サイトカインによるヒト MAP キナーゼの 特異的活性化と好中球機能 — IL-1 による p 38 活性化の役割 —

鈴木賢一・羽藤文彦・北川誠一*

mini review

INFLAMMATION AND REGENERATION

Cytokine-specific activation of distinct MAP kinase subtype cascades in human neutrophils stimulated by cytokines and the role of MAP kinases in neutrophil activation

We investigated activation of MAP kinase subtype cascades in human neutrophils stimulated by cytokines and the role of MAP kinases in neutrophil activation. Distinct MAP kinase subtype cascades were activated in human neutrophils stimulated by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), tumor necrosis factor- α (TNF) and interleukin-1 β (IL-1). G-CSF selectively activated the MEK-ERK cascade, and IL-1 selectively activated the MKK 3/6-p 38 cascade, respectively. GM-CSF activated the MEK-ERK cascade strongly and the MKK 3/6-p 38 cascade weakly. TNF activated the MKK 3/6-p 38 cascade strongly and the MEK-ERK cascade weakly. The potency of these cytokines to activate the MEK-ERK cascade was GM-CSF > G-CSF = TNF, whereas that to activate the MKK 3/6-p 38 cascade was TNF > GM-CSF > IL-1. JNK was not activated by any cytokine. GM-CSF- and TNF-induced superoxide release and adherence were inhibited by PD 98059 (MEK inhibitor) as well as SB 203580 (p 38 inhibitor). IL-1, a selective activator of p 38 cascade, also induced superoxide release and up-regulation of CD 11 b and CD 15, and both responses were inhibited by SB 203580. The results show that (a) G-CSF, GM-CSF, TNF and IL-1 activated the distinct MAP kinase subtype cascade in human neutrophils; (b) activation of ERK and p 38 is involved in superoxide release and adherence induced by cytokines.

Rec. 12/10/2001, Acc. 3/15/2002, pp 453~460

Kenichi Suzuki・Fumihiko Hato・Seiichi Kitagawa*

key words : neutrophils, cytokines, MAP kinases, superoxide, adherence

ヒト好中球機能は、interleukin-1 β (IL-1), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), granulocyte-macrophage CSF (GM-CSF), tumor necrosis factor- α (TNF) および IL-8 などによりすみやかに活性化される。これらのサイトカインによる好中球の活性化は病原微生物に対する生体防御能を増強させるが、過度の活

性は炎症部位の組織傷害を増強させる。これらのバランスが炎症の制御と組織修復にとって重要と考えられる。

また、mitogen-activated protein kinase (MAPK) カスケードは、さまざまな細胞における主要な細胞内シグナル伝達系の一つであり、哺乳動物の細胞においては少なくとも三つのサブタイプ、すなわち extracellular signal-regulated kinase (ERK), p 38 MAPK (p 38) および c-Jun

* Department of Physiology, Osaka City University Medical School 大阪市立大学医学部第二生理学教室

図1 IL-1によるMKK3/6-p38カスケードの活性化
好中球をIL-1(25または300 U/mL), G-CSF(50 ng/mL), GM-CSF(5 ng/mL)またはTNF(100 U/mL)で刺激した。p38およびATF-2のリン酸化はリン酸化型分子を認識する抗体を用いて解析した。

A: 10分間の刺激により, TNF>GM-CSF>IL-1(300 U/mL)の順で強くp38はリン酸化された。

B: IL-1によって濃度依存性および時間依存性にp38リン酸化は増強した。

C: ATF-2を基質としてp38キナーゼ活性を解析した。

D: IL-1によるMKK3/6リン酸化を解析した。

E: Bのデンシトメトリーの結果を示す。

amino-terminal kinase(JNK)が存在する^{1,2)}。これらのMAPKは上流の特異的なMAPKキナーゼ(MAPKK)によってスレオニンおよびチロシン残基がともにリン酸化されることにより活性化される。活性化MAPKはセリン/スレオニンキナーゼとしてそれぞれの下流に作用する。一般に, ERKカスケードは細胞増殖や分化に関与し, p38およびJNKカスケードはストレス応答やアポトーシスに関与するとされている。終末分化を遂げた成熟好中球においても, さまざまな刺激によってこれらのMAPKカスケードが活性化されることが近年明らかになった^{3~5)}。

本稿では, サイトカインによるヒト好中球MAPK活性化と好中球機能制御について, 最近の知見を概説する。

サイトカインと好中球機能

流血中の好中球は正常なヒトでは未刺激の状態にあり, その代謝活性は低い。好中球は炎症部位で産生されたさまざまなサイトカインによってすみやかに活性化され, その機能を発揮する。炎症反応においては主としてマクロファージからIL-1とTNFが早期に産生・分泌される。これらのサ

図 2 IL-1 による ERK の活性化
IL-1 刺激によつては極微弱な ERK リン酸化を認めるのみであった。
B: A をさらに長時間露光した。

イトカインは血管内皮細胞や線維芽細胞に作用して G-CSF や GM-CSF の産生を誘導する。また G-CSF および GM-CSF はマクロファージからも産生される。炎症時にみられる好中球数の増加は主として G-CSF の産生増加による。IL-1, G-CSF, GM-CSF および TNF はいずれも好中球のさまざまな機能を亢進させる⁶⁾。

好中球に対する機能亢進作用(プライミング作用)の強さは TNF>GM-CSF>G-CSF=IL-1 である。一方、IL-1, TNF および GM-CSF は、好中球に作用して直接スーパーオキシド産生を誘導する(トリガリング作用)。その強さは TNF>GM-CSF>IL-1 である。G-CSF にはトリガリング作用はない。このような作用の類似点および相異点は、サイトカイン受容体以降の細胞内シグナル伝達系の相異を反映していると考えられる。

白血球に対する走化性因子活性を有するサイトカインを総称してケモカイン(chemokines; chemotactic cytokines)とよんでいる。ケモカインはその構造から CXC および CC ケモカインに大別できる。一般に、CXC ケモカインは好中球に

作用して遊走および活性化作用を示し、CC ケモカインは単球およびリンパ球に作用してさまざまな生物活性を示す。炎症部位において、IL-1 や TNF は血管内皮細胞に作用して CXC ケモカインである IL-8 の発現を誘導し、さらに多くの好中球を動員する。IL-8 のスーパーオキシド産生誘導作用はきわめて弱く、炎症部位への好中球の動員とプライミング作用が IL-8 の主な生理的作用と考えられる。

IL-1 による p 38 特異的活性化と好中球機能

IL-1 の好中球に対する作用としては、プライミング作用やトリガリング作用のほかに、生存延長効果、遊走、脱顆粒および細胞伸展の誘導が報告されている⁷⁻¹¹⁾。しかし IL-1 受容体以降の好中球活性化機序はこれまで明らかではなかった。そこで IL-1 刺激による MAPK サブタイプの活性化を解析した⁵⁾。IL-1 により、MAPK サブタイプのうちで MKK 3/6-p 38 系が選択的に活性化された(図 1)。p 38 のリン酸化は 10 分間の IL-1 刺激ではその濃度依存性に増強した(至適濃度: 300 U/mL)。IL-1 (300 U/mL) 刺激 1 分後には p 38 リン酸化の増強が認められ、10 分で最大となった。p 38 活性化に及ぼす作用の強さは、トリガリング作用における同様に TNF>GM-CSF>IL-1 であった。ERK の活性化はきわめて微弱であった(図 2)。また、JNK は G-CSF, GM-CSF および TNF 刺激の場合と同様、IL-1 刺激によっても活性化されなかった³⁻⁵⁾。

IL-1 には、TNF と比較すると弱いながらもトリガリング作用が認められた(図 3)。IL-1 および TNF によるスーパーオキシド産生は p 38 特異的阻害剤(SB 203580)により抑制された(図 3)⁵⁾。したがって、これらのサイトカインによるスーパーオキシド産生には p 38 が関与すると考えられた。

つぎに、IL-1 刺激による好中球膜上への CD 11b(β 2 インテグリン)および CD 15(P-セレクトリンリガンド)発現を解析した。IL-1 および TNF 刺激により CD 11b と CD 15 発現は増強し、それらの発現増強は SB 203580 により阻害された(図

図3 IL-1およびTNF刺激により誘導されるスーパーオキシド産生に及ぼすp38特異的阻害剤の影響

SB 203580はIL-1およびTNF刺激により誘導されるスーパーオキシド産生を阻害した。

4)^{5,12)}。したがって、IL-1およびTNFによるCD 11bとCD 15の発現増強にもp38が関与すると考えられた。CD 11bおよびCD 15分子は細胞表面に存在するばかりでなく、好中球の特殊(二次)顆粒中にも存在している¹³⁾。p38活性化は細胞骨格アクチンの再構成を介して、脱顆粒によるβ2インテグリンの発現増強を誘導する可能性が考えられる^{14,15)}。

サイトカインによるMAPKサブタイプカスケードの特異的活性化と好中球機能

これまでの研究からG-CSF、GM-CSF、TNFおよびIL-1はヒト好中球に作用して特定のMAPKサブタイプカスケードを特異的に活性化することが明らかとなった(図5)^{3~5)}。すなわち、G-CSFはMEK-ERK系を特異的に活性化し、GM-CSFはMEK-ERK系を強く活性化するばかりでなく、MKK 3/6-p38系も活性化する。一方、IL-1はMKK 3/6-p38系を特異的に活性化し、TNFはMKK 3/6-p38系を強く活性化するばかりではなく、MEK-ERK系も活性化する。前述のp38ばかりでなくERKの活性化も、これらのサイトカインにより誘導される好中球のスーパーオキシド産生と接着に関与している^{3~5,16)}(図5)。スーパーオキシド産生酵素はNADPH オキシ

図4 IL-1およびTNFによる好中球膜上へのCD 11bおよびCD 15発現増強とp38特異的阻害剤による抑制

IL-1(300 U/mL)またはTNF(100 U/mL)で30分間刺激した後にそれぞれの発現をフローサイトメトリーで解析した。必要に応じてSB 203580で20分間前処理した。

- A: インキュベーションのみでもCD 11bの発現は増強したが、IL-1刺激によりさらに発現が増強した。TNF刺激によってはさらに強い発現増強が認められた。
- B: Aの感度を上げて、IL-1によるCD 11b発現増強に対するSB 203580の効果を探索した。SB 203580の前処理によって、IL-1によるCD 11b発現増強は抑制された。
- C: IL-1またはTNFによってCD 15発現が増強した。
- D: MHCクラスI分子の発現はIL-1およびTNF刺激による影響を受けなかった。

ダーゼともよばれ、細胞膜および細胞質に局在する複数の構成要素から形成されている。ERKおよびp38はその細胞質因子の一つであるp47-phoxのセリン残基をリン酸化することにより、NADPH オキシダーゼを活性化する可能性が考

図 5 サイトカインによる MAPK サブタイプカスケードの特異的活性化

G-CSF, GM-CSF, TNF および IL-1 はそれぞれ特定の MAPK サブタイプを活性化する. ERK と p38 はともにスーパーオキシド産生と接着に関与している.

えられる¹⁷⁾. しかし MEK-ERK 系を特異的に活性化する G-CSF にはトリガリング作用が認められないことから, MEK-ERK 系の活性化のみではトリガリング作用は発揮されず, MEK-ERK 系と同時になんらかのシグナルがトリガリング作用には必要であると考えられる.

また ERK および p38 はスーパーオキシド産生や接着以外にもいくつかの好中球機能に関与する. たとえば, ERK はミオシン軽鎖キナーゼを活性化することにより食作用に関与し¹⁸⁾, p38 は NF- κ B の活性化および TNF 産生に関与すると報告されている^{19,20)}.

ケモカインである IL-8 は, ERK と p38 をともに活性化するが, IL-8 による走化性の誘導にはこれらの MAPK 系は関与しないと報告されている²¹⁾.

MEK-ERK 系は, 造血幹細胞を含む未熟な造血細胞において主として増殖に関与すると考えられているが, 成熟した好中球においても特定の機能発現に関与していることが明らかになった. このことは, 同じシグナル伝達分子でも細胞の分化段階に応じてその機能的役割が変化することを示している.

JNK の活性化は, 正常造血前駆細胞を含めさまざまな細胞において, TNF 刺激により認められ

図 6 血管内皮細胞における IL-1 刺激による MAPK サブタイプカスケードの活性化

ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞を低濃度 IL-1 (25 U/mL) および TNF (100 U/mL) で刺激した. いずれのサイトカインにおいても三つの MAPK サブタイプがすべて強く活性化された.

るが, 好中球ではいずれのサイトカイン刺激によっても認められない^{3~5)}. すなわち, JNK カスケードは好中球に分化成熟するに伴って失われると考えられる. このことは, 同一のサイトカイン受容体から生ずるシグナルも細胞の分化段階によって異なることを示している.

好中球に対する IL-1 と TNF の作用の相異

IL-1 と TNF は炎症部位においてほぼ普遍的に産生される. マクロファージから産生・分泌された IL-1 と TNF は血管内皮細胞に作用して, 血管内皮細胞上の E-セレクトインや ICAM-1 (CD 11 b/CD 18 リガンド) の発現を亢進させる⁶⁾. その結果, 流血中の好中球は血管内皮細胞に強く接着し

図7 好中球膜上のIL-1 II型受容体の役割
炎症局所に動員された好中球はII型受容体を介してIL-1をトラップすることにより、局所のIL-1濃度を低下させて、過度の炎症の進行を抑制する役割を果たしていると考えられる。

て、血管内皮層を通り抜けて炎症部位へ遊走する。低濃度のIL-1(25 U/mL)およびTNF(100 U/mL)はヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞に作用して、ERK, p 38およびJNKすべてのMAPKサブタイプを同程度に強く活性化した(図6)⁵⁾。血管内皮細胞をはじめとして、さまざまな細胞においてIL-1とTNFの作用には類似性が認められるが、ヒト好中球に対する作用には大きな違いがある⁵⁾。TNFには強いトリガリング作用があるが、IL-1のトリガリング作用は弱く、高濃度(至適濃度: 300 U/mL)を必要とする。またCD 11bおよびCD 15の発現増強作用についても同様に、TNFにより強く認められるが、IL-1刺激ではきわめて弱い(図4)。この作用の強さの差異はp 38活性化の強さの違いによると考えられる。

IL-1にはI型とII型の2種類の受容体が存在する^{22,23)}。IL-1のシグナルはI型受容体を介して細胞内に伝達される。II型受容体に結合してもシグナルは伝達されないため、decoy receptor(おとり受容体)ともよばれる²³⁾。好中球には両方の受容体が発現しているが、II型受容体の発現が優位である。このことが好中球の活性化には比較的高濃度のIL-1が必要である原因と考えられる。一方、

血管内皮細胞膜上にはシグナルを伝達するI型受容体のみ発現されており、きわめて低濃度(10~25 U/mL)のIL-1により活性化される(図6)⁵⁾。好中球膜上にIL-1のII型受容体が優位に発現している生理的意義としては、炎症局所に動員された好中球がII型受容体を介してIL-1をトラップすることにより、局所のIL-1濃度を低下させて、炎症を抑制する方向に作用する可能性が考えられる(図7)⁵⁾。

おわりに

ヒト好中球において、サイトカイン特異的に特定のMAPKサブタイプが活性化され、サイトカインによる好中球のスーパーオキシド産生および接着にはERKとp 38が関与することが明らかとなった。未熟な造血細胞ばかりでなく、成熟好中球においても、MAPKはその機能発現に重要な役割を担っている。同じシグナル伝達分子でも、細胞の分化段階に応じてその機能的役割が変化することは大変興味深い²⁴⁾。好中球活性化におけるMAPKカスケードの生理的役割とその制御機構を明らかにすることにより、炎症性疾患の制御は

かりでなく、高サイトカイン血症で特徴づけられるSIRS(全身性炎症反応症候群: systemic inflammatory response syndrome)に対する治療手段の開発も可能になると考えられる。また、好中球は生体防御の最前線で病原微生物と闘う戦士であるが、炎症局所における過度の炎症の進行と組織傷害を防ぐための、巧妙な活性化制御のメカニズムをみずから持ち合わせていると考えられる¹⁶⁾。

文 献

- 1) Widmann C, Gibson S, Johnson GL: Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79: 143-180, 1999.
- 2) Kyriakis JM, Avruch J: Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81: 807-869, 2001.
- 3) 鈴木賢一, 羽藤文彦, 北川誠一: ヒト好中球 MAP キナーゼサブタイプのサイトカイン(G-CSF, GM-CSF, TNF)特異的活性化と活性酸素産生. *炎症* 19: 157-165, 1999.
- 4) Suzuki K, Hino M, Hato F, Tatsumi N, Kitagawa S: Cytokine-specific activation of distinct mitogen-activated protein kinase subtype cascade in human neutrophils stimulating by granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and tumor necrosis factor- α . *Blood* 93: 341-349, 1999.
- 5) Suzuki K, Hino M, Kutsuna H, Hato F, Sakamoto C, Takahashi T, Tatsumi N, Kitagawa S: Selective activation of p38 mitogen-activated protein kinase cascade in human neutrophils stimulated by IL-1 β . *J Immunol* 167: 5940-5947, 2001.
- 6) 北川誠一: 食細胞の機能発現とサイトカイン・接着分子. *臨床免疫* 30: 1013-1019, 1998.
- 7) Yagisawa M, Yuo A, Kitagawa S, Yazaki Y, Togawa A, Takaku F: Stimulation and priming of human neutrophils by IL-1 α and IL-1 β : Complete inhibition by IL-1 receptor antagonist and no interaction with other cytokines. *Exp Hematol* 23: 603-608, 1995.
- 8) Clotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A: Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 80: 2012-2020, 1992.
- 9) Brandolini L, Bertini R, Bizzarri C, Sergi R, Caselli G, Zhou D, Locati M, Sozzani S: IL-1 β primes IL-8-activated human neutrophils for elastase release, phospholipase D activity, and calcium flux. *J Leukocyte Biol* 59: 427-434, 1996.
- 10) Sullivan GW, Carper HT, Sullivan JA, Murata T, Mandell GL: Both recombinant interleukin-1(β) and purified human monocyte interleukin-1 prime human neutrophils for increased oxidative activity and promote neutrophil spreading. *J Leukocyte Biol* 45: 389-395, 1989.
- 11) Dularay B, Elson CJ, Clements-Jewery S, Damais C, Lando D: Recombinant human interleukin-1 β primes human polymorphonuclear leukocytes for stimulus-induced myeloperoxidase release. *J Leukocyte Biol* 47: 158-163, 1990.
- 12) Tandon R, Sha'afi RI, Thrall RS: Neutrophil β 2-integrin upregulation is blocked by a p38 MAP kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 270: 858-862, 2000.
- 13) Borregaard N, Cowland JB: Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 89: 3503-3521, 1997.
- 14) Matsumoto T, Yokote K, Tamura K, Takemoto M, Ueno H, Saito Y, Mori S: Platelet-derived growth factor activates p38 mitogen-activated protein kinase through a Ras-dependent pathway that is important for actin reorganization and cell migration. *J Biol Chem* 274: 13954-13960, 1999.
- 15) Peppelenbosch M, Boone E, Jones GE, von Deventer SJH, Haegeman G, Fiers W, Grooten J, Ridley AJ: Multiple signal transduction pathways regulate TNF-induced actin reorganization in macrophages: inhibition of cdc42-mediated filopodium formation by TNF. *J Immunol* 162: 837-845, 1999.
- 16) Suzuki K, Hasegawa T, Sakamoto C, Zhou YM, Hato F, Hino M, Tatsumi N, Kitagawa S: Cleavage of mitogen-activated protein kinases in human neutrophils undergoing apoptosis: Role in decreased responsiveness to inflammatory cytokines. *J Immunol* 166: 1185-1192, 2001.
- 17) Benna JE, Han J, Park JW, Schmid E, Ulevitch RJ, Babior BM: Activation of p38 in stimulated human neutrophils: phosphorylation of the oxidase component p47^{phox} by p38 and ERK but not JNK. *Arch Biochem Biophys* 334: 395-400, 1996.
- 18) Mansfield PJ, Shayman JA, Boxer LA: Regulation of polymorphonuclear leukocytes phagocytosis by myosin light chain kinase after activation of mitogen-activated protein kinase. *Blood* 95: 2407-2412, 2000.
- 19) Detmers PA, Zhou D, Polizzi E, Thieringer R, Hanlon WA, Vaidya S, Bansal V: Role of stress-activated mitogen-activated protein kinase (p38) in β 2-integrin-dependent neutrophil adhesion and the adhesion-dependent oxidative burst. *J Immunol* 161: 1921-1929, 1998.
- 20) Nick JA, Avdi NJ, Young SK, Lehman LA, McDonald PP, Frasch SC, Billstrom MA, Henson PM, Johnson GL, Worthen GS: Selective activation and functional significance of p38 α mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-stimulated neutrophils. *J Clin Invest* 103: 851-858, 1999.
- 21) Knall C, Worthen GS, Johnson GL: Interleukin 8-stimulated phosphatidylinositol-3-kinase activity regulates the migration of human neutrophils independent of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinases. *Proc*

- Natl Acad Sci USA 94 : 3052-3057, 1997.
- 22) Dinarello CA : Biologic basis for interleukin-1 in disease. Blood 87 : 2095-2147, 1996.
- 23) Colotta F, Re F, Muzio M, Bertini R, Polentarutti N, Sironi M, Giri JG, Dower SK, Sims JE, Mantovani A : Interleukin-1 type II receptor : A decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. Science 261 : 472-475, 1993.
- 24) 北川誠一 : 好中球の分化と機能制御シグナル. 分子細胞治療 2 : 131-137, 2001.