ヒト末梢血単球 IL-1 β 遊離に及ぼす Ca 拮抗薬の影響

瀬川美秀・武政俊彦・続池直樹・栗本 忠・田頭栄治郎*¹⁾

The effect of Ca-antagonists on the release of IL-1 β by human peripheral blood monocytes

The effects of Ca-antagonists on the release of IL-1 β by LPS stimulated human blood monocytes (HBMs) were examined by radioimmunoassay. Ca-antagonists used were nicardipine, nifedipine, nimodipine, flunarizine, verapamil and diltiazem. Flunarizine strongly inhibited the IL-1 β release from HBMs by LPS with an IC₅₀ of 25.9 μ M. Diltiazem and verapamil inhibited at the higher concentration (IC₅₀ > 160 μ M), but the other Ca-antagonists, dihydropyridine type, such as nicardipine, nifedipine and nimodipine did not affect the IL-1 β release from HBMs. In order to investigate the mechanism of IL-1 β inhibition of flunarizine, forskolin was used. Forskolin was 2 fold potentiated the IL-1 β release from HBMs stimulated by LPS. Flunarizine pretreatment with dose of IC₅₀ completely inhibited IL-1 β release from HBMs increased by forskolin.

Taken together, these results suggest that the mechanism of the inhibition of IL-1 β release from HBMs by flunarizine may be closely related to cyclic AMP.

Yoshihide Segawa・Toshihiko Takemasa・
Naoki Tszuikie・Tadashi Kurimoto・
Eijiro Tagashira*

**key word: IL-1 β release, Ca-antagonists,
cyclic nucleotides, forskolin**

最近、単球あるいは種々の組織より遊離されるサイトカインが多様な生物活性を示すことが明らかとなってきた¹⁾。そのなかでも IL-1 は、慢性関節リウマチなどの組織破壊性疾患に主役をなし、関節滑膜細胞でのコラゲナーゼや PGE₂ の産生を介して骨破壊に対して促進的に作用する。またさらに、IL-1 は骨芽細胞を刺激して、その二次情報が破骨細胞を活性化させることにより、骨吸収を起こすことなども報告^{2,3)}されている。

一方、IL-1 の産生には、Ca⁺⁺、カルモデュリン、プロテインキナーゼ、および cAMP などの細胞内反応が関与していること^{4,5)}から、これらの阻害は、IL-1 の関与によって引き起こされると考えられている疾患の改善をもたらすことが予

想される。

特に、細胞内外の Ca⁺⁺ を阻害する Ca 拮抗薬の IL-1 遊離に対する作用については興味深い。

今回、筆者らは、ヒト末梢血単球を lipopoly-saccharide (LPS) で刺激し、細胞外に遊離される IL-1 β 量に対する Ca 拮抗薬の作用を、Ca 関連試薬 TMB-8 および cAMP 関連試薬 forskolin を用い検討したので報告する。

材料と方法

(1) ヒト末梢血単球の分離

健常人ボランティアの末梢よりヘパリン(30 U/ml)加採血後、monopoly resolving medium (M-PRM, Flow laboratories)に重層し、850 g, 20°C で30分間遠心して、単核球画分を得た。得られた単核球画分を RPMI 1640 (Flow laboratories)にて2回洗浄後、10%ウシ血清(FBS, Flow laboratories)および Penicillin(10 IU/ml)-streptomycin (10 μ g/ml)を含む RPMI 1640 で 2×10^6 個/ml となるように調製し、94 mm 径の組織培養ディッシュにて60分間 37°C 5% CO₂ インキュベーター内で培養後単球を付着させた。

非付着細胞は、RPMI 1640 で数回洗浄ののち除去し、培養ディッシュに付着した細胞のみをスクレイパーで集め、10⁵個/ml となるよう再度調製後、以下の実験に用いた。

なお、ギムザ染色による形態学的検討により得られた単球の純度は90%以上であった。

(2) IL-1 β 遊離量の測定

ヒト末梢血単球からの IL-1 β 遊離には、刺激剤として LPS (1 μ g : E.coli 055 : B5, フナコシ薬品)を用いた。LPS を単球(10⁵個/ml)に加え、37°C の 5% CO₂ インキュベーター内で16時間培養後、上清に遊離された IL-1 β 量を radioimmunoassay 法(interleukin 1 β [¹²⁵I] assay system, Amersham)により RIA キットで測定した。なお、本 RIA キットは、IL-1 β に対して特異性が高く、38~7,000 pg/ml までを再現性よく検出できる。

* Department of pharmacology Central Research Laboratories, Zeria Pharmaceutical Co., Ltd.
ゼリア新薬工業株式会社中央研究所薬理研究部

図1 Time course of IL-1 β release from human monocytes by 1 μ g/ml lipopolysaccharide (n=3)

(3) 使用薬物

Ca 拮抗薬は, verapamil, diltiazem, flunarizine, nicardipine, nifedipine(以上 Sigma)および nimodipine(自社合成品)を, また Ca 関連薬物として TMB-8(3, 4, 5-trimethoxybenzoic acid 8-(diethyl-amino) octyl ester, Sigma)を用いた.

また, cyclic AMP および GMP の IL-1 β 遊離に対する影響を調べるため, dibutyryl cyclic AMP (Db-cAMP), dibutyryl cyclic GMP (Db-cGMP), forskolin, および isobutyl methylxanthine (IBMX)をそれぞれ用いた.

陽性対照薬としては, dexamethasone (Sigma)を用い, おおのこの薬物は生理食塩水あるいは DMSO に溶解し, すべて刺激剤と同時に加え16時間インキュベーションした. 細胞の生存率は, 常法に従いトリパンブルーで染色を行い調べた.

(4) IC₅₀ の算出

IL-1 β 遊離量を抑制した薬物については, その抑制率から最小二乗法により IC₅₀ 値を求めた.

結 果

(1) IL-1 β 遊離における経時変化

LPS (1 μ g) 刺激による単球からの IL-1 β 遊離量における経時変化を図1に示した. LPS 刺激後, IL-1 遊離量の増加は培養の2時間目よりみられ, 16時間後に最大値(1,500 pg/ml: 刺激前の約20倍)を示し, その後時間を追うに従い減少がみられ, 48時間目では 1,000 pg/ml の値であった.

(2) IL-1 β 遊離量に対する Ca 拮抗薬の影響

IL-1 β 遊離量に対する Ca 拮抗薬の影響を図2にまたそれぞれの IC₅₀ 値を表1に示した. こ

図2 Dose-dependent inhibition of IL-1 β release by Ca antagonists in the presence of 1 μ g/ml LPS, verapamil (●), diltiazem (▲), flunarizine (■), nicardipine (○), nifedipine (△) and nimodipine (□)
Human monocytes were incubated with different concentrations of Ca antagonists for 16 hr at 37°C.

表1 Inhibitory effects of Ca antagonists on IL-1 β release and comparison of IC₅₀

compounds	IC ₅₀ (μ M)
Ca antagonists	
verapamil	222.6
diltiazem	162.2
flunarizine	25.9
nicardipine	>100
nifedipine	>100
nimodipine	>100
TMB-8	126.0
steroid	
dexamethasone	0.2

こで用いた Ca 拮抗薬のなかで flunarizine, verapamil および diltiazem は, IL-1 β 遊離量を濃度依存的に抑制した.

しかし, nicardipine, nifedipine および nimodipine では, IL-1 β 遊離量にほとんど影響を及ぼさなかった. すなわち, 表1にみられるように, LPS 刺激で遊離される IL-1 β 量を flunarizine は IC₅₀ 値 25.9 μ M で, また verapamil および diltiazem は, それぞれ222.6および 162.2 μ M の高濃度で抑制を示した. 一方, TMB-8 も高濃度ではあるが, IL-1 β 遊離量を濃度依存的に抑制し IC₅₀ 値は 126 μ M であった.

また, 陽性対照薬 dexamethasone においては, IL-1 β 遊離量を非常に強く抑制し, IC₅₀ 値は0.2

図3 Potency ratios of IL-1 β release by LPS in the presence of forskolin. Forskolin, db-cAMP (100 μ M) and IBMX (100 μ M) were added to the culture with 1 μ g/ml LPS. Values of IL-1 β release by LPS alone are expressed as 1.0, mean $\pm$ SE (n=4).

図4 Effect of flunarizine (25.9 μ M) on IL-1 β release by LPS in the presence of forskolin (50 μ M). Culture were harvested after 16 hr of incubation. Values of IL-1 β release by LPS alone are expressed as 1.0, mean $\pm$ SE (n=4).

μ Mであった。なお、IL-1 β 遊離量の抑制を示したCa拮抗薬の濃度では、細胞の生存率になんら影響を及ぼさなかった。

(3) IL-1 β 遊離量に対するcAMPおよびcGMPの影響

細胞内cAMP濃度上昇に伴うIL-1 β 遊離量に対する影響を、forskolin, Db-cAMP, およびIBMXを用いて検討した。図3にみられるように、forskolin (50 μ M), Db-cAMP (100 μ M)およびIBMX (100 μ M)の存在下LPS刺激により、いずれも刺激剤単独に対してよりそれぞれ約2.0, 1.5, および1.5倍のIL-1 β 遊離量の増加が認められた。また、forskolin (5~50 μ M)の処理にお

いては、IL-1 β 遊離量を濃度依存的に増加させた(図3)が、Db-cAMPおよびIBMXには用量相関性はみられなかった。

一方、Db-cGMP (100 μ M)は、IL-1 β 遊離に対してなんら影響を与えなかった。

(4) forskolin存在下IL-1 β 遊離量に対するflunarizineの影響

forskolinのIL-1 β 遊離量増加に及ぼすflunarizineの影響を図4に示した。

flunarizine 25.9 μ Mは、forskolin存在下LPS刺激で増加したIL-1 β 遊離量を顕著に抑制した。また、対照薬として用いたdexamethasone 0.2 μ Mにも同様な傾向が認められた。

考 察

今回筆者らは、LPS刺激下单球より遊離されるIL-1 β 量に対するCa拮抗薬nicardipine, nifedipine, nimodipine, flunarizine, verapamilおよびdiltiazemの影響をCa関連試薬TMB-8と合わせて検討した。

ヒト末梢血単球を1 μ g/ml LPSで薬物ともに16時間培養した場合、flunarizine, verapamil, diltiazem, およびTMB-8は、用量依存的にIL-1遊離量を抑制し、それぞれの強さはIC₅₀値からflunarizine>TMB-8>diltiazem>verapamilの順であった。しかし、Ca拮抗薬を用いた今回の実験結果より、IL-1 β 遊離を抑制した薬物の濃度がflunarizineを除き100 μ M以上であること、また、比較的強いCaチャンネル阻害薬として知られているdihydropyridine typeには、IL-1 β 遊離の阻害を示さないことより、LPS刺激下における単球のIL-1 β の遊離にはCaチャンネルを介したCa²⁺の関与が少ないものと考えられる。

最近、Caイオノフォア-A 23187の刺激により増強されたIL-1産生遊離がEGTAにより抑制され、IL-1の遊離にCa²⁺が関与するという報告⁶⁾とNewtonら⁷⁾のCa²⁺は関与しないという報告があるが、筆者らのCa拮抗薬を用いた実験から、Ca²⁺のIL-1 β 遊離に対する役割は、それほど主要なものではないと思える。

一方、Ca²⁺とならんで細胞機能の発現に重要であるcyclic nucleotideのIL-1 β 遊離に対する影響について、細胞内cAMP濃度を上昇させるといわれているDb-cAMPおよびIBMXなど

を用いて検討した結果、IL-1 β 遊離量をそれぞれ 1.5 倍ずつ増加させ Kassis らの報告⁸⁾と一致した。

また、このことは同じく細胞内 cAMP 濃度を上昇させることが知られている forskolin を処置すると、IL-1 β 遊離量が濃度依存的に増加することから、細胞内 cAMP と IL-1 遊離との関連を示唆するものとして興味深い。

そこで LPS 刺激における IL-1 β 遊離を比較的強く抑制した Ca 拮抗薬 flunarizine における forskolin の IL-1 β 遊離増強に対する影響について検討した。50 μ M forskolin 存在下 LPS 刺激により増加した IL-1 β 遊離量は、flunarizine 25.9 μ M, dexamethasone 0.2 μ M において顕著に抑制された。

Hui ら⁹⁾は、Ca 拮抗薬 nifedipine や nifedipine におけるリンパ球内 cyclic AMP 濃度に対し検討を加え、おのおの 100 μ M 単独では影響を及ぼさないが、nifedipine は isoproterenol 刺激による細胞内 cyclic AMP レベルに対しては 1 μ M で顕著な上昇を、また 10 μ M では軽度の抑制を示すことを報告している。このことから、刺激剤は異なるものの今回の実験で得られた flunarizine の結果は、nifedipine や nicadipine の cAMP に対する作用とは異なるものと考えられる。

一方、flunarizine は、赤血球変形を濃度依存的に抑制し、これらの作用は他の Ca 拮抗薬ではみられないことから、従来の典型的な Ca 拮抗薬とは性質が異なる可能性がある¹⁰⁾といわれており、今回の実験でみられたように flunarizine のみが比較的強く LPS 刺激による単球 IL-1 β 遊離を抑制したことは、上記同様、細胞の種類は異なるものの、単球の膜に対して flunarizine がなんらかの作用を示していることが推察される。

現在多くの IL-1 産生遊離阻害薬が開発され¹¹⁾、また、既存の薬剤においてもこれらの阻害作用のあることが確認されてきており¹²⁾、cyclooxygenase を阻害する indomethacin, ibuprofen および benoxaprofen などの抗炎症薬はこのような作用がないこと⁵また、5-lypoxygenase を阻害することが知られている nordihydroguaiaretic acid (NDGA) や cyclooxygenase/lypoxygenase の阻害剤 BW-755 C が IL-1 産生遊離を抑制することが報告されている¹³⁾ことなどから、今後、flunarizine の IL-1 β 遊離阻害機構について、細胞内情報伝達物質

とともに lipoxygenase を含む膜脂質との関連についてさらに解明しなければならない問題であると思われる。

結 語

① Ca 拮抗薬 flunarizine は、LPS 刺激によるヒト単球 IL-1 β 遊離量を IC₅₀ 25.9 μ M で抑制した。他の Ca 拮抗薬 verapamil および diltiazem においても比較的高濃度ではあるが、抑制は認められるもの dihydropyridine type の Ca 拮抗薬ではほとんど抑制がみられなかった。

② Ca 拮抗薬 flunarizine の IL-1 β 遊離抑制機序を調べるため、細胞内 Ca²⁺ および cyclic nucleotides 関連試薬を用いた検討により flunarizine の IL-1 β 遊離阻害の機序のひとつとして細胞内 cAMP 濃度上昇の抑制が考えられた。

文 献

- 1) Oppenheim, J.J., Gery, I.: Interleukin 1 is more than an interleukin. *Immunol. Today*. 3: 113, 1982.
- 2) Krakauer, Y., Oppenheim, J.J., Jasin, H.E.: Human interleukin-1 mediates cartilage matrix degradation. *Cell immunol.* 91: 92-99, 1985.
- 3) Dewhirst, F.E.: Purification and partial characterization of human osteoclast-activating factor; identity with interleukin-1 β . *J. Immunol.* 135: 2562-2568, 1985.
- 4) Taniguchi, H., Sakano, T., Hamasaki, T., Kashiwa, H., Ueda, K.: Effect of protein kinase C inhibitor (H-7) and calmodulin antagonist (W-7) on pertussis toxin-induced IL-1 production by human adherent monocytes. Comparison with lipopolysaccharide as a stimulator of IL-1 production. *Immunology* 67: 210-215, 1989.
- 5) Symons, J.A., McDowell, T.L., di Giovine, F.S., Wood, N.C., Capper, S.J., Duff, G.W.: Interleukin-1 in rheumatoid arthritis potentiation of immune responses with the joint. *Lymphokine research* 8: 365-371, 1989.
- 6) Matsushima, K., Oppenheim, J.J.: Calcium ionophore (A 23187) increase interleukin-1 (IL-1) production by human peripheral blood monocytes and interacts synergistically with IL-1 to augment concanavalin A stimulated thymocyte proliferation. *Cellular immunology* 90: 226-233, 1985.
- 7) Newton, R.C.: Lack of central role for calcium in the induction and release of human interleukin-1. *BBRC* 147: 1027-1033, 1987.
- 8) Kassis, S., Lee, J.C., Hanna, N.: Effect of prostaglandins and cAMP levels on monocyte

- IL-1 production. Agents and Actions 27: 274-276, 1989.
- 9) Ka, Kit, Hui., Jun, Liang, Yu.: The effects of calcium channel blockers on isoproterenol induced cyclic adenosine 3,5-monophosphate generation in intact human lymphocytes. Life Sciences 42: 2037-2045, 1988.
 - 10) 唐沢 啓, 久保和博, 山田耕二, 周藤勝一, 中溝喜博, 落合恵子, 高山健一郎: イオノフォア A 23187 によるヒト赤血球の形態変化と flunarizine によるその変形阻止作用について. 基礎と臨床 16: 142-147, 1982.
 - 11) Shirota, H., Goto, M., Hashida, R., Yamatsu, I., Katayama, K.: Inhibitory effects of E-5110 on interleukin-1 generation from human monocytes. Agents and Actions 27: 322-324, 1989.
 - 12) 和田哲也, 神宮故男, 江崎一子, 延永 正: 単球・単核球の IL-1 および TNF 産生に対する寛解導入剤の影響. 炎症 10: 139-140, 1990.
 - 13) Lee, J.C., Griswold, D.E., Votta, Bartholomeu, V., Hanna, N.: Inhibition of monocyte IL-1 production by the anti-inflammatory compound, SK & F 86002. Int. J. Immunopharm. 10: 835-843, 1988.

*

*

*