ラット腹腔マクロファージの PAF 産生の調節機構

——特に 5-lipoxygenase 代謝産物の影響——

田村 泰・斉藤博幸・平井愛山・吉田 尚*

Regulatory mechanism of PAF synthesis in rat peritoneal macrophage—effect of 5-lipoxygenase metabolites—
Tai Tamura・Hiroyuki Saito・Aizan Hirai・Syô Yohsida*

platelet activating factor (PAF) は, macrophage, basophil, 多核好中球より離遊される強力な chemical mediator である. その構造式は, 1-0-alkyl-2-0-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (alkyl-acetyl-GPC) であり¹⁾, 膜リン脂質より arachidonic acid (AA) とともに遊離される alkyl-lyso-GPC より合成される. 近年 alkyl-acetyl-GPC より惹起される白血球凝集, 白血球膜顆粒に LTB₄ が関与しているといわれており^{2,3)}, さらに 5-lipoxygenase 代謝産物である 5-hydroperoxy-eicosatetraenoic acid (5-HPETE) や 5-hydroxy eicosatetraenoic acid (5-HETE) が膜リン脂質からの AA の遊離を促進するとの報告がみられる⁴⁾.

以上の事実より 5-lipoxygenase 代謝産物である 5-HPETE, 5-HETE および LTB₄ が alkyl-acetyl-GPC 合成機序にいかなる影響をもつかをみるためにラット腹腔マクロファージを用いて検討した.

材料と方法

① ラット腹腔マクロファージの調整法は既往のとおりに施行した⁵⁾.

② 5-HPETE は Terao の法⁶⁾により AA の hemoglobin catalysis によって合成し, Tri Rotor V chromatograph を使用して高速液体 chromatography によって精製した. 5-HETE は NaBH₄ によって 5-HPETE を還元して作製, さらに高速液体 chromatography によって精製した. 精製した 5-HPETE および 5-HETE の純度は 95% 以上であった. 5-HETE の同定は GCMS によって行った.

③ Ca-ionophore A 23187 で刺激し産生されたラット腹腔マクロファージでの 12-lipoxygenase 代謝産物, HETE, 11-HETE, 12-HETE, LTB₄ の分析は高速液体 chromatography によって施行した.

④ A 23187 で刺激したラット腹腔マクロファージでの ¹⁴C-alkyl-acetyl GPC の産生: 採取したラット腹腔マクロファージを 1 μ Ci ¹⁴C-alkyl-lyso-GPC で incubate し, ¹⁴C-alkyl-acyl-GPC 標識マクロファージを作製した⁷⁾. この標識マクロファージに種々の濃度のアラキドン酸カスケード阻害剤や 5-HPETE, 5-HETE または LTB₄ を加え, 1 mM CaCl₂, 0.1 mM sodium acetate の存在下で Ca-ionophore A 23187, 1 μ M で刺激した. 産生さ

れた ¹⁴C-phospholipid (¹⁴C-alkyl-acetyl-GPC, ¹⁴C-alkyl-lyso-GPC および ¹⁴C-alkyl-acyl-GPC) は Bligh and Dyer の法⁸⁾に準じて抽出し, silica TLC film plate に展開し, radioactive products は標準品および autoradiography で同定し, 各代謝産物の spot を切り取り, 液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した.

成績

標識したラット腹腔マクロファージを A 23187 で刺激すると, ¹⁴C-alkyl-acetyl-GPC の産生は用量依存性に増加し, それとともに ¹⁴C-alkyl-acyl-GPC の減少, ¹⁴C-alkyl-lyso-GPC の増加がみられた. A 23187 刺激による ¹⁴C-alkyl-acetyl-GPC 産生は, phospholipase A₂ 阻害剤である bromophenacyl bromide (BPB) の前処置により用量依存性に減少し, 逆に ¹⁴C-alkyl-acyl-GPC の増加, ¹⁴C-alkyl-lyso-GPC の増加をもたらした. A 23187 刺激のラット腹腔マクロファージに, 5-lipoxygenase の特異的阻害剤である AA-861 を添加すると用量依存性に ¹⁴C-alkyl-acetyl-GPC および ¹⁴C-alkyl-lyso-GPC の産生を抑制し, 代わって ¹⁴C-alkyl-acyl-GPC の分解を抑制した. 一方 indomethacin の添加では, なんの影響もみられなかった (図 1).

A 23187 刺激のマクロファージでの lipoxygenase 代謝産物を高速液体 chromatography で分析したところ, 主要な代謝産物は 5-HETE, LTB₄ であり, AA-861 は 5-HETE, LTB₄ の産生を特異的に抑制した.

逆に AA-861 で特異的に抑制された ¹⁴C-alkyl-acetyl-GPC の産生は, 5-HPETE および 5-HETE を外因性に添加することにより用量依存性に回復した. しかし LTB₄ にはそのような作用はみられなかった. 5-HPETE のほうが 5-HETE よりもより強力に回復させた (図 2).

さらに A 23187 刺激の標識マクロファージに外因症に 5-HPETE または 5-HETE を添加すると, ¹⁴C-alkyl-acetyl-GPC および ¹⁴C-alkyl-lyso-GPC の産生増加および ¹⁴C-alkyl-acyl-GPC の減少反応をより強力に促進した. しかし LTB₄ はなんの作用も示さなかった. 一方 A 23187 非刺激の場合, 標識マクロファージの ¹⁴C-alkyl-acetyl GPC 産生に 5-HPETE および 5-HETE 自体はなんの影響も示さなかった.

考察

alkyl-acetyl-GPC 合成は 2 つの過程を経るといわれている. すなわち, ① phospholipase A₂ の活性化により膜リン脂質よりの alkyl-acyl-GPC の水解反応による alkyl-lyso-GPC の生成と, ② acetyl-CoA acetyltransferase による alkyl-lyso-GPC より alkyl-acetyl-GPC の合成である.

* The Second Department of Internal Medicine, Chiba University School of Medicine 千葉大学医学部第二内科学教室

図1 the effect of various inhibitors of arachidonate metabolism on ^{14}C -alkyl-acetyl-GPC production in A 23187-stimulated macrophages
mean $\pm$ SD, NS: not significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

強力な phospholipase A_2 阻害剤である BPB により A 23187 刺激による標識マクロファージよりの ^{14}C -alkyl-acetyl-GPC 産生が低下したことは、alkyl-acetyl-GPC 合成の最初の段階の阻害、すなわち alkyl-lyso-GPC よりの alkyl-lyso-GPC への転換が抑制されたためと考えられる。cyclooxygenase 阻害剤である indomethacin の添加で alkyl-acetyl-GPC 産生に何の影響もみられなかったことは、AA の cyclooxygenase 代謝産物は alkyl-acetyl-GPC 合成に重要な役割を果たしていないことを意味していると考えられる。ラット腹腔マクロファージの主要なリポキゲナーゼ代謝産物は、5-lipoxygenase 代謝産物である 5-HETE, LTB_4 であり、5-lipoxygenase の阻害剤である AA-861 により 5-HETE, LTB_4 など 5-lipoxygenase の代謝産物のみその産生が抑制された。この成績は、Ashida らの報告と一致しており⁹⁾、AA-861 は 5-lipoxygenase の特異的阻害剤といえる。Siegel ら⁴⁾は、5-HPETE および 5-HETE がヒトの promyelocytic leukemic cell line HL 60 において、chemotactic peptide または Ca-ionophore で刺激した際、膜リン脂質よりの AA の遊離を促進したと述べている。したがってわれわれは、ラット腹腔マクロファージでの alkyl-acetyl-GPC 産生に 5-lipoxygenase 代謝産物が重要な役割を果たしているのではないかと考え、AA-861 で前処置したラット腹腔マクロファージにおける alkyl-acetyl-GPC の合成に及ぼす 5-lipoxygenase 代謝産物の影響を調べてみた。

AA-861 は、A 23187 で刺激した標識マクロファージでの ^{14}C -alkyl-acetyl-GPC 産生を用量依存性に抑制したが、この抑制効果は、外因性に 5-HPETE, 5-HETE を

図2 the effect of exogenously added 5-HPETE or 5-HETE on A 23187-induced ^{14}C -alkyl-acetyl-GPC production in AA-861 pretreated macrophages (mean $\pm$ SD)

加えるとみられなくなった。特に 5-HPETE, 5-HETE が減少すると alkyl-acetyl-GPC の水解反応が抑えられ、5-HPETE, 5-HETE が存在すると alkyl-acetyl-GPC の水解反応が促進されることは、5-HPETE および 5-HETE (ただし LTB_4 にはそのような作用はない) が膜リン脂質に存在する alkyl-acetyl-GPC の phospholipase A_2 を介しこの水解反応に重要な役割を果たしていることを示唆しているものといえよう。

文 献

- 1) Gemopoulos, C.A., et al.: J. Biol. Chem. 254: 9355, 1979.
- 2) Lin, A.H., et al.: J. Clin. Invest. 70: 1058, 1982.
- 3) O'Flaherty, J.T., et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 111: 1, 1983.
- 4) Siegel, M.I., et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 104: 874, 1982.
- 5) 齊藤博幸・他: 炎症 4: 25, 1984.
- 6) Terao, S., et al.: Agric. Biol. Chem. 45: 595, 1981.
- 7) Albert, D.H., et al.: J. Biol. Chem. 258: 97, 1982.
- 8) Bligh, E.G., et al.: Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911, 1959.
- 9) Ashida, Y., et al.: Prostaglandins 26: 955, 1983.