サブスタンス P 誘発好中球活性酸素産生に対する カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) の抑制作用

田辺隆敏^{*1,2)}, 大谷ひとみ^{*1)}, 二宮俊憲・小川亮恵^{*2)}, 稲垣千代子^{*1)}

Inhibitory effect of calcitonin-gene related peptide on substance P-induced superoxide production by neutrophils

Calcitonin gene-related peptide (CGRP) is known to be co-localized with substance P (SP) in sensory C-fibers. We investigated the interaction between these neuropeptides in the superoxide (O_2^-) production of human neutrophils. SP and SP_{4-11} fragment ($10 \sim 100 \mu M$) induced O_2^- production of neutrophils in a dose-dependent manner. Phospholipase C inhibitor, U-73122 and neomycin, suppressed the O_2^- production by SP and SP_{4-11} fragment. CGRP ($10 \sim 20 \mu M$) reduced the SP-induced O_2^- production, and this effect of CGRP was blocked by CGRP receptor antagonist, CGRP₈₋₃₇ ($10 \mu M$). Dibutyryl-cyclic AMP (dBcAMP; $0.5 mM$) and phosphodiesterase inhibitors, 3-isobutyl-1-methyl xanthine (IBMX, $5 \mu M$) and theophylline ($0.5 mM$), also inhibited SP-induced O_2^- production. The cAMP-dependent protein kinase (A-kinase) inhibitors, H-8 ($10 \mu M$) and KT5720 ($50 nM$), suppressed the CGRP-induced effect. These data suggest that CGRP inhibits the SP-induced O_2^- production in neutrophils by interfering with phosphoinositide signaling through receptor-linked activation of the cAMP/A-kinase-dependent pathway.

Takatoshi Tanabe^{*1,2)}, Hitomi Otani^{*1)},
Toshinori Ninomiya・Ryoukei Ogawa^{*2)},
Chiyoko Inagaki^{*1)}

key words : substance P, calcitonin gene-related peptide (CGRP), neutrophils, superoxide production, inflammation

サブスタンス P (SP) やカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) は、感覚神経終末に局在し、神経原性炎症の発現に重要な役割を果たしている¹⁾。

SP は起炎症性ペプチドとして、直接好中球に作

用してスーパーオキシド産生を誘導する²⁾ほか、滑膜細胞でのサイトカインやプロスタグランジンの遊離を増強する³⁾。加えて、多くの細胞でイノシトールリン脂質代謝回転 (PI 応答) を亢進させることが知られている^{4,5)}。一方、CGRP は神経終末からともに遊離されることから、SP との相互作用が注目され、最近、多くの組織で SP 作用を修飾することが報告されている^{6,7)}。しかしながら、SP と CGRP 間の細胞内干渉機構は依然不明である。

今回、筆者らは、CGRP が SP による好中球スーパーオキシド産生を抑制することを見出し、その細胞内機序について検討した。

方 法

(1) 試 薬

SP, SP_{4-11} (SP フラグメント), CGRP, CGRP₈₋₃₇ (CGRP 受容体遮断薬) のペプチドはペプチド研究所 (大阪) より購入し、蒸留水に溶解後、1 週間以内に使用した。スルフォリパーゼ C 阻害薬の U-73122 は、アップジョン社より譲り受け、各種プロテインキナーゼ阻害薬 (H-8, KT5720)、透過性 cAMP (ジブチリルサイクリック AMP, dBcAMP), テオフィリン, および 3-イソブチル-1-メチルキサンチン (IBMX) は、Sigma 社より購入し、100 倍高濃度水溶液を作製し、使用した。

(2) ヒト好中球の分離

ヘパリン添加健常人静脈血からファイコールパーク比重遠心法、デキストラン沈降法、および低張溶血により純度約 96% の好中球細胞を分離し、 1×10^6 cells/ml となるよう Hanks 液 ($0.5 mM$ の Ca 含) 中にて浮遊させた。

(3) スーパーオキシド (O_2^-) 産生反応

Hanks 液中に浮遊させた好中球細胞を前処置薬の存在の有無に関わらず、 $37^\circ C$ で 10 分間イン

Department of ^{*1)} Pharmacology and ^{*2)} Orthopedic Surgery, Kansai Medical University, Osaka 570, Japan 関西医科大学医学部 ^{*1)} 薬理学教室 ^{*2)} 同 整形外科教室

図 1

a: ヒト好中球における SP および SP₄₋₁₁ による O₂ 産生の吸光計変化。横軸に時間経過、縦軸に吸光度変化をあらわす。30 μM の SP および SP₄₋₁₁ 投与により好中球は O₂ を産生し、この吸光度変化は両剤いずれの場合もスーパーオキシジスムターゼ(SOD: 400 units/ml)の共存により完全に消失した。

b: ヒト好中球における SP および SP₄₋₁₁ による O₂ 産生の用量作用曲線。横軸にペプチド濃度、縦軸に産生された O₂ 量をあらわす。20~100 μM の SP (●) および SP₄₋₁₁ (■) を投与し、5 分間の O₂ 産生量を測定した。各点は 6~12 例の平均値±標準誤差を示す。標準誤差バーのないものはその値が小さく平均値表示中に隠れた。

キュベートしたあと、ペプチドを添加して反応を開始した。SP はリウペプチン、フェニルメタンサルフォニルフルオライド (PMSF)、アプロチニンの 3 種プロテアーゼ阻害薬存在下で投与した。O₂ 産生量は 2 波長の分光光度計(日立、モデル 557)を用いてチトクローム C 還元法(550~540 nm)により経時的に測定した。

(4) 細胞内 cAMP 量測定

O₂ 産生量測定時と同じ条件下でペプチドを投与し、煮沸法にて反応停止および細胞膜破壊を行ったあと、細胞内の cAMP 量を [¹²⁵I] cAMP

を用いたラジオイムノアッセイ法(ヤマサ製、アッセイキット使用)にて測定した。

(5) 統計処理

実験結果の数値は平均値標準誤差であらわし、平均値間の有意差検定は Student の t-検定法 (P<0.05) により行った。

結 果

(1) SP および SP₄₋₁₁ による好中球 O₂ 産生の誘導

図 1 a は、SP およびその活性型類縁体である SP₄₋₁₁ 刺激後の好中球による O₂ 産生の 1 例を示している。SP は 30 μM で明らかな O₂ 産生効果を示し、O₂ 産生量は SP 添加後緩徐に増加して約 4~5 分後 SP の場合の約 3 倍値のプラトーに達した。これに対し、SP (30 μM) では添加直後から SP よりも強力でかつ速やかな O₂ 産生が観察され、反応は約 4~5 分後にプラトーに達した。スーパーオキシジスムターゼの添加により、これらの吸光度変化はほぼ完全に消失し、測定した吸光度変化が O₂ 産生量を反映するものであることが確認された。SP および SP₄₋₁₁ による O₂ 産生の用量作用曲線を図 1 b に示した。好中球は SP および SP₄₋₁₁ のいずれの場合にも濃度依存性に O₂ を産生し、両ペプチドの効果は共に 50 μM でほぼ最大に達した。

(2) ホスホオリパーゼ C (PLC) 阻害薬の SP および SP₄₋₁₁ 誘発 O₂ 産生に対する効果

好中球を PLC 阻害薬である U-73122 (1 μM)⁸⁾ またはネオマイシン (2 mM) で 10 分間処置すると、SP および SP₄₋₁₁ による O₂ 産生は有意に抑制された(表 1)。また、これらの阻害薬の構造類似体で PLC 阻害作用をもたない U-73343 およびストレプトマイシンの前処置では、抑制効果は認められなかった。これらの実験結果は、SP および SP₄₋₁₁ が PLC の活性化を介して好中球の O₂ 産生を誘導することを示唆した(表 1)。

(3) CGRP の SP および SP₄₋₁₁ 誘発 O₂ 産生に対する効果

好中球を CGRP (10 μM, 20 μM) で前処置し、SP および SP₄₋₁₁ を投与すると、O₂ 産生は CGRP 濃度に依存して有意に抑制された(図 2)。また、同様の操作を CGRP 受容体遮断薬である

図2 ヒト好中球における SP および SP₄₋₁₁ による O₂ 産生に対する CGRP の抑制効果, ならびに, この CGRP の抑制効果に対する CGRP 受容体遮断薬である CGRP₈₋₃₇ の影響

横軸に CGRP 濃度, 縦軸に産生された O₂ 量をあらわす. 好中球を CGRP₈₋₃₇ (10 μM) の存在 (○, △), 非存在 (●, ▲) 下に, 0, 10, 20 μM の CGRP で処置後, SP (30 μM) (○, ●) または SP₄₋₁₁ (30 μM) (△, ▲) を投与して 5 分間の O₂ 産生量を測定した. CGRP は濃度依存性に SP および SP₄₋₁₁ による O₂ 産生を抑制し, CGRP₈₋₃₇ はこの CGRP の抑制効果を有意に消失させた. 各点は 4~25 例の平均値 ± 標準誤差を示す. * P < 0.05, ** P < 0.01 (CGRP₈₋₃₇ の存在下の実験結果を非存在下の値と比較して)

CGRP₈₋₃₇ の存在下で行うと, この CGRP の抑制効果は消失した (図 2).

(4) CGRP の細胞内 cAMP 量に及ぼす影響

CGRP は多くの組織において細胞内 cAMP レベルを高めることが知られている^{9,10}. そこで好中球の cAMP 含有量に対する CGRP の影響を検討した.

CGRP (10 μM) は, SP および SP₄₋₁₁ の存在の有無にかかわらず, 好中球の cAMP 量を増加させた. さらに, この CGRP の作用は CGRP 受容体遮断薬である CGRP₈₋₃₇ の前処置により消失し, CGRP₈₋₃₇ 単独では好中球の細胞内 cAMP 量の変化は認められなかった (表 2).

(5) 細胞内 cAMP 量上昇処置の SP および SP₄₋₁₁ 誘発 O₂ 産生機構に対する影響

膜透過型の cAMP 製剤である dBcAMP, ホスフォジエステラーゼ阻害作用をもつテオフィリンおよび IBMX は, いずれも細胞内 cAMP 量上昇

表 1 SP および SP₄₋₁₁ によるヒト好中球 O₂ 産生に対するホスフォリパーゼ C 阻害薬の効果

pretreatment	O ₂ (mol/5 min/10 ⁷ cells)	
	SP (30 μM)	SP ₄₋₁₁ (30 μM)
none	16.0 ± 1.2	51.6 ± 4.1
U-73122 (1 μM)	4.7 ± 0.2**	6.1 ± 3.0**
U-73343 (1 μM)	14.8 ± 2.1	49.5 ± 5.0
neomycin (2 mM)	5.6 ± 1.8**	10.5 ± 2.0**
streptomycin (2 mM)	12.7 ± 1.9	48.5 ± 10.2

好中球をホスフォリパーゼ C の阻害薬 (U-73122, ネオマイシン) またはその不活性構造類似体 (U-73343, ストレプトマイシン) で 5 分間処置したあと, SP (30 μM) または SP₄₋₁₁ (30 μM) を投与し, 5 分間に産生される O₂ 産生量を阻害薬の非存在下の場合 (none) と比較した.

各値は 4~8 例の平均値 ± 標準誤差を示す.

** P < 0.01 (各実験結果を none の値と比較して)

表 2 ヒト好中球細胞内 cAMP 量に対する SP, SP₄₋₁₁, CGRP および CGRP₈₋₃₇ の影響

pretreatment	cAMP (pmol/10 ⁶ cells)		
	vehicle	SP (30 μM)	SP ₄₋₁₁ (30 μM)
none	7.1 ± 1.4	8.0 ± 1.5	8.5 ± 0.9
CGRP (10 μM)	15.3 ± 3.2**	15.0 ± 3.9**	14.6 ± 2.2**
CGRP ₈₋₃₇ (10 μM)	8.0 ± 2.1	8.6 ± 2.4	8.7 ± 2.3
CGRP (10 μM) + CGRP ₈₋₃₇ (10 μM)	8.1 ± 1.7	9.2 ± 0.7	10.1 ± 0.6

好中球を none (蒸留水), CGRP, CGRP₈₋₃₇, CGRP + CGRP₈₋₃₇ の 4 種の前処置下で, SP および SP₄₋₁₁ を 5 分間作用させたあと, 好中球を破碎し, 細胞内 cAMP 量を測定した.

各値は 4~8 例の平均値 ± 標準誤差を示す. ** P < 0.01 (各実験結果を none の値と比較して)

効果を有するが, これらのうちいずれの試薬による処置でも CGRP と同様に, SP および SP₄₋₁₁ による O₂ 産生は有意に抑制された (表 3). なお, 膜透過型 cGMP 製剤である 8-Br-cGMP (10 μM) 存在下では, SP および SP₄₋₁₁ による O₂ 産生量はおのおの 15.8 ± 1.8, 50.4 ± 5.2 nmol/5 min/10⁷ cells (n=2) であり, 非存在下 (SP: 16.0 ± 1.2, SP₄₋₁₁: 51.6 ± 4.1 nmol/5 min/10⁷ cells, n=4-8) にくらべて有意な差を示さなかった.

(6) cAMP 依存性プロテインキナーゼ (A-キナーゼ) 阻害薬の影響

CGRP により好中球の cAMP 濃度が上昇すると, A-キナーゼの活性化が予想され, これにより SP 反応に対する CGRP の抑制効果が発現する可能性が考えられる. そこで, CGRP の抑制効果が

表 3 SP および SP₄₋₁₁ によるヒト好中球 O₂⁻ 産生に対する細胞内 cAMP 上昇処置の影響

pretreatment	O ₂ (mol/5 min/10 ⁷ cells)	
	SP (30 μM)	SP ₄₋₁₁ (30 μM)
none	16.5±2.7	53.5±5.9
dBcAMP (1 mM)	4.8±0.9**	8.9±1.5**
theophylline (0.5 mM)	8.5±0.9*	24.9±6.5*
IBMX (5 μM)	7.2±1.2*	36.7±3.3*

好中球をジブチリルサイクリック AMP (dBcAMP) およびホスフォジエステラーゼ阻害薬のテオフィリン, IBMX にて前処置下で, SP および SP₄₋₁₁ の投与による 5 分間の O₂⁻ 産生量を測定し, 無処置 (none) の場合と比較した. 各値は 4~8 例の平均値±標準誤差を示す. * P<0.01, ** P<0.05 (各実験結果を none の値と比較して)

A-キナーゼの活性化を介する可能性を検討するため, A-キナーゼ阻害薬である H-8 (10 μM) および KT5720 (50 nM)¹¹⁾ を CGRP と同時に添加した.

SP および SP₄₋₁₁ による, O₂⁻ 産生に対する CGRP の抑制効果は, これらの A-キナーゼ阻害薬存在下で有意に抑制された (表 4). なお, G-キナーゼ阻害薬である KT5823 (1 μM) 存在下では, CGRP 前処置後の SP および SP₄₋₁₁ による O₂⁻ 産生量は, おおの 9.5±2.1, 40.1±5.2 nmol/5 min/10⁷ cells (n=2) であり, 非存在下 (SP: 8.6±0.6, SP₄₋₁₁: 38.3±2.7, n=4-8) にくらべて有意な差を示さなかった.

考 察

知覚神経含有ペプチドである SP およびその類縁体である SP₄₋₁₁ は, ヒト好中球において O₂⁻ 産生させた. SP は 11 個のアミノ酸で構成されるが, このアミノ酸配列のうち, C 末領域が SP 受容体への結合に重要であることが知られている¹²⁾. 事実, SP の C 末側フラグメントである SP₄₋₁₁ が SP より高活性を示したことから, SP の O₂⁻ 産生効果には C 末端領域が関与すると考えられる.

今回, 筆者らはこれら SP および SP₄₋₁₁ による好中球 O₂⁻ 産生反応がイノシトールリン脂質分解酵素であるホルフォリパーゼ C の阻害薬により特異的に阻害されることを見出した. O₂⁻ 産生の触媒酵素である NADPH オキシダーゼは, 細胞

表 4 CGRP の SP および SP₄₋₁₁ によるヒト好中球 O₂⁻ 産生抑制効果に対する A-キナーゼ阻害薬の影響

pretreatment	O ₂ (mol/5 min/10 ⁷ cells)	
	SP (30 μM)	SP ₄₋₁₁ (30 μM)
none	18.5±2.4	59.5±7.3
CGRP (10 μM)	8.6±0.6	38.3±2.7
CGRP+H-8 (10 μM)	14.8±3.2**	53.9±6.2**
CGRP+KT5720 (50 nM)	16.7±2.4**	58.7±5.3**

好中球を CGRP および CGRP と 2 種 A-キナーゼ阻害薬 (H-8, KT5720) の共存下で 5 分間処置したあと, SP および SP₄₋₁₁ を投与し 5 分間の O₂⁻ 産生量を無処置 (none) の場合と比較した. 各値は 4~8 例の平均値±標準誤差を示す. ** P<0.01 (各実験結果を CGRP 単独処置の値と比較して)

内 Ca²⁺ 濃度の上昇またはプロテインキナーゼ C (PKC) により活性化される¹³⁾.

今回の成績から, SP 誘発性 O₂⁻ 産生は, イノシトールリン脂質分解の結果, 生成されるセカンドメッセンジャー, すなわちイノシトール 3 リン酸 (IP₃) またはジアシルグリセロール (DAG) を介して惹起されることが示唆された. おそらく, IP₃ は細胞内 Ca²⁺ 貯蔵部位からの Ca²⁺ 動員による細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇を介して¹⁴⁾, DAG は PKC の活性化を介して¹⁵⁾, それぞれ NADPH オキシダーゼの活性化を誘導するのであろう.

一方, CGRP は SP と同一神経終末に共存するため, 最近, SP 作用に対する修飾効果についての検討がなされ, すでに, 気管支および血管の平滑筋や皮膚において CGRP が SP 作用を抑制することが報告されている^{6,7)}.

今回, 筆者らは好中球において CGRP が SP 誘発性 O₂⁻ 産生を抑制し, この反応が CGRP 受容体を介して惹起されることを見出した. CGRP は血管平滑筋などで細胞内 cAMP レベルを上昇させることが報告されている^{9,10)}. 好中球細胞においても CGRP による細胞内 cAMP レベルの上昇が認められ (表 2), 加えて, dBcAMP やホスフォジエステラーゼ阻害薬 (テオフィリン, IBMX) を用いた細胞内 cAMP レベルを上昇させる処置により, CGRP 作用時と同様 SP 誘発性好中球 O₂⁻ 産生が抑制された (表 3).

さらに, cAMP レベルの上昇は, cAMP 依存性蛋白リン酸化酵素 (A-キナーゼ) を活性化する

図3 SPによるヒト好中球 O_2^- 産生における細胞内情報伝達機構と CGRP の抑制効果の発現機序

が、A-キナーゼ阻害薬である H-8 または KT5720 は、SP および SP_{4-11} 作用に対する CGRP の抑制効果を消失させた(表4)ため、表2の成績とあわせてこの抑制効果の発現には、cAMP/A-キナーゼが重要な役割を果たすことが示唆された。

図3にSPによる好中球 O_2^- 産生に対する CGRP 抑制効果の細胞内機序について、筆者らの仮説を示している。神経終末から関節腔内などの周囲組織へ遊離された SP は好中球サブスタンス P 受容体に結合後、ホスフォリパーゼCの活性化を介して O_2^- を産生させる。神経終末から SP とともに遊離された CGRP は、CGRP 受容体に結合後、cAMP 依存性蛋白リン酸化酵素の活性化を介して、 O_2^- 産生に至る PI 応答由来の情報伝達機構に干渉すると思われる。干渉部位についてはまだ不明であり、ホルフォリパーゼC活性、または IP_3 による Ca^{2+} 動員機構が候補として考えられる。

今回、好中球スーパーオキシド産生機構が SP と CGRP により制御されることを示した。SP と CGRP の病態生理学的意義については、今後の検討課題であるが、慢性関節リウマチなどの病態時には SP や CGRP の遊離量の上昇が報告されていることから^{16,17)}、それらの遊離量の上昇率もしくは上昇時期の差により惹起される情報伝達経路間の不均衡がスーパーオキシド産生を誘導し、かつ、その強度を規定する一要因になるものと推察される。

文 献

- MacGillis, J. P., Mitsuyoshi, M., Payan, D. G.: Immunomodulation by tachykinin neuropeptides. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 594: 85-94, 1990.
- Serra, M. C., Bazzoni, F., Bianca, V. D., Greskowiak, M., Rossi, F.: Activation of human neutrophils by substance P: Effect on oxidative metabolism, exocytosis, cytosolic Ca^{2+} concentration and inositol phosphate formation. *J. Immunol.* 141: 2118-2124, 1988.
- Kimball, E. S.: Substance P, cytokines, and arthritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 594: 293-308, 1990.
- Stephen, P. W., C. Peter, D.: Substance P-induced hydrolysis of inositol phospholipids in guinea-pig ileum and rat hypothalamus. *Eur. J. Pharmacol.* 93: 245-253, 1983.
- Janet, E. M., Timothy, J. R.: The effect of substance P and carbachol on inositol tris- and tetra-kisphosphate formation and cytosolic free calcium in rat parotid acinar cells: A correlation between inositol phosphate levels and calcium entry. *J. Biol. Chem.* 262: 14912-14916, 1987.
- Gatto, C., Lussky, R. C., Erickson, L. W., Berg, K. J., Wobken, J. D., Johnson, D. E.: Calcitonin and CGRP block bombesin- and substance P-induced increases in airway tone. *J. Appl. Physiol.* 66: 573-577, 1989.
- Brain, S. D., Williams, T. J.: Substance P regulated the vasodilator activity of calcitonin gene-related peptide. *Nature* 335: 73-75, 1988.
- Bleasdale, J. E., Thakur, N. R., Gremban, R. S., Bundy, G. L., Fitzpatrick, F. A., Smith, R. J., Bunting, S.: Selective inhibition of receptor-coupled phospholipase C-dependent processes in human platelets and polymorphonuclear neutrophils. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255: 756-768, 1990.
- Wang, X., Fiscus, R. R.: Calcitonin gene-related peptide increases cAMP, tension, and rate in rat atria. *Am. J. Physiol.* 256: R421-428, 1989.
- Hagerstrand, A., Dalsgaard, C. J., Jonzon, B., Larsson, O., Nilsson, J.: Calcitonin gene-related peptide stimulates proliferation of human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3299-3303, 1990.
- Kase, H., Iwahashi, K., Nakanishi, S., Matsuda, Y., Yamada, K., Takahashi, M., Murakata, C., Sato, A., Kaneko, M.: K-572 compounds, novel and potent inhibitors of protein kinase C and cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142: 436-440, 1987.
- Mousli, M., Bueb, J. L., Bronner, C., Rouot, B., Landry, Y.: G protein activation: a receptor-independent mode of action for cationic amphiphilic neuropeptides and venom peptides. *Trends Pharmacol. Sci.* 11: 358-362, 1990.
- Tauber, A. I.: Protein kinase C and the activation of human neutrophil NADPH-oxidase. *Blood* 69: 711-720, 1987.

- 14) Meyer, T., Stryer, L. : Transient calcium release induced by successive increments of inositol 1, 4, 5-triphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 3841-3845, 1990.
- 15) Majumdar, S., Rossi, M. W., Fujiki, T., Phillips, W. A. Disa, S., Queen, C. F. Johnston, Jr. R. B., Rosen, O. M., Corkey, B. E., Korchak, H. M. : Protein kinase C isotypes and signaling in neutrophils : differential substrate specificities of a translocatable, calcium- and phospholipid-dependent β -protein kinase C and a novel calcium-independent, phospholipid-dependent protein kinase which is inhibited by long chain fatty acyl fatty acyl coenzyme A. *J. Biol. Chem.* 266 : 9285-9294, 1991.
- 16) Levine, J. D., Clark, R., Devor, M., Helms, C., Moskowitz, M. A., Basbaum, A. I. : Intraneuronal substance P contributes to the severity of experimental arthritis. *Science* 226 : 547-549, 1984.
- 17) Gronblad, M., Kontinen, Y. T., Korkala, O., Liesi, P., Hukkanen, M., Polak, J. M. : Neuropeptides in synovium of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J. Rheumatol.* 15 : 1807-1810, 1988.