炎症による好中球アポトーシスの修飾

仙道富士郎・武井 寛・武田裕司・土田秀也・加藤智幸^{*1)}、渡辺 皓^{*2)}

review article

JAPANESE JOURNAL OF INFLAMMATION

Modulation of neutrophils apoptosis by inflammation

We previously demonstrated that $\text{TNF}\alpha$ induces rapid apoptosis of human peripheral blood neutrophils. To understand better the *in vivo* significance of neutrophil apoptosis, we examined using rats $\text{TNF}\alpha$ induced apoptosis of neutrophils obtained from various sources. Normal peripheral blood neutrophils (PBN) underwent significant apoptosis, but peritoneally exudated neutrophils (PEN), peripheral blood neutrophils obtained from rats i.p. injected with inflammation inducing agents (inflammatory PBN), and bone marrow neutrophils were resistant to apoptosis induced by $\text{TNF}\alpha$.

Addition to $\text{TNF}\alpha$ of cycloheximide in a low concentration that alone were barely able to induce neutrophil apoptosis, enhanced apoptosis of PBN, inflammatory PBN and bone marrow neutrophils but not of PEN, suggesting that in the former three sources of neutrophils certain apoptosis inhibitory protein(s) were synthesized by stimulation with $\text{TNF}\alpha$, and in PEN these protein(s) had been already synthesized *in vivo* during migration through endothelial spaces.

We further examined *in vivo* clearance of neutrophils by i. v. injection with ^{51}Cr labelled neutrophils and found that PBN are promptly scavenged in the liver and the spleen.

Rec. 2/2/1995, pp 201~206

Fujiro Sendo・Hiroshi Takei・Yuji Takeda

Hideya Tsuchida・Tomoyuki Kato^{*1)}・Hiroshi Watanabe^{*2)}

key words : neutrophil, apoptosis, inflammation, TNF , cycloheximide

好中球は細菌感染に対する生体防御機構の中心的役割を果たす細胞であるが、一方、病的条件下では、この細胞が産生する活性酸素などの細胞障害性物質によって、正常組織が破壊される場合があることが知られている。このような組織障害を防止し、または好中球の活発な機能が要求される細菌感染などの状況下では逆にその機能を活性

化、維持する好中球機能の制御システムの存在が想定される。

筆者らは、偶然に $\text{TNF}\alpha$ が好中球のアポトーシスを促進する現象を見出し¹⁾、好中球のアポトーシスの機序の解明を試みてきた。そのなかで好中球のアポトーシスが促進され好中球がごく短時間に死滅し、あるいは、逆に好中球の生存時間が延長することが、とりもなおさず、好中球機能の調節システムの一部を構成していることを示唆する結果が得られたので、その概略について紹介する。

$\text{TNF}\alpha$ は好中球のアポトーシスを誘導する

筆者らは、ここ数年間好中球を生体内において

^{*1)} Department of Immunology and Parasitology, Yamagata University School of Medicine 山形大学医学部免疫学・寄生虫学教室

^{*2)} Department of Nursing Division of Theoretical Nursing, Yamagata University School of Medicine 山形大学医学部看護学科基礎看護学

Offprint requests to : Fujiro Sendo, Department of Immunology and Parasitology, Yamagata University School of Medicine, 2-2-2, Iida nishi, Yamagata 990-23, Japan

図1 LPS 肝炎に伴う好中球のアポトーシス
C. parvum i.v. 後、1週間後に LPS を i.v. した、90 分後の肝の電顕像

A: 肝類洞内にアポトーシスに陥った好中球が認められる。

B: Kupffer 細胞の食胞に貪食された apoptotic body

選択的に枯渇させる単クローン抗体²⁾を用いて好中球の炎症、免疫における意義について検討し、好中球が①後期血管透過性亢進あるいは $\text{TNF}\alpha$ 接種によって誘導される血管透過性亢進に必須の因子であること^{3,4)}、②遅延型過敏症、腫瘍移植抵抗性の発現に促進的に作用し^{5~9)}、③逆に抗体産生を抑制すること¹⁰⁾を明らかにしたが、さらに各疾患における好中球の役割を検討した。

C. parvum を静注したラットに7日後に LPS を静注すると、systemic Schwarzman's reaction の一表現系として急性肝障害が誘導されるが、LPS を接種する直前に単クローン抗体により好中球を選択的に枯渇させると、肝障害が起こらな

いことを見出した¹¹⁾。つまり、以上の条件下で誘導される肝障害には好中球が必須の因子であることを示す結果である。この結果は、肝病変内に好中球が多数浸潤していることを示唆する。ところが、病変部には好中球の浸潤はほとんど認められず、よく観察すると、LPS 接種後ごく初期(1~2時間)に、肝類洞内にアポトーシスに陥った好中球が認められ、多くのものは Kupffer 細胞に貪食されていた(図1)。

アポトーシスに陥った好中球はすばやくマクロファージに貪食されるという *in vitro* の結果¹²⁾を考慮に入れると、LPS 接種後好中球は肝に集合するが(好中球がこの条件下で血管外に遊走しているか否かはなお不明)、ただちにアポトーシスに陥り、Kupffer 細胞に貪食されるという経路が、この病変における想定される好中球関与の様式である。好中球のアポトーシスのこの病変における病理学的意義に関してはいまだ不明ではあるが、好中球のアポトーシスが、一定の炎症下で亢進することを *in vivo* で証明したものである。

以上の条件下で誘導される Schwarzman's reaction では種々のサイトカインが産生されることが知られているので、ヒト末梢血好中球を用いて、種々のサイトカインが好中球のアポトーシスにどのような影響を与えるかを検討した。その結果、 $\text{TNF}\alpha$ は3~6時間という短時間の培養で好中球のアポトーシスを促進した(図2)¹⁾。一方、GM-CSF、IL-1 などは短時間の培養では影響を与えないが、12時間以上の長時間の培養で好中球のアポトーシスを抑制した(図3)。

以上の結果より、好中球のアポトーシスは、炎症に伴って産生される種々の proinflammatory cytokine によって制御されていることが示唆された。

末梢血、腹腔、骨髓の各好中球のアポトーシス感受性は異なる

さらに、好中球アポトーシスの *in vivo* における意義を検討するため、ラットの系を用いて、種々の条件下の好中球のアポトーシス感受性を検討した。

まず、ヒトおよびマウスのレコンビナント $\text{TNF}\alpha$ を分離したラット末梢血好中球に添加、培

図2 $\text{TNF}\alpha$ によるヒト末梢血好中球のアポトーシスの促進(3時間培養)
ヒト末梢血好中球に $\text{TNF}\alpha$ (100 U/ml) を添加し、3時間培養したあとのアポトーシスを同時培養液中で培養したものと比較した。 $\text{TNF}\alpha$ 処置群が有意に高いアポトーシスを示している。

養すると、ヒト末梢血好中球よりも感受性は劣るものの、3、6時間の短時間の培養で対照群に比し有意にアポトーシスが亢進した。ところが、protease peptone を接種することによって腹腔に遊走させた腹腔好中球は、 $\text{TNF}\alpha$ に対してまったく感受性を示さなかった。

また、末梢血好中球でも腹腔に起炎剤を接種し、3～15時間までに採取された好中球は、 $\text{TNF}\alpha$ に対する感受性を示さなかった。また、骨髓中の好中球は正常ラットから採取しても、 $\text{TNF}\alpha$ によるアポトーシスを誘導することはできなかった(表1)。すなわち、好中球はそのおかれた条件の違いによって、 $\text{TNF}\alpha$ 誘導のアポトーシスに対する感受性が大きく異なることが判明した¹³⁾。

$\text{TNF}\alpha$ に対する各群好中球の感受性の差の理由づけの一つの可能性として、各好中球細胞表面の TNF レセプターの発現量、あるいは TNF 結合能の差が考えられるので、それぞれ検討した。その結果、 $\text{TNF}\alpha$ に低い感受性しか示さない骨髓好中球の TNF レセプター数および $\text{TNF}\alpha$ 結合能は他群の好中球に比し有意に小さい値を示し、それが $\text{TNF}\alpha$ 非感受性の一因と考えられた。ところが、 $\text{TNF}\alpha$ に低い感受性しか示さない腹腔浸出好中球、および起炎剤腹腔投与後の末梢血好中

図3 種々のサイトカインの好中球アポトーシスに対する影響(12時間培養)
種々のサイトカイン存在下にヒト好中球を12時間し、アポトーシスを検討した。 $\text{TNF}\alpha$ はアポトーシスを亢進するが、G-CSF、IL-8、 $\text{IFN}\gamma$ はこれを抑制した。

表1 種々の条件下から採取された好中球のアポトーシスの比較^{*1)}
(アポトーシスの程度)

試験管内処置	末梢血好中球		腹腔浸出	骨髓
	正常	炎症	好中球	好中球
TNF	++	—	—	—
$\text{TNF}(+)$	+++	+++	—	+++
サイクロヘキシミド ^{*2)}				
TNF レセプター	+++	+++	+++	+

*1): 値は水平方向にのみ比較する。

*2): それ単独では好中球のアポトーシスを誘導しない量(1 $\mu\text{g/ml}$)のサイクロヘキシミドを $\text{TNF}\alpha$ に添加した。

球の TNF レセプター数、および TNF 結合能は、 $\text{TNF}\alpha$ 高感受性の正常ラットの末梢血好中球のそれと有意差が認められず、これらの指標からはその差を解釈できないことが明らかとなった(表1)。

TNF レセプターに差が認められないとすれば、 $\text{TNF}\alpha$ によるアポトーシスを抑制する分子が誘導された結果認められた現象であるとも解釈される。事実、癌細胞に $\text{TNF}\alpha$ を作用させると、MnSOD などの合成が誘導され、 $\text{TNF}\alpha$ の癌細胞傷害作用が抑制されるとする報告¹⁴⁾がある。また筆者らも先の研究で、蛋白合成阻害剤の一つであるサイクロヘキシミドが $\text{TNF}\alpha$ 誘導の好中球アポトーシスを増強することを見出している¹⁾。

そこで、それ単独では好中球のアポトーシスを

図 4 生体内好中球のクリアランス検査法
ラット末梢血好中球を ^{51}Cr でラベルしたあと、各ラットに i. v. し、経時的に末梢血および各臓器の放射活性を測定した。また、末梢血有核細胞、脾細胞、腹腔浸出細胞を Ficoll Paque に重層、遠沈し、中間層と pellet に分離し、それぞれの放射活性を測定することによりマクロファージは貪食された好中球(中間層)と正常好中球(pellet)にわけた。

誘導しない量のサイクロフォスファミドを $\text{TNF}\alpha$ に加え、各群の好中球を刺激し、アポトーシス誘導に対する影響を観察した。その結果、正常末梢血好中球、起炎剤腹腔投与ラットの末梢血好中球、骨髓内好中球の $\text{TNF}\alpha$ によるアポトーシスは、サイクロヘキシミド添加により、強く亢進した(表 1)。これらの好中球においては、*in vitro* において $\text{TNF}\alpha$ によって刺激されることにより、アポトーシス抑制蛋白が誘導されることが明らかとなり、炎症惹起時の末梢血好中球の $\text{TNF}\alpha$ 不反応性は、 $\text{TNF}\alpha$ 刺激時の抑制蛋白合成によって説明されることが明らかとなった。

ところが、腹腔浸出好中球の $\text{TNF}\alpha$ 誘導アポトーシスに対する抵抗性はサイクロフォスファミド添加によっても破壊されず、その抵抗性獲得の機序は上記 2 者のそれとは異なる(表 1)。おそらく好中球が血管内皮に付着し、細管内皮細胞間隙を通過してくる過程で活性化され、アポトーシス

抑制蛋白がすでに合成されてしまっているために、 $\text{TNF}\alpha$ で刺激する際にサイクロフォスファミドによって *in vitro* における蛋白合成を抑制しても、アポトーシス抑制破壊には効果を示さなかったものと考えられる。今後の研究によって明らかにしたい。

in vivo における好中球のアポトーシスにもたしかに variation が存在する

前項で *in vitro*, *ex vivo* の系における好中球アポトーシスの多様性について説明したが、この現象が炎症の機転にどのような役割を果たしているかを意義づけるには、生体内における種々の条件下において好中球がどのような運命をたどっているのかを明らかにしなければならない。そのためには、好中球の *in vivo* におけるアポトーシスの測定系を樹立しなければならない。そこで、アポトーシスに陥った好中球はマクロファージ系細胞にすみやかに貪食されるという現象¹²⁾を利用して、以下の測定系を考案した(図 4)。

まず、正常ラット末梢血好中球を分離し、 ^{51}Cr により試験管内でラベルする。ラベルした好中球を経静脈接種し、経時的に各臓器および血液の放射活性を測定する。この測定より、好中球の各臓器への分布状態がわかる。つぎに、末梢血有核細胞および自由細胞にした脾細胞については、Ficoll に重層、遠沈することにより、好中球(+)赤血球層が遠沈管底部に集合し、単核球は Ficoll と水溶液の中間層に集まる。底部にはアポトーシスに陥っていない正常好中球が存在するが、前述したように、アポトーシスに陥った好中球はマクロファージに貪食されるので、その放射活性は中間層に認められることになる。

この方法により得られた *in vivo* における好中球アポトーシスの様相は、前述した *in vitro*, *ex vivo* の結果にほぼ符号するものであった。第一点として、静脈内に移入された好中球の多くは速いスピードで大循環から消失するが、血中から消失した好中球の大部分は脾と肝に集積した。

血中の好中球の放射活性は遠沈管底部にその大部分が集積し、アポトーシスには陥っていない。一方、脾に分布する好中球の放射活性の多くは中間層に認められることから、脾の好中球の大部分

図 5 脾および腹腔内好中球の生死

^{51}Cr ラベルした末梢血好中球を i. v. し、脾細胞腹腔浸出細胞を分割し、Ficoll Paque 上で遠沈分離し、中間層と pellet にわけた。脾では、cpm が中間層に多く認められ、多くの好中球がすでにマクロファージに貪食されているが、腹腔浸出細胞では多くの cpm が pellet に認められ、好中球は貪食されずに生きている状態であることを示している。

a : spleen. b : PEC

はアポトーシスに陥り、マクロファージに貪食されているものと理解される(図 5 a)。いったん血管外に遊走した好中球は再循環しないことが知られているので、好中球は骨髄から血中に流入したのち、非常に短い半減期でアポトーシスに陥り、おもに肝、脾のマクロファージ系細胞で処理されてしまうと考えられる。

実際に、好中球が大循環系のなかでアポトーシ

図 6 炎症に伴う好中球クリアランスの修飾
プロテオースペプトン(pp)あるいは溶連菌製剤 OK-432 を i. p. 投与したラットに ^{51}Cr ラベル末梢血好中球を i. v. し、脾に集積した好中球を経時的に検討した。弱い起炎効果しか示さない pp 投与群の脾への好中球集積は未処置ラットのそれと大差が認められないが、多種のサイトカイン産生が誘導される OK-432 投与群では脾への好中球の強い集積を認めた。

スに陥るのか、また、肝、脾内の微小循環に到ってはじめてアポトーシスに陥るのかは血球の流速を加案すると決定するのは困難である。また、*in vitro* の実験結果から、好中球は形態学的に典型的なアポトーシスに陥るまえに細胞表面構造が変化し、マクロファージのヴィトロネクチンレセプターなどを介して貪食されることが明らかになっているので¹²⁾、以上に示した好中球の *in vivo* におけるクリアランスの過程で好中球のアポトーシスの像が実際認められるかは疑問の残るところである。

いずれにしても、外界からの刺激のない状態で、好中球が非常に速いスピードで血中から処理されていく現象は、どのような生物学的合目的性を有するのであろうか。

刺激剤により腹腔に浸出した好中球の運命はいかがであらうか。前述した *ex vivo* の実験結果に符号して、好中球接種後 24 時間後でも、アポトーシスに陥っている腹腔好中球はほとんど認められておらず、腹腔浸出好中球の生存時間は末梢血好中球のそれに比し、著しくながいことが、*in vivo* でも確認された(図 5 b)。

また、起炎剤を腹腔内に接種した際の血中好中

球、脾内好中球の消長を検討すると、強い炎症を起こすと考えられる OK-432 の場合は非常に速いスピードで大循環から好中球は消失し、肝、脾に集積する。一方、弱い起炎剤と考えられる proteose peptone 接種の場合は、非処理群に比し、有意に速いスピードで大循環系から去るが、OK-432 群にくらべると、かなりゆっくりとしている。肝、脾に集積する好中球数は、OK-432 群がもっとも多く、proteose peptone 群と未処理群には大差がない(図 6)。

以上の結果より、炎症に伴って *in vivo* における好中球のクリアランスの様式は変化するが、用いられた起炎剤の違いに依存して、異なった経過をたどるといえる。前述の *in vitro* の実験結果から、好中球のアポトーシスは、TNF α によって促進され、IL-1, GM-CSF, インターフェロン γ などによって抑制されるので、炎症の各局所で、いかなるサイトカインに好中球が遭遇するかによって、好中球の生死が決定されるといえる。

以上の実験結果を総合すると、好中球の生体内における生存様式は以下のようにまとめることができる。① 末梢血内の好中球は、通常数時間という短時間の半減期で大循環から離れ、肝、脾のマクロファージ系細胞で処理されている。② 炎症刺激により血管外に遊走した好中球は、24 時間後でも死ぬことがなく、長時間生存しつづける。③ 炎症に伴って好中球のクリアランス速度が変化するが、その様式は起炎剤の種類に依存して異なる。

炎症局所での好中球の生存時間の延長は、好中球の作用が局所で増殖する細菌の除去であることを考慮すると、生体防御機構の合理性を示していると考えられる。一方、ARDS, non-reflow syndrome などの病因に好中球の関与が証明されているが、その病態形成に好中球のアポトーシス化は関与しているか否か、これらの病変部位における TNF α の産生の問題とも関連し、興味深い。

文 献

- 1) Takeda, Y. et al. : Rapid acceleration of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor- α . Int. Immunol. 5 : 691-694, 1993.
- 2) Sekiya, S. et al. : Selective depletion of rat neutrophils by *in vivo* administration of a monoclonal antibody. J. Leukocyte Biol. 46 : 96-102, 1989.
- 3) Sekiya, S. et al. : Suppression of late phase enhanced vascular permeability in rats by selective depletion of neutrophils with a monoclonal antibody. J. Leukocyte Biol. 48 : 258-265, 1990.
- 4) Abe, Y. et al. : Vascular hyperpermeability induced by tumor necrosis factor and its augmentation by IL-1 and IFN- γ is inhibited by selective depletion of neutrophils with a monoclonal antibody. J. Immunol. 145 : 2902-2907, 1990.
- 5) Kudo, C. et al. : Modulation of the *in vivo* immune response by selective depletion of neutrophils using a monoclonal antibody, RP-3. I. Inhibition by RP-3 treatment of the priming and effector phases of delayed type hypersensitivity to sheep red blood cells in rats. J. Immunol. 150 : 3728-3738, 1993.
- 6) Kudo, C. et al. : Modulation of *in vivo* immune response by selective depletion of neutrophils using a monoclonal antibody, RP-3. II. Inhibition by RP-3 treatment of mononuclear leukocyte recruitment in delayed-type hypersensitivity to sheep red blood cells in rat. J. Immunol. 150 : 3739-3746, 1993.
- 7) Kudo, C. et al. : Inhibition of IL-8-induced W3/25⁺ (CD4⁺) T lymphocyte recruitment into subcutaneous tissues of rats by selective depletion of *in vivo* neutrophils with a monoclonal antibody. J. Immunol. 147 : 2196-2201, 1991.
- 8) Midorikawa, Y. et al. : Modulation of the immune response to transplanted tumors in rats by selective depletion of neutrophils *in vivo* using a monoclonal antibody : Abrogation of specific transplantation resistance to chemical carcinogen-induced syngeneic tumors by selective depletion of neutrophils *in vivo*. Cancer Res. 50 : 6243-6247, 1990.
- 9) Tanaka, E. et al. : Abrogation of tumor-inhibitory MRC-OX8⁺(CD8⁺) effector T-cell generation in rats by selective depletion of neutrophils *in vivo* using a monoclonal antibody. Int. J. Cancer 54 : 131-136, 1993.
- 10) Tamura, M. et al. : Modulation of the *in vivo* immune response by selective depletion of neutrophils using a monoclonal antibody, RP-3. III. Enhancement by RP-3 treatment of the anti-SRBC plaque forming cell response in rats. J. Immunol. 153 : 1301-1308, 1994.
- 11) Sato, T. et al. : Inhibition of corynebacterium parvum-primed and lipopolysaccharide-induced hepatic necrosis in rats by selective depletion of neutrophils using a monoclonal antibody. J. Leukoc. Biol. 53 : 144-150, 1993.
- 12) Savill, J. et al. : Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cell undergoing apoptosis. Nature 343 : 170-173, 1990.
- 13) Tsuchida, H. et al. : *In vivo* regulation of rat neutrophil apoptosis occurring spontaneously or induced with TNF α or cycloheximide. J. Immunol. 154 : 2403-2412, 1995.
- 14) Wong, G. H. W. et al. : Manganous superoxide dismutase is essential for cellular Ig resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. Cell 58 : 923-931, 1989.