の酵素活性が ATP によって亢進することが報告されており、われわれの反応系においても血小板から放出された ATP や ADP が PMNN の 5-lipoxygenase を活性化しているのではないかと考えられた。しかし、thrombin で凝集させた洗浄血小板浮遊液の遠心上清や ATP または ADP を反応系に直接加えても何ら刺激効果を認めず、ATP・ADP を含めた

血小板の放出物質の関与については、われわれの実験条件では否定的であった。ところで、この反応系における PMNN の AA 代謝活性化のためには、一定数の血小板と一定濃度の AA を加える必要があるわけだが、このことは、加えた AA が単に PMNN における 5-lipoxygenase の基質として作用するだけでなく、血小板によって代謝された AA の代謝産物が PMNN の LTB₄ 産生を刺激した可能性を考えさせるものである。さらに AA を加えてから FMLP を加えるまでの時間（間隔）をあけることによって LTB₄ 産生量の低下をみたことから、この AA 代謝産物が不安定なものと考えられ、また、aspirin によって阻害されないことから cyclo-oxygenase 系の代謝産物ではないことが示された。ところが、lipoxygenase 低下症例の血小板による LTB₄ 産生刺激効果は減弱しており、われわれの検討においても Maclouf ら⁴⁾がわれわれと異なる実験系を用いて報告したように、LTB₄ 産生が血小板 lipoxygenase 系の不安定な代謝産物（特に 12-hydroperoxy-eicosatetraenoic acid）によって刺激されている可能性が強く示唆された。

血小板 lipoxygenase 系の主要な代謝産物である 12-HETE に顆粒球に対する chemotactic な作用があること¹⁷⁾は知られているが、今回の検討により、FMLP で刺激された PMNN の LTB₄ 産生を血小板が刺激し、しかもその作用に血小板 lipoxygenase 系代謝の関与していることが示された。これは Redl ら¹⁸⁾の報告した FMLP による顆粒球凝集反応に対する血小板の増強効果を説明し得る可能性があり、PMNN の機能発現においても血小板の lipoxygenase 系代謝が重要な役割を果たしていることが示唆された。

本研究の一部は財団法人三共生命科学研究振興財団および文部省科学研究費補助金（60570556）の助成を受けた。

文 献

- 1) Samuelsson, B.: Leukotrienes: Mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science*, **220**; 568~575, 1983.
- 2) Borgeat, P. and Samuelsson, B.: Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: Effects of ionophore A23187. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**; 2148~2152, 1979.
- 3) Marcus, A.J., Broekman, M.J., Safier, L.B., Ullman, H.L., Islam, N., Serhan, C.N., Rutherford, L.E., Korchak, H.M. and Weissmann, G.: Formation of leukotrienes and other hydroxy acids during platelet-neutrophil interactions in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **109**; 130~137, 1982.
- 4) Maclouf, J., Fruteau de Lactos, B. and Borgeat, P.: Stimulation of leukotriene biosynthesis in human blood leukocytes by platelet-derived 12-hydroperoxyeicosatetraenoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**; 6042~6046, 1982.
- 5) Okuma, M. and Uchino, H.: Altered arachidonate metabolism by platelets in patients with myeloproliferative disorders. *Blood*, **54**; 1258~1271, 1979.
- 6) Takayama, H., Okuma, M., Kanaji, K., Sugiyama, T., Sensaki, S. and Uchino, H.: Altered arachidonate metabolism by leukocytes and platelets in myeloproliferative disorders. *Prostaglandins Leukotrienes Med.*, **12**; 261~272, 1983.
- 7) Takayama, H., Okuma, M. and Uchino, H.: A simple method for estimation of lipoxygenase and cyclo-oxygenase pathways in human platelets - the use of thiobarbituric acid reaction. *Thromb. Haemostas.*, **44**; 111~114, 1980.
- 8) Borgeat, P., Picard, S., Vallerand, P. and Sirois, P.: Transformation of arachidonic acid in leukocytes. Isolation and structural analysis of a novel dihydroxy derivative. *Prostaglandins Med.*, **6**; 557~570, 1981.
- 9) Borgeat, P., Fruteau de Lactos, B., Picard, S., Crapeau, J., Vallerand, P. and Corey, E. J.: Studies on the mechanism of formation of the 5S, 12S-dihydroxy-6, 8, 10, 14 (E, Z, E, Z)-eicosatetraenoic acid in leukocytes. *Prostaglandins*, **23**; 713~724, 1982.
- 10) Verhagen, J., Walstra, P., Veldink, G.A. and Vliegthart, J.F.G.: Separation and qu-

- antitation of leukotrienes by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Prostaglandins Leukotrienes Med., **13**; 15~20, 1984.
- 11) Malmsten, C.L., Palmblad, J., Udén, A.-M., Rådmark, O., Engstedt, L. and Samuelsson, B.: Leukotriene B₄: A highly potent and stereospecific factor stimulating migration of polymorphonuclear leukocytes. Acta Physiol. Scand., **110**; 449~451, 1980.
 - 12) Bokoch, G.M. and Reed, P.W.: Inhibition of the neutrophil oxidative response to a chemotactic peptide by inhibitors of arachidonic acid oxygenation. Biochem. Biophys. Res. Commun., **90**; 481~487, 1979.
 - 13) Ham, E.A., Soderman, D.D., Zanetti, M.E., Dougherty, H.W., McCauley, E. and Kuehl, F.A., Jr.: Inhibition by prostaglandins of leukotriene B₄ release from activated neutrophils. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **80**; 4349~4353, 1983.
 - 14) Sun, F.F. and McGuire J.C.: Metabolism of arachidonic acid by human neutrophils: Characterization of the enzymatic reactions that lead to the synthesis of leukotriene B₄. Biochim. Biophys. Acta, **794**; 56~64, 1984.
 - 15) Powell, W.S.: Properties of leukotriene B₄ 20-hydroxylase from polymorphonuclear leukocytes. J. Biol. Chem., **259**; 3082~3089, 1984.
 - 16) Ochi, K., Yoshimoto, T., Yamamoto, S., Taniguchi, K. and Miyamoto, T.: Arachidonate 5-lipoxygenase of guinea pig peritoneal polymorphonuclear leukocytes. J. Biol. Chem., **258**; 5754~5758, 1983.
 - 17) Turner, S.R., Tainer, J.A. and Lynn, W.S.: Biogenesis of chemotactic molecules by the arachidonate lipoxygenase system of platelets. Nature, **257**; 680~681, 1975.
 - 18) Redl, H., Hammerschmidt, D.E. and Schlag, G.: Augmentation by platelets of granulocyte aggregation in response to chemotaxins: Studies utilizing an improved cell preparation technique. Blood, **61**; 125~131, 1983.

●自分で実際にやれる手術書！

植田小児外科

大阪市立保健センター外科 植田 隆著

B 5 判 364頁 図207 表18 定価9,800円(〒350円)

☎101 東京都千代田区神田多町2-11

科学評論社

振替口座東京 7-102026
電話 03-252-7768