BGG 遅延型反応巣のマクロファージ遊走因子 (MCFS-1)

神原 武・川口 哲・久木田一朗・田中順子*

A chemotactic factor for macrophages (MCFS-1) in the delayed hypersensitivity skin sites to BGG A macrophage-chemotactic factor (MCFS-1) was purified from delayed hypersensitivity skin sites (DHSS) to bovine γ -globulin in guinea pigs. It was a heat-labile glycoprotein with molecular weight (MW) of 150,000, having both *in vivo* and *in vitro* chemotactic activity. Next, a precursor protein of MCFS-1 was purified from guinea pig plasma. It was a single-chain polypeptide of MW of 160,000 without chemotactic activity. However, chemotactic activity was generated in the precursor fraction during a 2- or 5-day incubation at 37°C or 4°C, respectively. This generation was inhibited by PMSF, suggesting the role of a serine protease(s). The serine protease was actually separated from the precursor fraction with a benzamidine-conjugated cellulose affinity column. The protease was of a trypsin-like character with MW of 20,000. By incubation of the precursor with the protease, macrophage-chemotactic activity which was identical immunologically and physicochemically with MCFS-1, was rapidly generated. It suggests an essential role of the protease to generate MCFS-1 in the DHSS. MCFS-1 was also found to activate macrophages to induce increased glucose consumption, release of lysosomal enzymes, and enhance O_2^- release due to cytochalasin E and wheat germ agglutinin.

Takeshi Kambara・Tetsu Kawaguchi・Ichiro Kukita・Junko Tanaka*

* Department of Allergy, Institute for Medical Immunology, Kumamoto University Medical School

key words: chemotactic factor, chemotactic factor precursor, macrophage *in vivo*, protease

炎症巣の特徴の一つである白血球浸潤は、流血中の白血球が組織内へ遊出・遊走したものであるが、それは局所の血管外に産生された遊走因子のコントロール下にあると考えられる。白血球遊走因子の研究は、主として *in vitro* で産生されたものについて Boyden's chamber 法¹⁾にて行われている。マクロファージ (M ϕ) 遊走因子についても *in vitro* の研究で多くの物質が知られ、細菌性因子、血漿由来因子、細胞由来因子 (リンパ球、多核白血球、単球、M ϕ 、線維芽細胞、血管平滑筋など由来)、細胞間物質由来因子 (コラゲン、エラスチン分解産物) および合成 formyl-methionyl peptides などにわけられる。

これらが真の炎症 mediator であるためには、炎症 mediator の条件²⁾を満足する必要がある。すなわち、

- ① その因子が *in vivo* に存在し、その炎症巣から時間的経過に相関した活性で分離精製され、性格づけがされ、
- ② その因子は原炎症の当該反応を再現し、
- ③ その因子をなくするとその反応は起こらず、
- ④ natural inhibitor を証明し、それが *in vivo* の当

該反応を抑制する。

急性炎症反応の chemical mediation を明らかにしようとする研究の一環として、筆者らは遅延型アレルギー皮膚反応巣 (DHSS) における M ϕ 遊走因子を調べた。DHSS においては反応部のびまん性の M ϕ 浸潤を特徴とするためである。

材料と方法

モルモット (300~500 g) をウシ血清グロブリン (BGG, 10 μ g/capto) の Freund's complete adjuvant 乳濁液にて免疫し、BGG に対する沈降抗体がいまだ見いだせない 7 日目に BGG (10 μ g/0.1 ml saline) を背部皮内に 12~20 個所惹起注射をした。炎症反応が最強となる 24 時間の炎症皮膚を摘出し、アセトン粉末をつくり、67 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で 4 時間抽出した^{3,4)}。

M ϕ 遊走活性は、Boyden 法¹⁾で測定した。流動パラフィンによる 4 日目の腹腔浸出細胞を 10% FCS 加 RPMI 1640 液 (pH 7.2) に懸濁 (5×10^5 cells/ml) し、37°C 90 分 5% CO_2 下で浮置し、遊走 M ϕ 数を 5 視野 (10×40 倍) かぞえ遊走活性とした^{3,4)}。

抽出液中の M ϕ 遊走因子 (MCFS) は、硫安分画後 DE 52, CM-Sephadex によるカラムクロマト法により

* 熊本大学医学部免疫医学研究施設アレルギー部門

表 1 MCFS の免疫吸収

試料	濃度 (OD 280)		吸収された遊走活性 (%)	
	濃度 (OD 280)	Mφ 遊走活性	抗 MCFS-1 アフィニティーカラム	抗 IgG アフィニティーカラム
抽出液	3.5	107	50	23
MCFS-1	0.05	257	84	2
MCFS-2	0.1	133	0	10
MCFS-3	1.0	105	16	47

精製した。

血漿中の MCFS-1 前駆物質 (pre MCFS-1) は、プロテアーゼ抑制物質 (EDTA, PMSF, DFP, polybrene) 存在下で DE 52, lysine-Sepharose, CM-Sephadex, 等電点分画法の順に用い精製した⁵⁾。

内因性の pre MCFS-1 活性化プロテアーゼ (chemotactic precursor activating protease, CPAP) は、pre MCFS-1 を benzamidine-cellulose affinity chromatography により分取した⁶⁾。プロテアーゼ活性は、合成蛍光ペプチド基質を使用して測定した⁶⁾。

Mφ のグルコース消費は、小野崎らの方法⁷⁾により、24~72時間培養後の上清中のグルコース量をグルコース和光キットにて測定した。ライソゾーム酵素は N-acetyl-β-glucosaminidase (NAβ-gluc) および β-glucuronidase (β-gluc) 活性を蛍光合成基質を用いて測定した⁸⁾。O₂ 産生放出は cytochrome C (Cyt C) 還元法にて、O₂ 産生増強効果は中川原の方法に従い⁹⁾、MCFS-1 と Mφ を培養後 cytochalasin E (Cyt E), wheat germ agglutinin (WGA) を添加後に放出される O₂ を Cyt C 還元法にて測定した。endotoxin 量は原田らの方法¹⁰⁾により、合成基質 Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-MCA 水解活性にて測定した。

結果と考察

(1) BGG 遅延型反応巣の Mφ 遊走因子 (MCFS)

BGG による DHSS 抽出液は、Mφ 遊走活性を示し、その活性は原炎症の肉眼的強さと相関して増減した。対照の正常モルモット皮膚抽出液、非免疫モルモットの BGG 注射24時間皮膚抽出液には、ほとんど遊走活性を示さなかった。

MCFS は、3 分画 (MCFS-1, 2, 3) に分離され、MCFS-1 は、488 倍に精製され、polyacrylamide disc gel electrophoresis (PAGE) にて単一バンドを示した。MCFS-1 は易熱性で、56°C 30 分の加熱で活性の 90% を失い、分子量はゲル濾過法にて 15 万, pI 6.7-6.9, 免疫拡散法、免疫吸着法で IgG と異なることがわかり (表 1)。抗 C3, 抗 C5 カラムに吸着されない^{3, 4)}。したがって補体由来性、IgG 由来物質ではなく、既報のいずれの因

図 1 内因性トリプシン様プロテアーゼ (CPAP) による pre MCFS-1 からの Mφ 遊走活性の出現

*pre MCFS-1 を 37°C で 8 時間温置

子とも異なる新しい Mφ 遊走因子であることがわかった。さらに正常モルモット皮内に注射すると Mφ 浸潤を起こし、原炎症の組織像と酷似していた。MCFS-1 は、寒天電気泳動で抗モルモット血清抗体と単一の沈降線をつくり、MCFS-1 が血清由来因子の可能性が示された。

MCFS-2⁴⁾は、DE 52 クロマトで MCFS-1 と分離され、抗 MCFS-1 抗体、抗 IgG 抗体と沈降線をつくらず、活性の吸収もない (表 1)。この分画には強い C5 溶血活性があるので、C5 由来因子の可能性が強い。euglobulin 分画の Mφ 遊走活性は部分的に抗 IgG 抗体で吸収されるので、IgG 由来因子 (MCFS-3)⁴⁾であると考えている (表 1)。

DHSS 抽出液中の相対活性は、抗 MCFS-1 および抗 IgG カラムによる免疫吸収から、MCFS-1 が 50%、MCFS-3 が 23% と考えられた (表 1)⁴⁾。

以上 MCFS-1 は、炎症 mediator の条件のうち、*in vivo* に存在し、活性が炎症の強さの時間的経過と相関し、*in vivo* において原炎症の Mφ 浸潤を再現した、という点を満足している。

(2) 血漿中前駆物質 (pre MCFS-1) の分離と性格

血漿中の MCFS-1 と共通抗原性を示す物質を分離した⁵⁾。精製標品は SDS-PAGE で単一バンドをつくり、還元状態でも不変であるので 1 本鎖蛋白と考えられる。分子量はゲル濾過法で 16 万、抗 C3, 抗 C5 抗体と沈降線をつくらない。精製標品は Mφ 遊走活性はないが、37°C 8 時間、または 4°C 5 日浮置すると強い Mφ 遊走活性が出現する (図 1)。しかし、PMSF 存在下では起こらない。またこの遊走活性の出現は、1 本鎖蛋白の前駆物質が 2 本鎖蛋白に切断される時期と一致している。さらに遊走活性の出現と限定分解の両者とも PMSF で抑制されるので、この精製分画にセリンプロテアーゼが存在し作用している可能性を示している。

(3) 内因性セリンプロテアーゼと MCFS-1 産生における役割

前駆物質分画を benzamidine-cellulose affinity column に通すと、プロテアーゼが活性化され分離された。

CPAP とよぶ⁶⁾。このプロテアーゼは易熱性で、分子量はゲル濾過で 2 万、SDS-PAGE で 2.3 万であり、³H-acetylcasein を分解し、合成蛍光基質 Boc-Phe-Ser-Arg-MCA(トリプシン基質)と Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-MCA (Factor X, 補体因子 $\bar{D}$ 基質)を水解した。本プロテアーゼの Boc-Phe-Ser-Arg-MCA 水解活性はカゼイン水解活性と相関し、DFP, PMSF, Trasylol, SBTI, TLCK にて抑制されるが、TPCK, chymostatin, PCMB, EDTA では抑制されなかったため、本プロテアーゼはトリプシン様プロテアーゼと考えられた。

最適基質のアミノ酸配列からして、本プロテアーゼは凝固因子 Xa と補体因子 $\bar{D}$ を除く既報のいずれの血漿プロテアーゼとも異なる。Xa は DFP に抵抗性であり、分子量は 4 万～5.1 万、さらに CPAP は $\bar{D}$ 因子による溶血活性を示さなかったため、新しい血漿プロテアーゼと考えられる。本プロテアーゼを pre MCFS-1 に作用させると M ϕ 遊走活性が出現した(図 1)。

以上の成績から、pre MCFS-1 の活性化に二つの段階、すなわち、① CPAP の latent form からの自己活性化と、② 活性化プロテアーゼによる pre MCFS-1 の活性化、が必要であろうと考えられる。このことが自然活性化に時間が必要である理由でもあろう。事実、活性化したプロテアーゼを pre MCFS-1 分画に加えると、遊走活性出現までの期間は 1/16 に短縮した⁶⁾。

重要なことは、CPAP が pre MCFS-1 自体から由来したものか、すなわち pre MCFS-1 はプロテアーゼの zymogen かということである。CPAP のアミド分解活性は、抗 MCFS-1 抗体で 70% 抑制される。これには二つの可能性、すなわち、① zymogen により作成した抗体は、プロテアーゼの活性中心に結合できず、したがって多分 allosteric hindrance による抑制が完全に起こらない、② 分画中のプロテアーゼが heterogenous で全活性中の 70% が CPAP によるということである。もし後者が本例の場合だとすると、混在するプロテアーゼは CPAP にきわめて類似することになる。これらの理由から、筆者らは、pre MCFS-1 はプロテアーゼの zymogen と考えているが、この zymogen 由来プロテアーゼが MCFS-1 を産生するプロテアーゼであると結論するのは、時期早尚であらう。

MCFS-1 が DHSS で産生されるメカニズムについては不明であるが、上記 *in vitro* で産生された M ϕ 遊走因子が MCFS-1 と免疫学的、物理化学的に同一であったことは、DHSS における M ϕ 遊走因子産生に、本プロテアーゼが重要な働きをしている可能性を示している。

一方、トリプシン様酵素は、DHSS 抽出液^{11,12)}や感作リンパ球抽出液^{13,14)}にも存在している。したがってこれらのトリプシン様酵素が pre MCFS-1 を遊走活性化

図 2 MCFS-1 による M ϕ 游りのライソゾーム酵素 N-acetyl- β -glucosaminidase の放出

するかどうかわかる必要がある。

(4) MCFS-1 によるマクロファージの活性化

① グルコース消費の亢進

M ϕ を MCFS-1 (pre MCFS-1 を活性化した標品, 20 μ g/ml)とともに培養すると、対照(培養液)よりグルコース消費が亢まり、培養24時間で検出できるようになり、48, 72時間になると対照との差は明らかとなった。

② ライソゾーム酵素の放出

MCFS-1 (20 μ g/ml) の存在下で M ϕ を培養すると、opsonized zymosan (50 μ g/ml) よりは少し弱い、MDP (40 μ g/ml) よりは少し強い NA β -gluc, β -gluc の放出がみられた。この現象は培養時間とともに亢進し、濃度依存性に亢まった(図 2)。

③ O₂⁻ 産生・放出

MCFS-1 単独刺激では O₂⁻ 産生放出はみられない。しかし M ϕ を MCFS-1 と培養後 Cyt E と WGA で刺激すると、Cyt C 還元は有意に上昇し、一方、それは superoxide dismutase により完全に阻止された。M ϕ の O₂⁻ 産生放出は 15 分の処理時間で有意に上昇し、30 分で頂点に達し、60 分後には対照値にもどり、加来ら¹⁵⁾が報告した MDP, LPS の効果と類似していた。混在する LPS 量は 1～3 ng/ml 以下で、MCFS-1 の活性はそれよりはるかに高いものであった。

以上の成績は、MCFS-1 は M ϕ に働き、細胞遊走を起こすのみならず、グルコース消費を亢進し、ライソゾーム酵素の放出を起こし、O₂⁻ 産生放出増強効果を有することがわかり、DHSS において MCFS-1 は M ϕ を活性化して遊走させるとともに上記現象を介して反応に参画していると考えられる。

考 按

in vivo における M ϕ 遊走因子については、平島ら¹⁶⁾、本田ら^{17,18)}は、DNP-ascaris 抽出液による過敏症皮膚反応巣およびツベルクリン反応皮膚巣より、3 種の M ϕ 遊走因子(IgG 由来因子、C5 由来因子、リンホカイン遊走因子)を分離精製している。抽出液中での活性比は、前者の 24 時間炎症巣のそれでは 60:30:10、ツベルクリン 24 時間巣のそれでは 35:5:60 であると報告している。筆

者らの MCFS-1 は50%, MCFS-3 は23% である。また本田ら^{17,18)}のリンホカイン遊走因子は分子量11万で、 Ia^+ $M\phi$ を特異的に遊走させ、IgG, C5 由来因子は Ia^- $M\phi$ を特異的に遊走させることを見いだしている。また、ツベルクリン反応初期には、IgG 由来、C5 由来 $M\phi$ 遊走因子の活性が強く、 $M\phi$ の多くは Ia^- であることも報告されている。これらのことは、炎症の種類と時間経過によって産生される主要な $M\phi$ 遊走因子に差があるということとともに、遊走・浸潤する $M\phi$ 側にも違いがあり、 $M\phi$ の subpopulation についての示唆を与えていると思われる。

結 論

BGG を抗原とするモルモットの遅延型アレルギー反応巣に、少なくとも3種の $M\phi$ 遊走因子(MCFS-1, 2, 3)がある。もっともつよい活性を示す MCFS-1 は、分子量15万、pI 6.8 易熱性の糖蛋白で、10万と6万の2本鎖よりなり、抗 C3, 抗 C5, 抗 IgG 抗体にて活性は吸収されず、リンホカイン遊走因子とも異なるものである。一方、正常モルモット血漿中に前駆物質があり、それは分子量16万、pI 5.3 の1本鎖蛋白で、C3, C5 溶血活性をもたず、 $M\phi$ 遊走活性もないが、4°C 5日あるいは37°C 8時間温置すると遊走活性が出現する。これは分子量2万の内因性トリプシン様酵素により限定分解を受け、2本鎖の MCFS-1 になるためであることがわかった。この活性化された pre MCFS-1 は、 $M\phi$ を活性化して遊走を起こすほか、 $M\phi$ のグルコース消費を亢進し、ライソゾーム酵素の細胞外遊離を起こし、cytochalasin E や wheat germ agglutinin による O_2^- 産生を亢進する。かくして *in vivo* にて遅延型反応に参画していることが推定される。

本研究は、上田啓司、岡元勉、前田省三氏との共同研究によるものである。また文部省科学研究費補助金の援助と、MDP を分与された第一製薬中央研究所村上直人氏とに感謝します。

文 献

- 1) Boyden, S.: The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.* 115: 453-466, 1962.
- 2) Hayashi, H.: The intracellular neutral SH-dependent protease associated with inflammatory reactions. *Int. Rev. Cytol.* 40: 101-151, 1975.
- 3) Kambara, T., Ueda, K., Maeda, S.: The chemical mediation of delayed hypersensitivity skin reactions. I Purification of a macrophage-chemotactic factor from bovine- γ -globulin induced skin reactions in guinea pigs. *Am. J. Pathol.* 87: 359-374, 1977.
- 4) Ueda, K., Kambara, T.: The chemical media-
- tion of delayed hypersensitivity skin reactions. II Characterization of a macrophage-chemotactic factor from bovine- γ -globulin-induced skin reactions in guinea pigs. *Am. J. Pathol.* 92: 241-252, 1978.
- 5) Ueda, K., Kawaguchi, T., Okamoto, T., Kambara, T.: The chemical mediation of delayed hypersensitivity skin reactions. III Purification and characterization of a precursor protein for macrophage-chemotactic factor in normal guinea pig plasma. *Am. J. Pathol.* 108: 291-298, 1982.
- 6) Kawaguchi, T., Ueda, K., Yamamoto, T., Kambara, T.: The chemical mediation of delayed hypersensitivity skin reactions. IV Activation of chemotactic factor precursor by a trypsin-like protease in guinea pig plasma. *Am. J. Pathol.* 115: 307-315, 1984.
- 7) Onozaki, K., Haga, S., Ichikawa, M., Homma, Y., Miura, K., Hashimoto, T.: Production of an antibody against guinea pig MIF. III Biological activity of MIF recovered from immunosorbent column chromatography. *Cell Immunol.* 61: 165-175, 1981.
- 8) Schnyder, J., Baggiolini, M.: Secretion of lysosomal hydrolases by stimulated and nonstimulated macrophages. *J. Exp. Med.* 148: 435-450, 1978.
- 9) Nakagawara, A., Kayashima, K., Tamada, R., Onoue, K., Ikeda, R., Inokuchi, K.: Sensitive and rapid method for determination of superoxide generation activity of blood monocyte and its use as a probe for monocyte function in cancer patients. *Gann* 70: 829-833, 1979.
- 10) Harada, T., Morita, T., Iwanaga, S.: A new assay method for bacterial endotoxins using horseshoe crab clotting enzyme. *J. Med. Enzymol.* 3: 43-60, 1978.
- 11) Kambara, T., Hashimoto, M.: An alkaline protease in the delayed hypersensitivity skin lesions in the guinea-pigs. *Experientia* 35: 1110-1111, 1979.
- 12) Nakamura, T., Yamamoto, T., Ishimatsu, T., Kambara, T.: A high-molecular-weight trypsinlike protease in the skin sites of delayed hypersensitivity in guinea pigs. *Am. J. Pathol.* 114: 250-263, 1984.
- 13) Kambara, T., Hirata, M., Hiraoka, T.: Neutral proteases in the guinea-pig lymphocytes. *Experientia* 34: 526-527, 1978.
- 14) Kambara, T., Kawagoe, T., Nakamura, T.: An alkaline proteinase which has inflammatory activity isolated from guinea pig lymphoid cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 716: 224-231, 1982.
- 15) Kaku, M., Yagawa, K., Nagao, S., Tanaka, A.: Enhanced superoxide anion release from phagocytes by muramyl dipeptide of lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 39: 559-564, 1983.
- 16) Hirashima, M., Honda, M., Hayashi, H.: The

mediation of tissue eosinophilia in hypersensitivity reaction. II Separation of a delayed eosinophil-chemotactic factor from macrophage-chemotactic factors. *Immunology* 31: 263-271, 1976.

- 17) Honda, M., Hirashima, M., Nishiura, M., Hayashi, H.: A macrophage chemotactic factor sharing common antigenicity with immunoglobulin G from DNP-*Ascaris* extract-induced

skin lesion in guinea-pigs. *Virchows Arch. B Cell. Path.* 27: 317-333, 1978.

- 18) Honda, M., Hayashi, H.: Characterization of three macrophage chemotactic factors from PPD-induced delayed hypersensitivity reaction sites in guinea pigs, with special reference to a chemotactic lymphokine. *Am. J. Pathol.* 108: 171-183, 1982.