インターフェロン- γ による好中球スーパー オキサイド産生の増強とその作用機序

堀 滋・桜田重世・南雲正男*

Enhancement of superoxide production by interferon- γ on human neutrophils

Superoxide production of human neutrophils was enhanced within 10 min by the treatment of interferon- γ , when phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA) was used as a stimulant. The enhancement of superoxide production by interferon- γ occurred only under the presence of calcium, and that it was inhibited by 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine(H-7), an inhibitor of protein kinase-C and 8-(N,N-diethylamino)-octyl-(3,4,5-trimethoxy) benzoate hydrochloride(TMB-8), an intracellular calcium antagonist. Quin 2(acetoxy-methylester) fluorescent revealed that intracellular calcium arose immediately after the addition of interferon- γ .

These data suggest that the enhancement of superoxide production by interferon- γ is closely related to protein kinase-C activation followed by the arising of intracellular calcium.

Shigeru Hori・Shigeyo Sakurada・Masao Nagumo*

key words : interferon- γ , superoxide, neutrophil, cytoplasmic calcium

サイトカインは、多彩な生物活性を示し、免疫のみならず、炎症の場においても重要なメディエーターとして働き、生体防御に深いかかわりを持っていると考えられている。特にインターフェロン- γ (IFN- γ)は、免疫的刺激によりリンパ球から産生され、免疫系における調節因子としての役割が注目されている¹⁾。その最終的な抗癌、抗ウイルス作用が、活性酸素産生の誘導にあるのではないとも考えられており²⁾、近年、好中球、単球の活性酸素産生の調節因子としての作用が報告されている。

たとえば、IFN- γ が好中球を介した抗体依存性細胞障害作用を増強すること³⁾、およびルンゲン依存性化学発光を増強することが報告されている⁴⁾。また、*in vivo* においても IFN- γ の投与により単球の H_2O_2 産生が増強されるとの報告もあ

り⁵⁾、IFN- γ の効果発現における活性酸素の関与が強く示唆されている。

そこで本研究では、IFN- γ が好中球活性酸素産生に及ぼす影響について superoxide radical (O_2^-) の産生を指標として検討し、また、インターロイキン-1 α (IL-1 α)、インターロイキン-1 β (IL-1 β) およびインターロイキン-2(IL-2)の効果についても若干の検討を行ったので報告する。

材料と方法

(1) サイトカイン

ヒトリコンビナント IFN- γ 、IL-2 は塩野義製薬より供与されたものを、IL-1 α 、IL-1 β は大塚製薬より供与されたものを、所定濃度に調製して使用した。

(2) 好中球の分離

健康人末梢血より Ficoll-Conray 比重遠沈法により分離し、混在する赤血球を低張溶血により除去したのち、Hanks' balanced salt solution(HBSS)にて 5×10^6 /ml の好中球浮遊液とした。なお、好中球の viability が98%以上であることを trypan blue 染色によって確認して実験に用いた。

(3) superoxide radical(O_2^-)産生の測定

5×10^6 /ml の好中球浮遊液 50μ l にそれぞれ所定の終濃度の IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IFN- γ を加え、37°C にて10分間 preincubation した。その後 stimulant として終濃度 10 ng/ml の phorbol myristate acetate(PMA)または終濃度 5 mg/ml の opsonized zymosan(OPZ)を加えて10分間反応させ、そのときの O_2^- 産生を cytochrome c 還元法⁶⁾により測定した。なお、結果はそれぞれのサイトカインを preincubation したときの O_2^- 産生量を stimulant のみによる O_2^- 産生量に対する比率(%)で評価した。

(4) PMA 刺激時の細胞外 Ca^{2+} の影響

PMA 刺激時の好中球細胞外 Ca^{2+} を EGTA 1 mM により除去したとき、あるいは Ca^{2+} 濃度

* The Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Showa University 昭和大学歯学部第二口腔外科学教室

を 0.1 mM および 1 mM にしたときの PMA 刺激による O_2^- 産生量を IFN- γ 存在下, および非存在下で比較した。

(5) PMA 刺激時の各種阻害剤の影響

PMA 刺激による O_2^- 産生系において, protein kinase-C (PK-C) の阻害剤である H-7[1-(5-isoquinoline-sulfonyl)-2-methyl piperazine, Sigma] 0.1 mM, または細胞内 Ca^{2+} の阻害剤である TMB-8 [8-(N, N-diethylamino)-octyl-(3, 4, 5-trimethoxy) benzoate hydrochloride, Sigma] 0.1 mM を加えた際の O_2^- 産生量を検討した。

(6) 好中球細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度($[Ca^{2+}]_i$)の変化

好中球に 250 U/ml の IFN- γ を作用させたときの $[Ca^{2+}]_i$ を, Quin II-AM(quin 2 acetoxymethyl ester, Sigma)を用い, 励起波長 339 nm, 蛍光波長 492 nm にて蛍光分光光度計により測定した⁷⁾。

結 果

(1) IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β および IL-2 の好中球 O_2^- 産生に及ぼす影響

1~250 unit/ml の濃度の IL-1 α は, PMA 刺激による O_2^- 産生には影響を与えなかった。しかし, OPZ 刺激では 10 unit/ml 以上の濃度で O_2^- 産生を濃度依存性に増強した。なお, IL-2 α のみでは O_2^- 産生は認められなかった(図 1a)。

IL-1 β では, IL-1 α とほぼ同等の結果で, PMA 刺激では影響は認められず, OPZ 刺激時 10 unit/ml 以上の濃度においてわずかな増強効果が認められた。また, IL-1 β のみでは O_2^- 産生は認められなかった(図 1b)。

1~250 unit/ml の濃度の IL-2 では, PMA, OPZ いずれの刺激においても O_2^- 産生に影響は認められず, また IL-2 単独では O_2^- 産生は認められなかった(図 1c)。

一方, 1~250 unit/ml の濃度の IFN- γ は, PMA, OPZ いずれの刺激による O_2^- 産生も濃度依存性に増強した。250 unit/ml の IFN- γ を加えた際には, control に比較して PMA 刺激で 260%, OPZ 刺激では 180% の O_2^- 産生増強が認められ, 以上 4 種のサイトカイン中もっとも大きな増強効果が認められた。IFN- γ のみでは O_2^- の産生は認められなかった(図 1d)。

図 1 好中球 O_2^- 産生における IL-1 α , IL-1 β , IL-2 および IFN- γ の効果

好中球を IL-1 α , IL-1 β , IL-2 および IFN- γ で 10 分間 preincubation したのち, PMA (10 ng/ml, ●—●) あるいは OPZ (5 mg/ml, ○—○) を添加し, O_2^- の産生を測定した。縦軸は, サイトカイン添加しない control を 100% として表現した。

(2) PMA 刺激時の IFN- γ による O_2^- 産生増強効果における細胞外 Ca^{2+} の影響

Ca^{2+} free の medium 中では, IFN- γ による O_2^- 産生増強効果は認められなかった。しかし, Ca^{2+} を 0.1 mM あるいは 1 mM 加えたものでは, 著明な増強効果が認められた。なお, この 2 種の Ca^{2+} 濃度では増強効果に差は認められなかった(図 2)。

(3) PMA 刺激時の IFN- γ による O_2^- 産生増強効果における各種阻害剤の影響

IFN- γ と好中球との preincubation 前に Ca^{2+} 依存性の PK-C の阻害剤である H-7 を加えたところ, O_2^- 産生はほぼ完全に阻害された。また, 細胞内 Ca^{2+} の阻害剤である TMB-8 によっても同様に O_2^- 産生は完全に阻害された(表 1)。

図2 IFN- γ の好中球活性酸素産生増強効果における Ca^{2+} の影響

好中球に PMA のみ、あるいは PMA と IFN- γ を添加し、IFN- γ の O_2^- 産生増強効果における Ca^{2+} の効果について検討した。

(4) 好中球に IFN- γ を作用させたときの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化

好中球に IFN- γ を加えたときの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は、IFN- γ を加えた直後に上昇し、50秒から60秒後に再び IFN- γ 添加前と同程度となった(図3)。

考 察

IFN- γ は、免疫調節に深く係わるリンフォカインで、抗ウイルス作用の他に NK 細胞活性化、マクロファージ活性化および細胞増殖抑制など種々にわたり、従来より抗悪性腫瘍剤としての臨床応用に期待がもたれている。しかし、その炎症の場における働き、特に炎症の場においてもっとも重要な働きを担っている好中球との係わりについての報告は少ない。

そこで、本研究で筆者らは、まず、IFN- γ の好中球活性酸素産生に及ぼす影響を O_2^- の産生を指標として検討した。

その結果、IFN- γ (1~250 unit/ml) 単独では好中球に対して stimulant としての作用はみられなかったが、PMA または OPZ を stimulant としたときの好中球 O_2^- 産生は、50 unit/ml 以上の濃度の IFN- γ で明らかな増強効果が認められた(図

表1 H-7 および TMB-8 の好中球 superoxide radical 産生に及ぼす影響

addition	IFN- γ (250 U/ml)	
	-	+
PMA alone	3.17 $\pm$ 0.37	4.90 $\pm$ 0.44
PMA+H-7	0.19 $\pm$ 0.14	0.33 $\pm$ 0.13
PMA+TMB-8	0.06 $\pm$ 0.03	0.14 $\pm$ 0.01

(nmol/min 10⁶ cells)

図3 IFN- γ の添加による好中球細胞内 Ca^{2+} の変化

IFN- γ 添加直後に蛍光強度の上昇が認められた。

1d)。すなわち、好中球は IFN- γ との preincubation 時に O_2^- 産生を増強させるなんらかの変化を受けていることが推測された。

Berton ら⁸⁾ も同様の報告をしているが、この増強効果の発現には interferon と incubation medium 中に血清の存在が不可欠で、1時間以上の preincubation が必要であり、さらに、この効果は蛋白合成に依存していると述べている。しかし、本実験においては、血清は含まれておらず、また、preincubation 時間も10分と短時間でも増強効果が認められており、Berton⁸⁾ らの結果と異なっていた。

そこでもっとも増強効果の大きかった PMA 刺激時の作用機序について検討を行ったところ、この増強効果の発現には medium 中の Ca^{2+} の存在が不可欠であることが明らかとなった。OPZ 刺激による O_2^- 産生は、元来、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 依存性であるが、PMA は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 依存性ではなく、生理的濃度下において直接 PK-C を活性化することにより、 O_2^- 生成にいたることが知られている。したがって、IFN- γ はこの細胞外 Ca^{2+} を介して PK-C を活性化し、増強効果を引き起こすことが推測される。このことは、これらの反応が PK-C の阻害剤である H-7^{10,11)} により完全に阻害され

ることにより裏づけられる。

またさらに、細胞内 Ca^{2+} の阻害剤である TMB-8^{12,13)} によっても完全に阻害されることから、 $\text{IFN-}\gamma$ により細胞内外での Ca^{2+} の移動が引き起こされることが推測される。そこで、好中球に $\text{IFN-}\gamma$ を作用させたときの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化を検討したところ、 $\text{IFN-}\gamma$ を加えた直後に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇が認められ、実際に Ca^{2+} の influx が引き起こされることが判明した。

以上の結果により、PMA 刺激時の $\text{IFN-}\gamma$ による O_2^- 産生増強効果には、PK-C の活性化、細胞内への Ca^{2+} の移動が関係していることが明らかとなった。 $\text{IFN-}\gamma$ のこのような性質は、FMLP による好中球のプライミング効果と共通した側面を持っているようである。すなわち、大阪ら¹⁴⁾ はマウスおよびヒトの顆粒球を用いたプライミングに関する実験において、FMLP による PMA のプライミングは $[\text{Ca}^{2+}]_i$ により引き起こされると報告している。また、FMLP による前処理時に一過性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇が認められるとしており、本実験における好中球に対する $\text{IFN-}\gamma$ の効果と共通する部分が多く、種々の刺激に対する好中球の固有な反応パターンの一つとも推測される。

$\text{IFN-}\gamma$ の生理的作用は種々の細胞にわたり、また同一細胞においてもさまざまな異なった作用のあることが報告されている。しかし、その作用にも好中球における反応と同様に、共通性を持ったものも多く認められる。たとえば、本研究で明らかになった $\text{IFN-}\gamma$ の PK-C、 Ca^{2+} との関連性についても、 $\text{IFN-}\gamma$ により誘導されるマクロファージの非特異的殺細胞性の研究において同様の報告がある¹⁵⁾。したがって $\text{IFN-}\gamma$ の多彩な生理活性を考えるうえで PK-C および Ca^{2+} との関連を詳細に検討することが重要と思われる。

また、臨床使用時の血中サイトカイン濃度で O_2^- 生成が上昇するのか、生体内での刺激剤がなんであるのか、血管内皮との接触が関係するのかなどの点も今後の大切な研究課題である。なお、 $\text{IL-1}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ においても OPZ 刺激時に O_2^- 産生増強効果が認められており、その機序についても検討を加えていく予定である。

本研究の一部は、文部省科学研究費(課題番号

63480448)により行われたことを付記する。

文 献

- 1) 小林茂保：インターフェロンの科学，講談社，1985，p 41-42
- 2) 大柳善彦：スーパーオキシドと医学，共立出版 1981，p 187-188.
- 3) Shalaby, M.R., Aggarwal, B.B., Rinderknecht, E., Svedersky, L.P., Finkle, B.S., Palladino, M.A. Jr.: Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon and tumor necrosis factors. *J. Immunol.* 135: 2069-2073, 1985.
- 4) Kapp, A., Kirchner, H., Wokalek, H., Schöpf, E.: Modulation of granulocyte oxidative response by recombinant interferon α_2 and γ . *Arch. Dermatol. Res.* 278: 274-276, 1986.
- 5) Nathan, C.F., Herowitz, C.R., de la Harpe, J., Vadhan-Raj, S., Sherwin, S.A., Oettgen, H.F., Krown, S.E.: Administration of recombinant interferon- γ to cancer patients enhances monocyte secretion of hydrogen peroxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 8686-8690, 1985.
- 6) Bahior, B.M., Kipnes, R.S., Curnulte, J.T.: The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J. Clin. Invest.* 52: 741-744, 1973.
- 7) Lew, P.D., Wollheim, C.B., Waldvogel, F.A., Pozzan, T.: Modulation of cytosolic-free calcium transients by changes intracellular calcium-buffering capacity: Correlation with exocytosis and O_2^- production in human neutrophils. *J. Cell Biol.* 99: 1212-1220, 1984.
- 8) Berton, G., Zemi, L., Cassatella, M.A., Rossi, F.: Gamma interferon is able to enhance the oxidative metabolism of human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138: 1276-1282, 1986.
- 9) 住本英樹，竹重公一朗・他：好中球の superoxide 生成，フリーラジカルの臨床 1: 15-23, 1987.
- 10) Fujita, I., Takeshige, K., Minakami, S.: Inhibition of superoxide formation by 1-(5-isoquinoline-sulfonyl)-2-methyl-piperazine (H-7), an inhibitor of protein kinase-C. *Biochem. Pharmacology* 135: 4555-4562, 1986.
- 11) Berkow, R.L., Donson, R.W., Kraft, A.S.: The effect of a protein kinase-C inhibitor, H-7, on oxidative burst and degranulation. *J. Leukocyte Biology* 41: 441-446, 1987.
- 12) Smith, R.J., Iden, S.: Modulation of human neutrophil superoxide anion generation by the Ca antagonist 8-(N,N-Diethylamino)-octyl-(3,4,5-trimethoxy)benzoate hydrochloride. *J. Reticuloendothel. Soc.* 29: 215-225, 1981.
- 13) Takeshige, K., Nabi, Z.F., Tatscheck, B., Minakami, S.: Release of calcium from membrane and its relation to phagocytotic metabolic changes: A fluorescence study on leukocytes

- loaded with chlortetracycline. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95: 410-415, 1980.
- 14) 大阪顕通, 北川誠一, 元吉和夫, 畠 清彦, 三浦恭定, 斉藤政樹, 湯尾 明, 高久史麿: 遊走因子 fMet-Leu-Phe による顆粒球のプライミングとカルシウムイオン. *炎症* 9: 33-37, 1989.
- 15) Celada, A., Schreiber, R.D.: Role of protein kinase C and intracellular calcium mobilization in the induction of macrophage tumoricidal activity by interferon- γ . *J. Immunol.* 137: 2373-2379, 1986.