

綜 説

好中球の細胞内情報伝達機構

安 井 耕 三

信州大学医学部小児科学教室

Signal Transduction in Neutrophils

Kozo YASUI

Department of Pediatrics, Shinshu University School of Medicine

Key words: neutrophil, signal-transduction, superoxide, chemotaxis

好中球, 細胞内情報伝達, 活性酸素, 遊走能

I はじめに

好中球は侵入した微生物を貪食し殺菌する。この機能は、免疫反応とともに生体防御機構の1つとして重要である。一方、近年好中球が心筋再灌流障害、呼吸促進症候群、脳変性疾患等における組織障害に深く関与することが示されている。好中球は、種々の走化性因子の濃度勾配を感知し、感染部位あるいは病巣部位に集合する。好中球は炎症の場で二次的の刺激を受け、代謝変化を引き起こし活性酸素などの毒性物質を放出し殺菌を行っている。毒性物質が過量に産生されると正常細胞、組織に無差別な障害が発生する。組織障害を引き起こす好中球は、一般に通常状態よりさらに活性化された状態にある。本稿ではこうした病態における好中球の代謝変化、活性化機構について最近の知見を踏まえ概説したい。

II 好中球の生理と生化学

A 膜とリセプター蛋白

細胞は生体膜(細胞膜)に被われているが、この細胞膜がただ単に細胞を外界から区画・保護する目的だけでなく、細胞機能に深く関与しており細胞内情報伝達に重要な役割を持つことが明らかとなっている。

別刷請求先: 安井 耕三

〒390 松本市旭3-1-1 信州大学医学部小児科

生体において細胞膜脂質として広く存在するのはリン脂質であり、ホスファチジルイノシトール (PI)、ホスファチジルセリン (PS) などの酸性リン脂質とホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE) などの中性リン脂質に大別される。特に酸性リン脂質は、負荷電をしており蛋白質を構成する塩基性アミノ酸の正荷電とともに相互作用し、Cキナーゼに代表される酵素の活性化に重要な影響を与えている。

生体膜において、脂質が二重構造を呈し膜に蛋白質(リセプター蛋白, G蛋白: guanine nucleotide binding protein など)が挿入されているという機能モデルは、1972年に Singer と Nicolson¹⁾により提唱された。その理論のユニークな点は、膜が流動性を持つということであった。その後X線解析法やESR(電子スピン共鳴装置)で脂質スピンプローブを用いることにより、生体膜の二重構造が確定し、膜の流動性も証明された。脂質分子は回転や側方拡散といった運動を行っており、膜に浮遊している状態の膜蛋白質も同様に運動している。膜に存在する脂質は、温度や化学的変化に伴い相転位(ゲル相⇌流動相)を起こすため、浮遊している膜蛋白どうしが(たとえば受容体とG蛋白質)衝突をする事態が予測される。この衝突という現象はenzymeの活性化に重要な役割を果たしている。リガンドと結合した受容体が、G蛋白質と共役しCキ

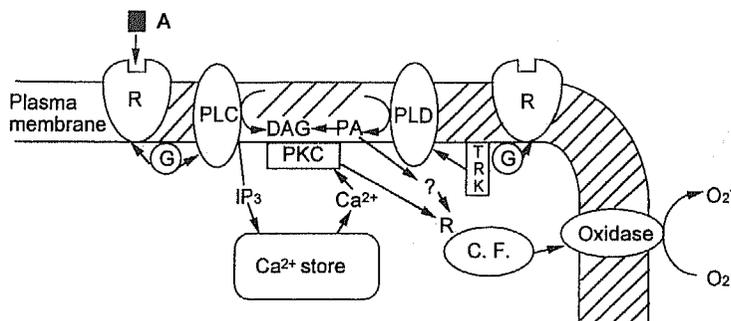


図1 好中球における oxidase 活性化にいたる細胞内情報伝達機構
ホスホリパーゼC (PLC) およびD (PLD) 活性化の情報はリガンド(A)のレセプター(R)結合からG蛋白質(G)の共役を通じて提供される。PLD 活性化にはチロシンリン酸化 (TRK) を必要とする。一部の反応は、Ca イオン・Cキナーゼ (PKC) 依存性である。C. F.: cytosol factors

ナーゼ系などの情報伝達系にスイッチが入る。この反応は化学的にも脂質依存性であるという特徴を有しており、ジアシルグリセロール (DG), ホスファチジン酸 (PA) がセカンドメッセンジャーとして作用する。

多くのリガンドレセプターはG蛋白質と共役するが、G蛋白質は単一な物質ではなく数多くの subtype が存在し、総称としてG蛋白質スーパーファミリーと呼ばれている。機能および構造が明らかにされているのはそのうちのいくつかであり、明らかにされていないものも相当数存在する。一般的にG蛋白質は、GTPと結合し次いでGTPが水解されることによって受容体機能の可逆的修飾が生じ、情報伝達のスイッチ機構として作用している。この過程で百日咳毒素は、GDP → GTP 交換反応による受容体との共役を遮断する。またコレラ毒素はGTPaseによるGTPの水解を阻害し、酵素の不活性化を抑制する。これらの作用を利用し、G蛋白質の細胞機能における役割が検討されてきた。食細胞機能発現に必要とされる酵素群 [phospholipase A₂ (PLA₂); phospholipase C (PLC); phospholipase D (PLD)] は、いずれもG蛋白質と共役して活性化される²⁾⁻⁵⁾が、それぞれ異なったG蛋白質との共役が考えられている⁵⁶⁾。

多くの細胞膜受容体では、G蛋白質を介して情報伝達が行われるが、受容体刺激が直接内在する酵素に情報を伝える受容体も存在する。その代表的存在がEGF, PDGFなどの増殖因子に対する受容体でありターゲット酵素はチロシンキナーゼである。しかしチロシンキナーゼの中の非受容体型チロシンキナーゼと呼ばれる一群の酵素はG蛋白質を介して活性化される。

好中球ではこの非受容体型チロシンキナーゼが多く存在し⁷⁾、細胞内情報伝達機構に関与している。

細胞内情報伝達において、リン脂質の代謝によってセカンドメッセンジャーが生成される。PLA₂はアラキドン酸 (AA) を産生し、PLCの活性化によりPI (ホスホイノシチド), PC (ホスファチジルコリン) を基質としてIP₃ (イノシトール1,4,5,-三リン酸), DGがつくられる。従来植物酵素としてニンジンやキャベツにのみ存在すると考えられてきたPLDも最近ヒト (特に好中球) において、情報変換酵素として位置づけられている⁹⁾⁻¹¹⁾。PLDはリン脂質 (おもにPC) を基質としてPAを生成する。近年になってヒト好中球のほか神経組織にもPLDが存在することが明らかとなった¹²⁾。今日では、PAおよびDGの両セカンドメッセンジャーはともにPLDの酵素活性により生成され、NADPH oxidaseの主力な情報伝達源と認識されている¹³⁾¹⁴⁾。PLDによって当初PAが産生されるが、その一部はホスホヒドラーゼの作用でDGに変換される。一方DGキナーゼは、DGからPAへの変換を担っている。すなわち両メッセンジャーの量は、リン酸化・脱リン酸化の相互転換により調節されている。PAはアルコール存在下で、速やかにホスファチジルエタノール (PEt) に転換されPLD活性の測定上有用な指標になる。同時にアルコールによる細胞機能の修飾によりPLD活性のシグナル伝達における重要性が検討される。PLC, PLDは単一な酵素ではなく、おのおの分子多様性がある。

PLCでは4つのβタイプ、2つのγタイプ、3つのδタイプのアイソザイムが存在する。それぞれの酵

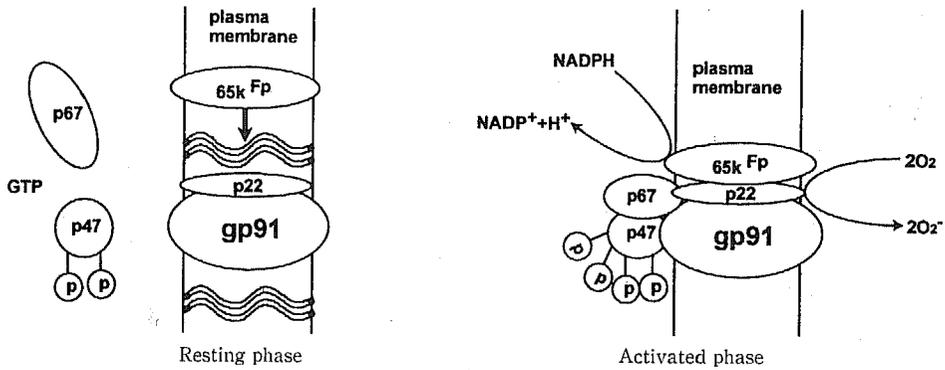


図2 NADPH oxidase 活性化の分子モデル

NADPH oxidase の活性化には、フラビン蛋白 (Fp)・シトクロム b_{558} ・p47と p67の細胞質因子が必要不可欠な要素である。

素は前述したようにG蛋白質，チロシンキナーゼ，Caイオンなどによる調節を多様に受けている(図1)。

以上に述べたように，細胞膜・受容体・リン脂質・膜流動性は酵素の活性化，セカンドメッセンジャーの産生に重要な役割を果たしており，好中球機能発現を生化学的に捉える上で常に検討されるべき事項となっている。

B 殺菌の生化学

細菌感染において好中球の果たす役割は重要であるが，特に貪食した菌を殺菌する過程での細胞内情報伝達機構が集中して検討され明らかとなっている。好中球では異物を貪食する際，あるいは細菌由来の走化性ペプチド(N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine: FMLP)やロイコトリエン B_4 ，インターロイキン8(IL-8)，phorbol myristate acetate (PMA)など種々の可溶性刺激物質，サイトカインにより刺激されると様々な代謝変化が起こる。その中でも特に殺菌作用に重要な反応は，活性酸素の産生である。

1 NADPH oxidase

活性酸素にはスーパーオキシド(O_2^-)，過酸化水素(H_2O_2)，ヒドロキシラジカル($HO\cdot$)などがある。これら活性酸素はおもに殺菌のために使用されており，遺伝性疾患の慢性肉芽腫症(chronic granulomatous disease: CGD)患者では好中球の殺菌機能の欠失のため，易感染性を呈することはよく知られている。

好中球による活性酸素産生反応を触媒している酵素がNADPH oxidase(NADPH- O_2 -産生酵素)である。反応は以下のように進み，NADPHが酸素を還元す

る電子供与体となっている。



活性化された好中球において，NADPH oxidaseは細胞膜に局在しており活性酸素産生は五炭糖リン酸回路の亢進と並行して上昇する。スーパーオキシド(O_2^-)は，過酸化水素に変換され金属イオン存在下に，ヒドロキシラジカル($HO\cdot$)となるほか次亜塩素酸(HOCl)やモノクロルアミンなどの障害性の強い酸化剤の生成に関与している。過剰なスーパーオキシドの産生が，リウマチ性疾患や心筋梗塞での組織障害に関与していることもよく知られている事実である。

NADPH oxidase活性は細胞膜分画に存在するが，不活性型の存在部位はまだ明らかでない。これらことはNADPH oxidaseが複合酵素であること，その活性化には構成成分の一部が細胞質から細胞膜に移行する必要があることなどの理由によっている。NADPH oxidaseの構成成分としてフラビン蛋白質(Fp)，シトクロム b_{558} ，細胞質因子(cytosol factors)などが挙げられる。フラビン蛋白質はNADPH oxidaseによる電子伝達構成成分として関与すると考えられる¹⁵⁾。しかしながら現在までのところ活性酸素産生に必要とされるフラビン蛋白の分離精製，アミノ酸同定は成功していない。シトクロム b_{558} は2つのサブユニット α 鎖(22k)， β 鎖(91k)からなるヘテロダイマーである。すでに両サブユニットに対するcDNAはクローニングされている¹⁶⁾¹⁷⁾。シトクロム b_{558} 鎖の異常が伴性劣性遺伝で古典型CGDの病因である。好中球を嫌気下で刺激するとシトクロム b_{558} の還元がみられ，また好气的条件下でのシトクロム b_{558}

の還元反応も O_2^- 産生を説明するのに十分な反応速度を有している。これらのことからシトクロム b_{558} が終末酸化酵素と考えられている¹⁹⁾。

細胞質因子として p47, p67 の 2 因子が精製され、両者の cDNA もクローニングされている¹⁹⁾²⁰⁾。p47 は 390 個, p67 は 526 個のアミノ酸からなっていることが知られている。これらの因子は *src*, *rasp21GAP* といった非受容体型チロシンキナーゼと一部相同性を有しており、細胞内情報伝達におけるリン酸化の重要ターゲット分子である可能性が高い。そのほかの細胞質因子についての詳細は不明な点が多いが、p47 および p67 は常染色体劣性遺伝形式をとる慢性肉芽腫症において欠損する蛋白である²¹⁾²²⁾。

好中球を FMLP など刺激すると、両因子が細胞膜へ移行することが p47 と p67 に対する抗体を用いて示された²³⁾。両因子の細胞膜への移行は、これらの蛋白のリン酸化とよく相関しこの移行に細胞内骨格の関与も認められている²⁴⁾。NADPH oxidase の活性化過程で細胞質因子の膜への移行は、重要なイベントと考えられる。X-linked シトクロム b_{558} 欠損 CGD 患者の好中球においては p47 因子の膜への移行も障害されており、シトクロム b_{558} の存在が細胞質因子の膜への移行集合に必須と考えられている²⁵⁾。p67 の膜への移行は p47 の膜への移行に依存して起こる²²⁾。

以上の現象をまとめると図 2 のようになる。最終的に NADPH oxidase の活性化が認められる部位 (NADPH 結合蛋白) は、シトクロム b_{558} や細胞質因子ではないことが判明し²⁶⁾、Fp を含む NADPH 結合蛋白は不活化の状態ではシトクロムと遊離して膜に存在すると考えられる。

2 NADPH oxidase の活性化機構

すでに述べたように種々の可溶性刺激物質は好中球の活性酸素生成を刺激する。受容体 (リセプター) を介する外因 (細菌) 性走化性因子としてよく知られるホルミルペプチドである FMLP もその 1 つである。ここでは FMLP 刺激による細胞内情報伝達機構に注目し、受容体刺激から NADPH oxidase の活性化の過程を論じたい。

FMLP は、非常に強力な好中球走化性因子である²⁷⁾。トリチウムでラベルした FMLP を用いた検討により nanomolar 程度の解離定数 (Kd) を持つリセプターの存在が知られ²⁸⁾²⁹⁾、また近年リセプターの cDNA もクローニングされた³⁰⁾。この受容体はおもに細胞膜に表出しているが、二次顆粒中にも存在し細胞

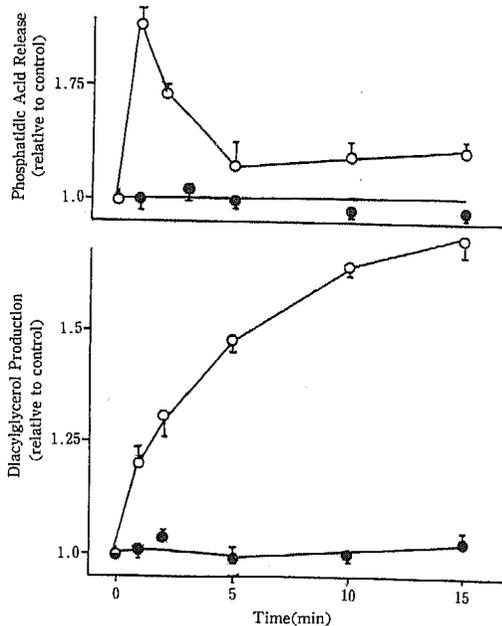


図 3 1 μ M FMLP 刺激による好中球 PA · DG 産生時間曲線 (37°C) (文献⁴²⁾より)

対照 (○), erbstatin (10 μ g/ml; チロシンキナーゼインヒビター) 1 時間処理好中球 (●)。³H ラベルミリスチン酸によりラベルされた PA · DG を薄層クロマト法にて検出した。

内にプールされており細胞の遊走の際には濃度勾配の認識に役だっている。FMLP の受容体への結合は短時間 (half time < 5min) で行われ、FMLP 受容体は G 蛋白とカップリングする。前述したように G 蛋白質は単一ではなく LTB_4 や $C5a$ などそれぞれの走化性因子ごとに異なった G 蛋白が関与している可能性がある。FMLP 受容体にカップリングする G 蛋白は百日咳菌毒素に感受性があり、この毒素による好中球の処理により活性酸素産生能、遊走能などほとんどの好中球機能が完全に抑制される³¹⁾³²⁾。さらに個々に細胞内情報伝達機構を検討すると、FMLP 刺激では PLC 活性化²⁾³³⁾、PLD 活性化⁶⁾³⁴⁾、チロシンリン酸化⁷⁾³⁵⁾、細胞内 Ca 濃度変化の抑制³⁶⁾が観察される。

3 Protein kinase C (PKC) の関与

FMLP 受容体刺激に引き続くセカンドメッセンジャーとして 80 年代の前半に PKC 活性が注目された。活性酸素産生における PKC の関与は膜リセプターを介さずに直接 PKC を活性化するホルボールエステル (PMA) 刺激では明らかであるが、FMLP 刺激時に

は判然としない。FMLP 刺激による PLC 活性化が IP_3 増加を介して細胞内 Ca 濃度を上昇させ、DG 産生と相まって PKC を活性化し、セリン・スレオニン残基を有する蛋白をリン酸化 (特に 47kDa 蛋白) し、活性酸素産生を促すという一連の反応³⁷⁾は非常に簡明に細胞内情報伝達機構を説明するかに思われたが、これに対するいくつかの反証がなされてきた。PIP₂ を基質とする DG の絶対量の不足、DG 産生動態と O₂⁻ 産生動態との乖離については複数の報告がある³⁸⁾⁻⁴⁰⁾。また PKC の特異的 inhibitor とされる H-7 処理によって FMLP 刺激による活性酸素産生は抑制されない⁴¹⁾⁴²⁾などである。ただし PKC inhibitor を用いた実験結果に関しては、PKC の isozyme の存在と inhibitor の抑制選択性に疑念がもたれており⁴³⁾、FMLP による活性酸素産生における PKC の関与を完全に否定するものではない。以上の報告を考え併せると FMLP 刺激の情報伝達経路には、PKC 以外のメディエーターの存在が強く示唆される。

4 ホスホリパーゼ D (PLD) 活性

FMLP または C5a 刺激による活性酸素産生系において PLC 以外に PLD の関与とその重要性が報告されている⁴³⁾⁴⁴⁾⁴⁵⁾。ホスファチジルコリン (PC) を基質として産生された PA は、PA hydrolase により速やかに DG に変換される (図 3)。また PA はエタノール存在下で直ちに phosphatidylethanol (PEt) となるが PA の PEt 変換は同時に活性酸素産生を抑制する (図 4)。これらの結果は、好中球における活性酸素産生に PLD 活性が深く関与していることを示している。

PLD 活性化は PLC 活性化とは異なる G 蛋白 (ARF) の活性化に引き続いて起こる⁵⁰⁾。PLD 活性化は細胞内 Ca イオン依存性であり¹¹⁾、チロシンリン酸化を必要とする⁴²⁾⁴⁷⁾。GM-CSF、TNF (tumor necrosis factor) は、PLD 活性のレベルで好中球機能のプライミングをすることが知られ、PA の産生上昇は活性酸素産生の増強に比例している⁴⁸⁾⁴⁹⁾。活性酸素産生反応におけるセカンドメッセンジャーとしてはこれまで DG が重要視されていたが、PA にもその作用があると報告もみられ注目される⁵⁰⁾。しかしながら DG および PA がこの代謝過程においてまったく同様の役割を持つか否かについては結論が得られていない。

C 遊走の生化学

遊走能 (走化能: chemotaxis) は、走化性因子 (chemotactic factor: CF) の濃度勾配に従い移動す

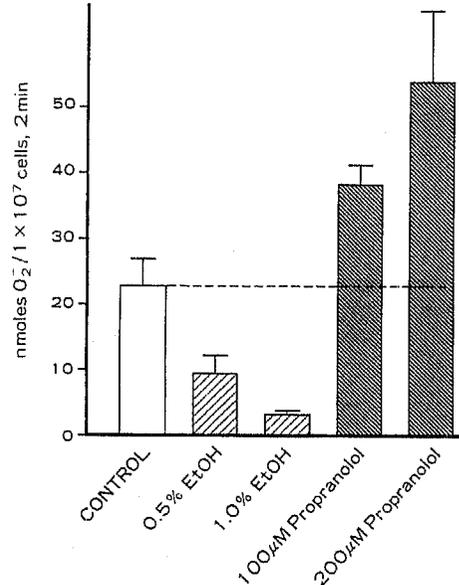


図4 好中球活性酸素産生に対するエタノール・propranolol の影響 (文献⁴²⁾より)

1 μ M FMLP 刺激による好中球活性酸素産生能。37°C、5 分間エタノールまたは propranolol にて preincubation を行った。

る「方向を持った運動能」であり、好中球が炎症の場に到達する上で必要不可欠な機能である。これらのことは好中球遊走能低下を示す症例の多くに易感染性がみられることから明らかである。

好中球膜上には CF を認識するリセプターが存在している。ラベルした FMLP を用いて調べると、ヒト末梢血好中球には細胞 1 個あたり 2~5 万 (Kd: 23 nM) のリセプターが存在している²⁸⁾²⁹⁾⁵¹⁾⁵²⁾。このリセプターは、二次顆粒中にも含まれ⁵³⁾、細胞膜との間で recycling し細胞遊走中の CF の濃度勾配を感知する。CF の認識により好中球膜上の接着蛋白 (セレクトリン、インテグリンファミリー) 発現が増強され、好中球は血管内皮に付着し、ついで CF の濃度勾配に従って炎症の場へ遊走する⁵⁴⁾。

好中球の遊走に関わる細胞内情報伝達機構については、完全には解明されていない。現在までのところ G 蛋白質の関与³²⁾、一過性の細胞内 Ca イオン濃度の上昇⁵⁵⁾は遊走運動に重要な役割を持つとされている。好中球の運動装置として、直径 20nm 前後の微小管、直径 6~7 nm のアクチンおよびミオシンフィラメントが挙げられる⁵⁶⁾。アクチン線維の重合による収縮と、

離合による伸展運動の調節は、アクチン結合蛋白⁵⁷⁾や gelsolin と呼ばれる蛋白⁵⁸⁾が行っている。これらの蛋白の機能調節にはホスホリパーゼCが関与している⁵⁹⁾。FMLPを始めとするCFの作用直後に、一過性の細胞内Caイオン濃度上昇がみられ、それに伴い微小管重合が起こることが電顕的に観察されている⁶⁰⁾。コルヒチンによる微小管重合阻害、サイトカラシンBによるアクチン重合阻害はいずれも好中球の走化能を低下させる。走化能のエネルギー源は活性酸素産生と同様嫌氣的解糖に依存している。

さらにマイクロフィラメント群は、ATPase 活性化により収縮し運動が出現する。ATPase 活性化にはミオシンI鎖のリン酸化が必要とされる⁶¹⁾が、詳細は不明である。

われわれは走化能とチロシンリン酸化、ホスホリパーゼD活性の関わりを検討し⁴²⁾、次のような結果を得ている。すなわち活性酸素産生に重要な役割を果たすPLD活性のセカンドメッセンジャーであるPA産生を修飾するプロプラノロール (PA→DG変換酵素阻害剤)、エタノール (PA→PEt) 処理によりO₂⁻産生が修飾されるのに比し、走化能には影響がなかった⁴²⁾

(図4)。一方チロシンキナーゼインヒビターであるerbstatin, herbimycin Aの処理では、走化能、O₂⁻産生能ともに濃度依存性に抑制された⁴²⁾。チロシンキナーゼインヒビターは細胞内Caイオンに影響を与えないため、チロシンリン酸化が細胞遊走発現においても重要であると推察された。

FMLP刺激による好中球のチロシンリン酸化は、複数の蛋白に及んでいる⁷⁾。特にリン酸化される41kDaの蛋白はMAPキナーゼであり⁶²⁾、微小管の機能はこのキナーゼの支配下にある⁶³⁾。これらの事実からも走化能とチロシンリン酸化の深い関わりが示唆される。細胞の運動にはアクチン、ミオシンの収縮運動のみではなく流動的な伸展運動も必要とされる。この調節にはgelsolin蛋白が重要である。Gelsolinは重合したアクチン分子を解離させる。細胞の運動過程ではアクチン、ミオシンの重合、解離が有機的に営まれなくてはならない。近年この調節過程にも、膜脂質やリン酸化の関与が推察されているが⁶⁴⁾、その詳細は今後の研究の進展に委ねられている。

以上述べたように走化能発現の情報伝達機構には、O₂⁻産生系との間に大きな差異が認められる。FMLPのように同一のCFが、濃度の差によって異なった機能発現を促すという点は非常に興味深い。これらの情

報は、細胞遊走という現象のみに限らず炎症における白血球浸潤や種々の感染疾患の病態を理解する上でも重要である。

III 疾患時における好中球の代謝動態

A 好中球と臓器障害

好中球は侵入した微生物を貪食し、殺菌する。この働きは、免疫反応とともに生体防御機構の1つとして重要なものである。一方近年好中球が、エンドトキシンショック、心筋再灌流障害、呼吸促進症候群、リウマチ様関節炎などの疾患における臓器・組織障害に関わることが判明した。好中球から放出される活性酸素は非常に毒性が強く、正常組織にも無差別に障害を与える。組織障害性を有する好中球は一般に活性化された状態にあり(プライミング)、種々の特異的代謝変化や反応を伴っている。本章では、これらの病態における好中球活性化機能につきわれわれのデータを含め概説する。

1 エンドトキシンショック

大腸菌に代表されるグラム陰性桿菌感染による敗血症は、しばしばエンドトキシンショック(ES)を引き起こす。細菌の外膜構成成分であるlipid Aの変性物質であるリポ多糖類(lipopolysaccharide: LPS)が、いわゆるエンドトキシンである。LPSはマクロファージを活性化し、tumor necrosis factor- α (TNF- α)やinterleukin-1 β (IL-1 β)の産生を刺激する⁶⁵⁾⁶⁶⁾。旧来LPSにより放出されたTNFによる直接の組織障害や、TNFによる二次的な好中球活性化がESの成因と考えられていた。事実TNF- α による好中球活性化、活性酸素産生増強に関して多くの報告がある⁶⁷⁾⁶⁹⁾。

ES時の生体内でのLPS濃度は、50pg~1ng/mlである。この濃度は*in vitro*の実験で直接好中球をプライミングするLPS濃度(100ng~1 μ g/ml)に比べ、きわめて低値であった。ところが近年血中にLPS結合蛋白(LBP)が存在し、LPS+LBP複合体の形成により細胞膜抗原CD14を介して食細胞を活性化する機序が判明した⁷⁰⁾。CD14は好中球にも表出しており、筆者らは生理的濃度(pg~ng/ml)のLPSが血清存在下にCD14を介して好中球活性酸素産生プライミングを行うことを報告した⁷¹⁾。この過程を細胞内情報伝達機構に注目し解析すると、PLD活性のレベルですでに増強されており⁷²⁾⁷³⁾、G蛋白質の一部細胞膜への移行が認められた。

以下に述べる事実からESにおける好中球の組織障害への関与が強く示唆される。すなわち血管内皮細胞を用いた実験系では、LPSおよび血清の処理により好中球のインテグリン蛋白の発現増強、細胞接着率の上昇が認められる⁷⁴⁾。

2 サイトカインの影響

好中球機能に影響を与えるサイトカインとして前述したTNFのほか、GM-CSF、G-CSF、IL-1、IFN- γ 、IL-8、IL-12が挙げられる。感染、炎症の場、創傷治癒の過程でこれらのサイトカインは好中球に対し、接着蛋白の表出、遊走惹起、活性酸素産生促進などの作用を及ぼす。

IL-8はおもに血管内皮細胞・マクロファージで産生され、好中球のみならずT細胞、好塩基球に対しても多様な作用を示すポリペプチドであり、1987年にその精製⁷⁵⁾、cDNAクローニング⁷⁶⁾がなされた。好中球に対してIL-8は、遊走因子(CF)として働く他、活性酸素産生、脱顆粒を引き起こし接着分子発現を増強する。IL-8は細菌感染、炎症の場で細菌由来のFMLP、補体因子とともに好中球集簇を惹起するために重要な役割を果たしている。IL-8のリセプターは、FMLPリセプターと同一性が高く細胞内情報伝達機構はFMLPに近いと推測されている。

GM-CSF、G-CSFは、好中球減少時の感染症対策・治療に使用されその臨床的価値は高い。GM- γ 、G-CSFともに末梢血好中球数を増加させるのみならず、好中球機能に直接影響することが知られている。好中球機能に対する作用としては、活性酸素産生能の増強、好中球粘着能の亢進(接着分子の発現増強)、短時間での遊走能亢進・長時間培養での運動能低下がある。このような作用はプライミングと呼ばれ、プライミングされた好中球では、FMLPやIL-8などの二次的な刺激によりさらに機能が増強される。

プライミング作用はG-CSFに比べてGM-CSFがより強力であり、用量依存性も若干異なっている⁷⁷⁾。GM- γ 、G-CSFの血液細胞に対する作用機序については、すべて詳細に判明しているわけではない。特にG

-CSFの作用機序についての報告は少ない。しかし現在までの検討を比較すると概ね類似した機序によると推察される。

そこでここではGM-CSFの好中球細胞内代謝・情報伝達への作用につき概説する。

GM-CSFは*in vivo*、*in vitro*でともに強い好中球機能プライミング作用を持つ。さらにGM-CSFによる細胞内pHの上昇(Na⁺/H⁺交換システム;アルカリ化⁷⁸⁾)、走化性因子リセプターの修飾⁷⁹⁾、細胞内蛋白のチロシンリン酸化⁸⁰⁾などが知られている。このチロシンリン酸化は数種の蛋白におよび、その中でMAPキナーゼのリン酸化が同定された⁸¹⁾。GM-CSFにより直接Na⁺/H⁺ポンプやG蛋白質の活性化が起こる⁸²⁾。膜脂質、リピッドメディエーターにも影響し⁸³⁾、接着蛋白を膜表面に表出させる⁸⁴⁾が、ここにもチロシンリン酸化の関与が考えられている。以上の効果は、活性酸素産生におけるセカンドメッセンジャー産生系であるPLD活性増強につながり⁴⁸⁾、好中球機能が最終的に増強される。一方GM-CSFにはPLC活性の増強効果が無いことが報告されている⁸⁵⁾。このことは、ホスホリパーゼCおよびD活性はおのおの別個のG蛋白により支配されるということの傍証になった⁸⁾。こうした一連のGM-CSFの作用は、ときとして生体に不利に働き、実際GM-CSF投与例に成人呼吸促進症候群(ARDS)発症がみられ、留意が必要である⁸⁶⁾。

TNF- α にもチロシンリン酸化、PLD活性増強⁴⁹⁾など、好中球機能に影響を持つサイトカイン作用機序も明らかにされている。

IV おわりに

好中球機能とその生化学的側面につき述べたが、研究途上で流動的な部分もありそのすべてが明らかでないわけではない。各種疾患における好中球の役割は、最近特に注目されている。本稿が病態における好中球の代謝特性を理解し、生体にとりより有効な治療・薬剤の使用がなされる一助となることを期待する。

文 献

- 1) Singer SJ, Nicolson GL: The fluid mosaic model of the structures of cell membranes. *Science* 175: 720-731, 1972
- 2) Kikuchi A, Kozawa O, Kaibuchi K, Katada T, Ui M, Takai Y: Direct evidence for involvement of a guanine nucleotide-binding protein in chemotactic peptide-stimulated formation of inositol biphosphate and triphosphate in differentiated human leukemic (HL-60) cells. *Reconstitution with Gi, Go of the*

- plasma membranes ADP-ribosylated by pertussis toxin. *J Biol Chem* 261 : 11558-11562, 1986
- 3) Sha'afi RI, Molski TFP : Activation of the neutrophil. *Prog Allergy* 42 : 1-64, 1988
 - 4) Agwu DE, McPhail LC, Chabot MC, Daniel LW, Wykle RL, McCall CE : Choline-linked phosphoglycerides. A source of phosphatidic acid and diglycerides in stimulated neutrophils. *J Biol Chem* 264 : 1405-1413, 1989
 - 5) Crockroft S, Thomas GMH, Fensome A, Geny B, Cunningham E, Gout I, Hiles I, Totty NF, Truong O, Hsuan JJ : A downstream effector of ARF in granulocytes. *Science* 263 : 523-526, 1994
 - 6) Mullmann TJ, Cheewatrakoolpong B, Anthes JC, Siegel MI, Egan RW, Billah MM : Phospholipase C and phospholipase D are activated independently of each other in chemotactic peptide-stimulated human neutrophils. *J Leukoc Biol* 53 : 630-635, 1993
 - 7) Berkow RL, Dodson RW : Tyrosine-specific protein phosphorylation during activation of human neutrophils. *Blood* 75 : 2445-2452, 1990
 - 8) Pai J-K, Siegel MI, Egan RW, Billah MM : Phospholipase D catalyzes phospholipid metabolism in chemotactic peptide-stimulated HL-60 granulocytes. *J Biol Chem* 263 : 12472-12477, 1988
 - 9) English D, Taylor G, Garcia JGN : Diacylglycerol generation in fluoride-treated neutrophils: involvement of phospholipase D. *Blood* 77 : 2746-2756, 1991
 - 10) Kanaho Y, Kanoh H, Nozawa Y : Activation of phospholipase D in rabbit neutrophils by fMet-Leu-Phe is mediated by a pertussis toxin-sensitive GTP-binding protein that may be distinct from a phospholipase C-regulating protein. *FEBS lett* 279 : 249-252, 1991
 - 11) Roger Kessels GC, Roos D, Verhoeven AJ : fMet-Leu-Phe-induced activation of phospholipase D in human neutrophils. *J Biol Chem* 266 : 23152-23156, 1991
 - 12) Sandmann J, Wurtman RJ : Stimulation of phospholipase D activity in human neuroblastoma (LA-N-2) cells by activation of muscarinic acetylcholine receptors or by phorbol esters: relationship to phosphoinositide turnover. *J Neurochem* 56 : 1312-1319, 1991
 - 13) English D, Taylor GS : Divergent effects of propranolol on neutrophil superoxide release: involvement of phosphatidic acid and diacylglycerol as second messengers. *Biochem Biophys Res Commun* 175 : 423-429, 1991
 - 14) Perry DK, Hand WL, Edmondson DE, Lambeth JD : Role of phospholipase D-derived diradylglycerol in the activation of the human neutrophil respiratory burst oxidase. *J Immunol* 149 : 2749-2758, 1992
 - 15) Umei T, Babior BM, Curnutte JT, Smith RM : Identification of the NADPH-binding subunit of the respiratory burst oxidase. *J Biol Chem* 266 : 6019-6022, 1991
 - 16) Teahan C, Rowe P, Parker P, Totty N, Segal AW : The X-linked chronic granulomatous disease gene codes for the beta-chain of cytochrome b-245. *Nature* 327 : 720-721, 1987
 - 17) Parkos CA, Dinauer MC, Walker LE, Allen RA, Jesaitis AJ, Orkin SH : Primary structure and unique expression of the 22-kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 : 3319-3323, 1988
 - 18) Isogai Y, Shiro Y, Nasuda-Kouyama A, Iizuka T : Superoxide production by cytochrome b558 purified from neutrophils in a reconstituted system with an exogenous reductase. *J Biol Chem* 266 : 13481-13484, 1991
 - 19) Lomax KJ, Leto TL, Nunoi H, Gallin JI, Malech HJ : Recombinant 47-kilodalton cytosol factor restores NADPH oxidase in chronic granulomatous disease. *Science* 245 : 409-412, 1989
 - 20) Leto TL, Lomax KJ, Volpp BD, Nunoi H, Sechler JMG, Nauseef WM, Clark RA, Gallin JI, Malech HL : Cloning of a 67-kD neutrophil oxidase factor with similarity to a noncatalytic region of p60c-myc. *Science* 248 : 727-730, 1990

- 21) Casimir CM, Bu-Ghanim HN, Rodaway AR., Bentley DL, Rowe P, Segal AW: Autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by deletion at a dinucleotide repeat. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 2753-2757, 1991
- 22) Heyworth PG, Curnutte JT, Nauseef WM, Volpp BD, Pearson DW, Rosen H, Clark RA: Neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly. Translocation of p47-phox and p67-phox requires interaction between p47-phox and cytochrome b558. *J Clin Invest* 87 : 352-356, 1991
- 23) Clark RA, Volpp BD, Leidal KG, Nauseef WM: Two cytosolic components of the human neutrophil respiratory burst oxidase translocate to the plasma membrane during cell activation. *J Clin Invest* 85 : 714-721, 1990
- 24) Nauseef WM, Volpp BD, McCormic S, Leidal KG, Clark RA: Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase. Protein kinase C promotes cytoskeletal and membrane association of cytosolic oxidase components. *J Biol Chem* 266 : 5911-5917, 1991
- 25) Rotrosen D, Kleinberg ME, Nuno H, Leto T, Gallin JI, Malech HL: Evidence for a functional cytoplasmic domain of phagocyte oxidase cytochrome b558. *J Biol Chem* 265 : 8745-8750, 1990
- 26) Tsunawaki S, Mizunari H, Namiki H, Kuratsuji T: NADPH-binding component of the respiratory burst oxidase system: studies using neutrophil membranes from patients with chronic granulomatous disease lacking the β -subunit of cytochrome b558. *J Exp Med* 179 : 291-297, 1994
- 27) Schiffmann E, Corcoran BA, Wahl SM: Formylmethionyl peptides as chemoattractants for leukocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 72 : 1059-1062, 1975
- 28) Williams LT, Snyderman R, Pike MC, Lefkowitz RJ: Specific receptor sites for chemotactic peptides on human polymorphonuclear leukocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 74 : 1204-1208, 1977
- 29) Yasui K, Masuda M, Matsuoka T, Yamazaki M, Komiyama A, Akabane T, Hasui M, Kobayashi Y, Murata K: Abnormal membrane fluidity as a cause of impaired functional dynamics of chemoattractant receptors on neonatal polymorphonuclear leukocytes. *Pediatr Res* 24 : 442-446, 1988
- 30) Boulay F, Tardif M, Brouchon L, Vignais P: Synthesis and use of a novel N-formyl peptide derivative to isolate a human N-formyl peptide receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 168 : 1103-1109, 1990
- 31) Volpi M, Naccache PH, Molski TFP, Shefcyk J, Huang CK, Marsh ML, Munoz JJ, Becker EL, Sha'afi RI: Pertussis toxin inhibits fMet-Leu-Phe- but not phorbol ester-stimulated changes in rabbit neutrophils: Role of G proteins in excitation response coupling. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 : 2708-2712, 1985
- 32) Becker EL, Kermod JC, Naccache PH, Yassin R, Marsh ML, Munoz JJ, Sha'afi RI: The inhibition of neutrophil granule enzyme secretion and chemotaxis by pertussis toxin. *J Cell Biol* 100 : 1641-1646, 1985
- 33) Anthes JC, Billah MM, Cali A, Egan RW, Siegel MI: Chemotactic peptide, calcium and guanine nucleotide regulation of phospholipase C activity in membranes from DMSO-differentiated HL60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 145 : 825-833, 1987
- 34) Anthes JC, Eckel S, Siegel MI, Egan RW, Billah MM: Phospholipase D in homogenates from HL-60 granulocytes; Implications of calcium and G protein control. *Biochem Biophys Res Commun* 163 : 657-664, 1989
- 35) Huang CK, Laramee GR, Casnellie JE: Chemotactic factor induced tyrosine phosphorylation of membrane associated proteins in rabbit peritoneal neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 151 : 794-801, 1988
- 36) Goldman DW, Chang FH, Gifford LA, Goetzl EJ, Bourne HR: Pertussis toxin inhibition of chemotactic factor-induced calcium mobilization and function in human polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 162 : 145-156, 1985

- 37) Schneider C, Zanetti M, Romeo D : Surface-reactive stimuli selectively increase protein phosphorylation in human neutrophils. *FEBS Lett* 127 : 4-8, 1981
- 38) Rider LG, Niedel JE : Diacylglycerol accumulation and superoxide anion production in stimulated human neutrophils. *J Biol Chem* 262 : 5603-5608, 1987
- 39) Tyagi SR, Burnham DN, Lambeth JD : On the biological occurrence and regulation of 1-acyl and 1-O-alkyl-diradylglycerols in human neutrophils. *J Biol Chem* 264 : 12977-12982, 1989
- 40) Koenderman L, Tool A, Roos D, Verhoeven AJ : 1, 2-Diacylglycerol accumulation in human neutrophils does not correlate with respiratory burst activation. *FEBS Lett* 243 : 399-403, 1989
- 41) Berkow RL, Dodson RW, Kraft AS : The effect of a protein kinase C inhibitor, H-7, on human neutrophil oxidative burst and degranulation. *J Leukoc Biol* 41 : 441-446, 1987
- 42) Yasui K, Yamazaki M, Miyabayashi M, Tsuno T, Komiyama A : Signal transduction pathway in human polymorphonuclear leukocytes for chemotaxis induced by a chemotactic factor. *J Immunol* 152 : 5922-5929, 1994
- 43) Gerard C, McPhail LC, Stimler-Gerard NP, Bass DA, McCall CE : Role of protein kinases in stimulation of human polymorphonuclear leukocyte oxidative metabolism by various agonists. *J Clin Invest* 77 : 61-65, 1986
- 44) Billah MM, Eckel S, Mullmann TJ, Egan RW, Siegel MI : Phosphatidylcholine hydrolysis by phospholipase D determines phosphatidate and diglyceride levels in chemotactic peptide stimulated human neutrophils. *J Biol Chem* 264 : 17069-17077, 1989
- 45) Mullmann TJ, Siegel MI, Egan RW, Billah MM : Complement C5a activation of phospholipase D in human neutrophils : a major route to the production of phosphatidates and diglycerides. *J Immunol* 144 : 1901-1908, 1990
- 46) Thompson NT, Tateson JE, Randall RW, Spacey GP, Bonser RW, Garland LG : The temporal relationship between phospholipase activation, diradylglycerol formation and superoxide production in the human neutrophil. *Biochem J* 271 : 209-213, 1990
- 47) Uings IJ, Thompson NT, Randall RW, Spacey GP, Bonser RW, Hudson AT, Garland LG : Tyrosine phosphorylation is involved in receptor coupling to phospholipase D but not phospholipase C in the human neutrophil. *Biochem J* 281 : 597-600, 1992
- 48) Bourgoin S, Plante E, Gaudry M, Naccache PH, Borgeat P, Poubelle PE : Involvement of a phospholipase D in the mechanism of action of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *J Exp Med* 172 : 767-777, 1990
- 49) Bauldry SA, Bass DA, Cousart SL, McCall CE : Tumor necrosis factor α priming of phospholipase D in human neutrophils. *J Biol Chem* 266 : 4173-4179, 1991
- 50) Cockcroft S : G-protein-regulated phospholipase C, D and A2-mediated signalling in neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1113 : 135-160, 1992
- 51) Aswanikumar S, Corcoran B, Schiffman E, Day AR, Freer RJ, Showell HJ, Becker EL : Demonstration of a receptor on rabbit neutrophils for chemotactic peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 74 : 810-817, 1977
- 52) Strauss RG, Snyder EL : Chemotactic peptide binding by intact neutrophils from human neonates. *Pediatr Res* 18 : 63-66, 1984
- 53) Fletcher MP, Gallin JI : Human neutrophils contain an intracellular pool of putative receptors for the chemoattractant N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *Blood* 62 : 792-797, 1983
- 54) 倉辻忠俊 : 好中球機能とその異常症. *日小血会誌* 6 : 399-407, 1992
- 55) Marks PW, Maxfield FR : Transient increases in cytosolic free calcium appear to be required for the

- migration of adherent human neutrophils. *J Cell Biol* 110 : 43-52, 1990
- 56) Devreotes PN, Zigmond SH : Chemotaxis in eukaryotic cells : a focus on leukocytes and dictyostelium. *Annu Rev Cell Biol* 4 : 649-686, 1988
 - 57) Stossel TP, Chaponnier C, Ezzell RM, Hartwig JH, Janmey PA, Babor BM : Nonmuscle actin-binding proteins. *Annu Rev Cell Biol* 1 : 353-402, 1985
 - 58) Yin HL, Stossel TP : Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependent regulatory protein. *Nature* 281 : 583-586, 1979
 - 59) Janmey PA, Stossel TP : Modulation of gelsolin function by phosphatidylinositol 4, 5-phosphate. *Nature* 325 : 362-364, 1986
 - 60) Hoffstein ST : Ultrastructural demonstration of calcium local regions of the plasma membrane of surface-stimulated human granulocytes. *J Immunol* 123 : 1395-1402, 1979
 - 61) Frederiksen DW : Myosin phosphorylation. *Nature* 287 : 191-192, 1980
 - 62) Torres M, Hall FL, O'Neill K : Stimulation of human neutrophils with formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces tyrosine phosphorylation and activation of two distinct mitogen-activated protein-kinases. *J Immunol* 150 : 1563-1578, 1993
 - 63) Gotoh Y, Nishida E, Matsuda S, Shiina N, Kosako H, Shiokawa K, Akiyama T, Ohta K, Sakai H : In vitro effects on microtubule dynamics of purified xenopus M phase-activated MAP kinase. *Nature* 349 : 251-254, 1991
 - 64) Stossel TP : On the crawling of animal cells. *Science* 260 : 1086-1094, 1993
 - 65) Beutler B, Cerami A : Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation : a common mediator. *Annu Rev Biochem* 57 : 505-518, 1988
 - 66) Raetz CRH, Ulevitch RJ, Wright SD, Sibley CH, Ding A, Nathan CF : Gram-negative endotoxin : an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. *FASEB J* 5 : 2652-2660, 1991
 - 67) Atkinson YH, Marasco WA, Lopez AF, Vadas MA : Recombinant human tumor necrosis factor- α : regulation of N-formylmethionylleucylphenylalanine receptor affinity and function on human neutrophils. *J Clin Invest* 81 : 759-765, 1988
 - 68) Larrick JW, Graham D, Toy K, Lin LS, Senyk G, Fendly BM : Recombinant tumor necrosis factor causes activation of human granulocytes. *Blood* 69 : 640-644, 1987
 - 69) Bauldry SA, McCall CE, Cousart SL, Bass DA : Tumor necrosis factor- α priming of phospholipase A₂ activation in human neutrophils : an alternative mechanism of priming. *J Immunol* 146 : 1277-1285, 1991
 - 70) Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathinson JC : CD14 : a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249 : 1431-1433, 1990
 - 71) Yasui K, Becker EL, Sha'afi RI : Lipopolysaccharide and serum cause the translocation of G-protein to the membrane and prime neutrophils via CD14. *Biochem Biophys Res Commun* 183 : 1280-1286, 1992
 - 72) Yasui K, Becker EL, Sha'afi RI : Lipopolysaccharide in combination with serum potentiates the stimulated activity of phospholipase D in human neutrophils via CD14. *Membr Biochem* 10 : 81-89, 1993
 - 73) Yasui K, Komiyama A, Molski TFP, Sha'afi RI : Pentoxifylline and CD14 antibody additively inhibit priming of polymorphonuclear leukocytes for enhanced release of superoxide by lipopolysaccharide : possible mechanism of these actions. *Infect Immun* 62 : 922-927, 1994
 - 74) Wright SD, Ramos RA, Hermanowski-Vosatka A, Rockwell P, Detmers PA : Activation of the adhesive capacity of CR3 on neutrophils by endotoxin : dependence on lipopolysaccharide binding protein and CD14. *J Exp Med* 173 : 1281-1286, 1991
 - 75) Yoshimura T, Matsushima K, Oppenheim JJ, Leonard EJ : Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leucocytes. *J Immunol* 139 : 788-793,

1987

- 76) Matsushima K, Morishita K, Yoshimura T, Lavu S, Kobayashi Y, Lee W, Appella E, Kung HF, Leonard EJ, Oppenheim JJ: Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor. *J Exp Med* 167: 1883-1893, 1988
- 77) Yuo A, Kitagawa S, Ohsaka A, Saito M, Takaku F: Stimulation and priming of human neutrophils by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: qualitative and quantitative differences. *Biochem Biophys Res Commun* 171: 491-497, 1990
- 78) Sullivan R, Griffin JD, Wright J, Melnick DA, Leavitt JL, Fredette JP, Horne JH, Lyman CA, Lazzari KG, Simons ER: Effects of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on intracellular pH in mature granulocytes. *Blood* 72: 1665-1673, 1988
- 79) Weisbart RH, Golde DW, Gasson JC: Biosynthetic human GM-CSF modulates the number and affinity of neutrophil f-Met-Leu-Phe receptors. *J Immunol* 137: 3584-3587, 1986
- 80) McColl SR, DiPersio JF, Caon AC, Ho P, Naccache PH: Involvement of tyrosine kinases in the activation of human peripheral blood neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 78: 1842-1852, 1991
- 81) Gomez-Cambronero J, Huang CK, Becker EL, Gomez-Cambronero TM, Waterman WH, Becker EL, Sha'afi RI: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced protein tyrosine phosphorylation of microtubule-associated protein kinase in human neutrophils. *Proc Natl Acad USA* 89: 7551-7555, 1992
- 82) Gomez-Cambronero J, Yamazaki M, Metwally F, Molski TFP, Bonak V, Huang CK, Becker EL, Sha'afi RI: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and human neutrophils: role of guanine nucleotide regulatory proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 3569-3573, 1989
- 83) Durstin M, Durstin S, Molski TFP, Becker EL, Sha'afi RI: Cytoplasmic phospholipase A2 translocates to membrane fraction in human neutrophils activated by stimuli that phosphorylate mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3142-3146, 1994
- 84) Socinski MA, Cannistra SA, Sullivan R, Elias A, Antman K, Schnipper L, Griffin JD: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces the expression of the CD11b surface adhesion molecule on human granulocytes in vivo. *Blood* 72: 691-697, 1988
- 85) Corey SJ, Rosoff PM: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor primes neutrophils by activating a pertussis toxin-sensitive G protein not associated with phosphatidylinositol turnover. *J Biol Chem* 264: 14165-14171, 1989
- 86) Verhoef G, Boogaerts M: Treatment with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and the respiratory distress syndrome. *Am J Hematol* 36: 285-287, 1991

(7. 1. 26 受稿)