

## Thesis

## 好酸球の基底膜通過ならびに活性酸素産生に及ぼす好中球の作用

埼玉医科大学第2内科学教室

(指導: 西村 重敬教授)

菊地 泉

**Effects of Neutrophils on the Trans-basement Membrane Migration and Superoxide Anion Generation of Eosinophils**

Izumi Kikuchi (Pulmonary Division, Second Department of Internal Medicine, Saitama Medical School, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

Eosinophils are generally recognized as central effector cells in airway inflammation of bronchial asthma. On the other hand, neutrophils have been suggested to contribute to acute exacerbations or development of chronic severe disease of asthma. The mechanisms how neutrophils contribute to these pathophysiologic processes in asthma remains to be elucidated, however, neutrophils may affect either accumulation or functional status of eosinophils. The objective of this study was to evaluate whether the presence of neutrophils modifies trans-basement membrane migration and effector function of eosinophils. Eosinophils and neutrophils were isolated from the peripheral blood of healthy subjects. Eosinophil migration across basement membrane was evaluated using Matrigel®-coated chemotaxis chambers in the presence or absence of neutrophils. In the presence of neutrophils, trans-basement membrane migration of eosinophils in response to IL-8 was significantly augmented ( % migration;  $12.9 \pm 3.1$  vs.  $1.9 \pm 0.5$  by control,  $p=0.007$ ,  $N=10$ ). Similarly, eosinophil migration to GRO- $\alpha$  was also augmented in the presence of neutrophils. The enhanced migration in the presence of neutrophils was partially but significantly inhibited by PAF-antagonists, WEB2086 or WEB2170, and LTB<sub>4</sub> receptor antagonist, BIIL260, suggesting the role of PAF or LTB<sub>4</sub>. Finally, the presence of both neutrophils and eosinophils significantly increased superoxide anion generation in response to IL-8 as compared with that of eosinophils or neutrophils alone.

These results suggest that neutrophils can augment both trans-basement membrane migration and respiratory burst of eosinophils. This pathomechanism may contribute to the eventual manifestation of eosinophilic inflammation in the asthmatic airways.

**Keywords:** eosinophils, neutrophils, trans basement membrane migration, superoxide anion

## 緒 言

今日、気管支喘息の基礎病態は慢性の気道炎症であるものと理解されており、主たる浸潤細胞は、Th2細胞、肥満細胞あるいは好酸球であるとされている<sup>1,2)</sup>。とくに好酸球は強力な組織障害活性を有する特異顆粒蛋白や活性酸素種、また気道収縮物質であるロイコトリエンC<sub>4</sub>を豊富に産生するため、気管支喘息における重要なエフェクター細胞であると認識され

医学博士 甲第862号 平成15年3月28日(埼玉医科大学)

てきた<sup>3,4)</sup>。

喘息における好中球の意義については注目されることが少なかったが、近年、喘息の致死的大発作や重症難治例では、好中球の気道集積がみられるとの知見が集積しつつある<sup>5-8)</sup>。好中球は、喘息における気道収縮メディエーターとして重要視されるロイコトリエンC<sub>4</sub>やヒスタミンの産生放出能を有しないことから、直接的に喘息発作を誘導しているとは考え難い。しかし、好中球は、組織障害メディエーターや好酸球の遊走因子あるいは活性化因子の産生源であることが

明らかにされている<sup>9,10)</sup>。従って、好中球がこれらの能力を介して、好酸球の組織浸潤あるいは活性化に影響を与え、結果として喘息の難治化や発作の重篤化に関与する可能性があるものと考えられる。事実、好中球が *in vitro* での好酸球の気道上皮細胞間隙遊走を亢進させるとの報告がある<sup>11)</sup>。

本研究では好中球の存在が、好酸球の組織浸潤過程、またエフェクター機能に及ぼす効果を検討する目的で、とくに基底膜通過および活性酸素産生能の二者に与える影響について検討した。

## 材料と方法

### 1. 材料

- 1) **細胞培養液及び緩衝液**：HuMEDIA. EG は倉敷紡績株式会社(大阪、日本)から、ブレッドキット EGM は Clonetics Corporation(Palo Alto, CA, USA)から、Hanks' Balanced Salt Solution(以下 HBSS)は GIBCO BRL(Grand island, NY, USA)から、非働化牛胎児血清(fetal bovine serum, 以下 FBS)は ICN Biomedicals Inc. (Aurora, Ohio, USA)から入手した。
- 2) **血管内皮細胞と基底膜**：人臍帯静脈由来血管内皮細胞(human umbilical vein endothelial cells, 以下 HUVEC)は倉敷紡績株式会社から、EHS マウス腫瘍由来基底膜(Matrigel<sup>TM</sup> basement membrane, 以下 Matrigel)は Becton Dickinson Co. -CBP Products(Bedford, MA, USA)から入手した。
- 3) **薬剤**：LTB<sub>4</sub> 受容体拮抗薬である BIIL260 および platelet activating factor(以下 PAF)受容体拮抗薬である WEB2086, WEB2170 は Böehringer Ingelheim(Ridgefield, Conn. Germany)から供与を受けた。matrix metalloprotease-9(以下 MMP-9)阻害物質である tissu inhibitor of metalloprotease-1(以下 TIMP-1)は R & D Systems (Minneapolis, MN, USA)から入手した。好中球エラスター阻害薬である ulinastatin(以下 UTI)は持田製薬株式会社(東京、日本)から供与を受けた。
- 4) **好酸球・好中球刺激物質**：インターロイキン(IL)-8, growth-related oncogene(GRO)- $\alpha$ , eotaxin および RANTES は R & D Systems から、血小板活性化因子(platelet acting factor, PAF)は Sigma(St. Louis, MO, USA)から、ロイコトリエン(LT) B<sub>4</sub>は Cayman Chemical(Ann Arbor, MI, USA)から入手した。
- 5) **抗体**：抗 CXCR1 抗体、抗 CXCR2 抗体は R & D Systems から、抗  $\alpha_4$  インテグリン抗体(クローニング HP2/1)はコスモバイオ(株)(東京、日本)から、抗  $\beta_2$  インテグリン抗体(クローニング L130)は Becton Dickinson(Frankline Lakes, NJ, USA)から、マウス IgG1, IgG2a は ICN Biomedicals, Inc.

から、抗 PSGL-1 (CD162) 抗体(クローニング PL-1)は Immunotech A Coulter Company(Marseille, France)から、抗 P-selectin(anti-CD62p) 抗体(クローニング G1-4)は Ancell Corporation(Bayport, MN, USA)から入手した。

- 6) **その他**：Dextran T500 は Pharmacia Biotech(Uppsala, Sweden)から、CD16 Microbeads は Miltenyi Biotec(Bergisch Gladbach, Germany)から、recombinant human P-selectin(以下 P-selectin)は R & D Systems から、superoxide dismutase(以下 SOD), Cytochrome C, 0-phenylenediamine(以下 OPD), Gelatin は Sigma から、2', 7'-bis(2-carboxy-ethyl)-5(6)-carboxyfluorescein(以下 BCECF-AM)は同仁研究所(熊本、日本)から入手した。

### 2. 好中球、好酸球分離法

好中球、好酸球とともに既報の方法に従い、それぞれデキストランと Percoll 液<sup>12)</sup>、ならびに immunomagnetic beads による negative selection<sup>13, 14)</sup>にて分離した。健常人末梢血をヘパリン処理したものと 4.5% デキストランを 50 ml のポリプロピレンチューブに 4 対 1 の比率で混ぜ、血漿成分と赤血球とに分離した。この血漿成分を比重 1.085 の Percoll 液を用いて比重遠心分離を行い、リンパ球ならびに低比重の顆粒球を除去し、蒸留水にて赤血球の溶血操作を行った。これを、遊走反応については 5% FBS を含有する HBSS (HBSS/FBS) を用いて  $2.5 \times 10^5$  cells/ml に調整し、好中球浮遊液として用いた。また、活性酸素産生反応については 0.1% gelatin を含有する HBSS (HBSS/gel) に浮遊し  $1.25 \times 10^6$  cells/ml に調整して実験に供した。好中球の分離純度は 98% 以上であり、また実験終了直後の cell viability は trypan blue 染色で 95% 以上であった。好酸球は、その後、好中球除去を目的として抗 CD16 モノクロナール抗体ビーズを使用した negative selection 法で好酸球を選択的に分離した。これを好中球と同様に調整して実験に供した。好酸球の分離純度は 98% 以上であり、また実験終了直後の cell viability は trypan blue 染色で 95% 以上であった。

### 3. 基底膜通過反応(trans-basement membrane migration)

Engelbreth-Holm-Swarm(EHS)マウス腫瘍由来基底膜(Matrigel<sup>®</sup>)は 406  $\mu$ g/ml に調整した。24 穴プレートの上層のトランスウェルに Matrigel を 100  $\mu$ l ずつ分注した後に、水平板上で一晩常温にて放置した。好中球、好酸球の基底膜通過反応は Boyden chamber 法の変法<sup>15)</sup>を用いて測定した。すなわち 24 穴培養プレート(Becton Dickinson Labware)を用い、3  $\mu$ m ポアサイズのインサートフィルター

(Becton Dickinson Labware) を装着し, BCECF-AM で標識した好中球<sup>16)</sup>を混じた好中球好酸球混合浮遊液を 200  $\mu$ l ずつ分注した後, ウェル下部に遊走因子 500  $\mu$ l を注入し 37 °C で 2 時間インキュベーションした。上部ウェルを除去した後, 好中球用は, Fluoromark (Bio-Rad Laboratories, USA) を使用し, 融光度を測定した<sup>16)</sup>。好酸球用には下部ウェル内に遊走した eoinophil peroxidase (EPO) 活性を OPD を用いて発色し, IMMUNO-MINI (NJ-2300, 日本インターメッド株式会社, 東京, 日本) を使用し, 波長 490 nm の吸光度を測定した<sup>15)</sup>。

#### 4. 血管内皮細胞間隙遊走反応 (transendothelial migration, 以下 TEM)

ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC) は  $2.5 \times 10^5$  cells/ml に調整した。24 穴プレートの上層のトランスウェルに HuMEDIA を 100  $\mu$ l ずつ分注した後に, HUVEC 浮遊液を 100  $\mu$ l ずつ分注し, confluent となるまで 37 °C にて 24 時間培養した。一部の実験では HUVEC 上の接着分子群の発現を増強する目的で IL-4, TNF- $\alpha$  を用いた<sup>15)</sup>。IL-4 は最終 30 pM, TNF- $\alpha$  は最終 100 pM になるよう調整し, トランスウェルに加えて 24 時間刺激した。

好中球, 好酸球 TEM の測定は基底膜通過反応と同様に Boyden chamber 法の変法<sup>15)</sup>を用いた。

#### 5. 活性酸素産生反応

好中球および好酸球のスーパーオキサイド ( $O_2^-$ ) 産生は我々が行ってきた 96 穴プレートを用いたチトクローム C 還元法により測定した<sup>17-19)</sup>。まず SOD コントロールウェルに SOD (0.2 mg/ml in HBSS/gel) を 20  $\mu$ l ずつ加え, 各ウェルに刺激物質の IL-8 を入れたのち 100  $\mu$ l となるよう HBSS/gel を加えた。好中球あるいは好酸球の浮遊液とチトクローム C (12 mg/ml) を容積比 4 対 1 で混合し, これを各ウェルに 100  $\mu$ l ずつ加えたのち, プレートを 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C のインキュベーターで 2 時間保温し, 550 nm の吸光度を測定した。これらの反応は duplicate で行い, SOD 含有ウェルの反応と比較した。 $O_2^-$  産生量は分子吸光度計数  $21.1 \times 10^3$  M/l · cm から<sup>20, 21)</sup>, nmoles cytochrome C reduced/ $10^6$  cells-SOD control として算出した。インキュベーション開始から 240 分後の好中球・好酸球生存率は trypan blue 染色にて 95% 以上であった。

#### 6. 統計処理法

統計学的解析は two-way analysis of variance (ANOVA) を用い, Fisher 法 (post hoc 検定) にて解析した。危険率 5% 未満を有意とみなした。

## 結果

### 1. 好酸球の基底膜通過反応に対する好中球の作用

無刺激あるいは CXC ケモカインである IL-8 (10 nM) 刺激による, 好酸球の基底膜通過に及ぼす好中球の作用を検討した。無刺激での好酸球基底膜通過は, 好中球の存在により有意な影響は受けなかった (Fig. 1)。好中球非存在下において IL-8 による好酸球基底膜通過 (% 遊走率) は  $1.9 \pm 0.5\%$  であり, 自然遊走との有意差は認められなかった。好中球と好酸球の共存下では, % 遊走率は  $12.9 \pm 3.1\%$  となり, 自然遊走, また好酸球単独の場合の IL-8 による遊走と比較して, 有意な増強が認められた ( $p=0.007$  vs. control, N=10, Fig. 1A)。IL-8<sup>22-25)</sup> と同様に気管支喘息患者体内で濃度が上昇する<sup>25)</sup>と報告されている, 他の CXC ケモカインである GRO- $\alpha$  (100 nM) でも, 好中球非存在下と比較し, 好中球存在下では有意な好酸球の基底膜通過の増強が誘導された ( $0.7 \pm 0.5\%$  by control vs.  $11.8 \pm 3.5\%$ ,  $p=0.02$ , N=6, Fig. 1B)。LTB<sub>4</sub> (0.1  $\mu$ M) 刺激では, 好酸球単独でも自然通過と比較して有意な基底膜通過が誘導された ( $12.9 \pm 4.6\%$  vs.  $1.0 \pm 0.8\%$ ,  $p=0.04$ , N=5, Fig. 1C) が, 好中球存在下では  $23.6 \pm 6.0\%$  と, 有意に増強することが観察された ( $p<0.02$  vs. control and eosinophils alone, N=5, Fig. 1C)。なお, 好酸球は活性化すると IL-8 のリガンドである CXCR2 を発現することが報告されているが<sup>26-29)</sup>, 好中球存在下における

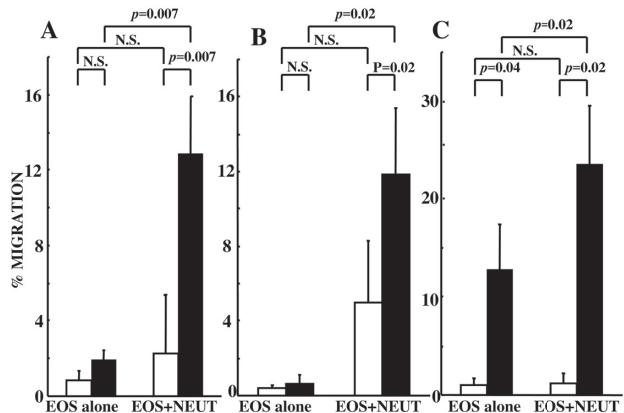


Fig. 1. Effect of neutrophils on eosinophil trans-basement membrane migration in response to IL-8 (N=10, A), GRO- $\alpha$  (N=6, B), and LTB<sub>4</sub> (N=5, C). Either eosinophils alone or a combination of eosinophils and neutrophils was added to the upper compartment of Matrigel®-coated Transwell® filters and either chemoattractant or medium control was added to the bottom compartment. The plates were incubated for 2 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. The migration of eosinophils was examined by an EPO assay. Control (□), IL-8 10 nM or GRO- $\alpha$  100 nM or LTB<sub>4</sub> 1 nM (■). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. N.S. ; not significant.

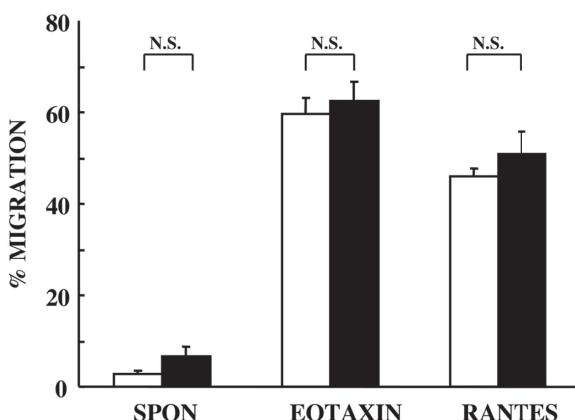
る IL-8 による好酸球基底膜通過は、抗 CXCR2 抗体によっては抑制されなかった ( $6.5 \pm 1.9\%$  by control vs.  $9.2 \pm 2.7\%$  by anti-CXCR2, N=3). 好酸球に対する直接的遊走作用が知られる CC ケモカイン群について検討してみると、eotaxin (10 nM) と RANTES (10 nM) はともに好中球非存在下でも好酸球の基底膜通過を誘導したが、好中球の存在による増強効果は認められなかった ( $59.5 \pm 3.8\%$  by control vs.  $62.3 \pm 4.5\%$  by eotaxin,  $p=N.S.$ , N=5,  $46.1 \pm 1.6\%$  by control vs.  $51.0 \pm 4.9\%$  by RANTES,  $p=N.S.$ , N=5, Fig. 2).

## 2. 好中球・好酸球基底膜通過反応の経時的变化

10 nM の IL-8 刺激下で、好中球存在下における好酸球と好中球の基底膜通過を経時的に観察した。好中球基底膜通過は、開始 15 分の時点で遊走のピークを認め (Fig. 3A), 好酸球は基底膜通過開始 15 分から 30 分にピークを認めた (Fig. 3B)。すなわち、好中球の基底膜通過が、好酸球のそれに先行していることが確認された。

## 3. 好中球共存下での好酸球遊走における膜の関与の検討

好中球共存下、非存在下における好酸球遊走反応の通過膜別での差異を検討した。IL-8 刺激による好酸球遊走反応は、bare filter ( $21.0 \pm 2.1\%$  vs.  $13.2 \pm 3.3\%$  by control,  $p=0.02$ , N=5), Matrigel ( $4.0 \pm 1.1\%$  vs.  $0.1 \pm 0.0\%$  by control,  $p=0.02$ , N=5), Matrigel に resting 状態の HUVEC をコートしたもの ( $13.6 \pm 3.0\%$  vs.  $5.2 \pm 1.0\%$  by control,  $p=0.02$ , N=5) と修飾された。



**Fig. 2.** Effect of neutrophils on eosinophil trans-basement membrane migration in response to eotaxin and RANTES (N=5). Either eosinophils alone or a combination of eosinophils and neutrophils was added to the upper compartment of Matrigel®-coated Transwell® filters and either eotaxin, RANTES or medium alone was added to the bottom compartment. The plates were incubated for 2 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. The migration of eosinophils was examined by an EPO assay. EOS alone (□), EOS+NEUT (■). Data are expressed as mean ± S.E. N.S. ; not significant.

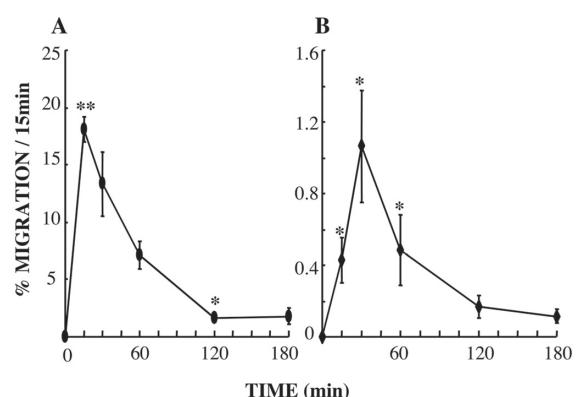
±2.4% by control,  $p=0.002$ , N=5), Matrigel に IL-4 + TNF- $\alpha$  刺激により接着分子群の発現を増強させた HUVEC をコートしたもの ( $21.4 \pm 3.1\%$  vs.  $14.7 \pm 5.2\%$  by control,  $p<0.05$ , N=5) のすべてにおいて、好中球の存在により有意に増強された (Fig. 4).

## 4. 好中球共存下での好酸球基底膜通過反応における好中球由来組織傷害性分子の関与の検討

IL-8 刺激好中球共存による好酸球の基底膜通過増強が、好中球由来の組織傷害性メディエーターである MMP-9 あるいはエラスターーゼなどに起因する基底膜成分の損傷と関係するか否かを確認する目的で、matrix metalloproteinase (MMP)-9 阻害物質である TIMP-1 と好中球エラスターーゼ阻害薬である ulinastatin (UTI) の効果を検討した。IL-8 刺激での好中球共存による好酸球の基底膜通過反応は、其々十分な活性を発揮することが確認されている 10 nM の TIMP-1<sup>12)</sup>, 1000 U/ml の UTI<sup>30)</sup> により、其々 TIMP-1 ;  $10.2 \pm 1.0\%$  by control vs.  $10.6 \pm 3.1\%$  by TIMP-1,  $p=N.S.$ , N=5, Fig. 5A, UTI ;  $23.2 \pm 6.8\%$  by control vs.  $23.5 \pm 6.7\%$  by UTI,  $p=N.S.$ , N=5, Fig. 5B と修飾されなかった。

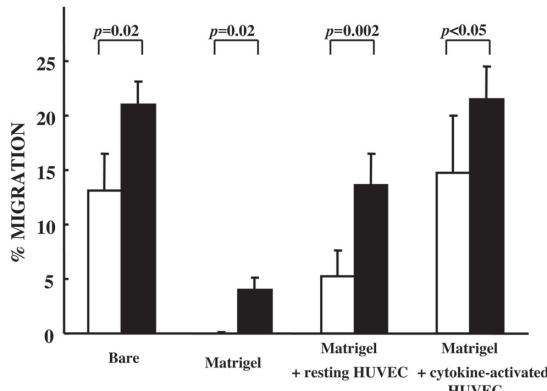
## 5. 好中球共存下での好酸球基底膜通過反応における好酸球遊走性メディエーターの関与の検討

好中球は、活性化すると好酸球遊走活性を有する PAF ならびに LTB<sub>4</sub> の両者を産生し得る<sup>31)</sup>。PAF (1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine)

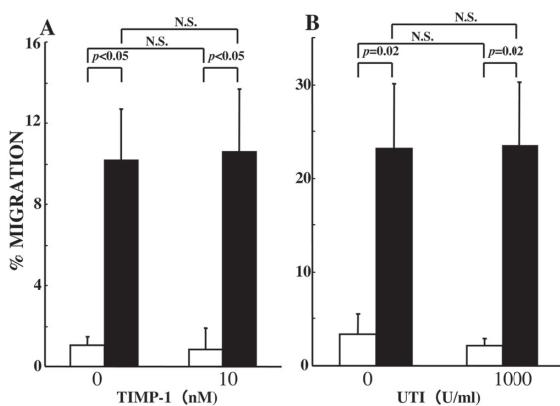


**Fig. 3.** The reaction kinetics of neutrophil (A) and eosinophil (B) trans-basement membrane migration in response to IL-8 (N=6). The reaction was initiated simultaneously and then terminated by the removal of Transwell® filter according to the time schedule. Following 3 h incubation, the migration of neutrophils or eosinophils was examined by a BCECF-AM or an EPO assay, respectively. Data are expressed as mean ± S.E. (\*:  $p<0.05$ , \*\*:  $p<0.005$  vs. last value.).

は、種々の炎症性細胞でつくられるアルキルエーテルリン脂質である<sup>32, 33)</sup>。炎症細胞の強力な活性物質であり、好酸球と好中球の走化性と接着を誘導

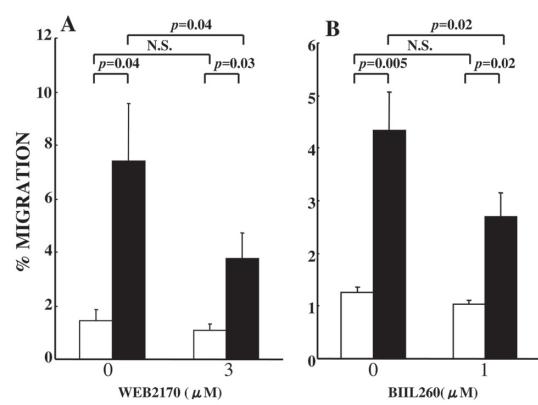


**Fig. 4.** Effects of the coating conditions of Transwell® on the neutrophil-dependent enhancement of eosinophil migration in response to IL-8 (N=5). Either eosinophils alone or a combination of eosinophils and neutrophils was added to the upper compartment of either bare-filter, Matrikel®, or HUVEC monolayers stimulated with or without a combination of IL-4 and TNF- $\alpha$  (both at 100 pM, 24 h). Either IL-8 or medium control was then added to the bottom compartment. The plates were incubated for 2 h at 37°C and 5 % CO<sub>2</sub>. The migration of eosinophils was then examined by an EPO assay. EOS alone(□), EOS+NEUT(■). Data are expressed as mean $\pm$ S.E.



**Fig. 5.** Effects of TIMP-1 (N=5, A), a MMP-9 inhibitor, and ulinastatin (N=5, B), a granulocyt elastase inhibitor, on the neutrophil-dependent enhancement of eosinophil trans-basement membrane migration in response to IL-8. Eosinophils and neutrophils were preincubated either with TIMP-1, ulinastatin, or medium alone for 30 min at 37°C. Either eosinophils alone or a combination of eosinophils and neutrophils was applied to the upper compartment of Matrikel®-coated Transwell®. The migration of eosinophils was then examined by an EPO assay. EOS alone(□), EOS+NEUT(■). Data are expressed as mean $\pm$ S.E. N.S. ; not significant.

する<sup>34, 35)</sup>。LTB<sub>4</sub> (5 [S], 12 [R]-dihydroxy-6, 14-cis-8, 10-trans-eicosatetraenoic acid) は、アラキドン酸カスケードのうち、5-リポキシゲナーゼ系により産生される不飽和脂肪酸で、好中球やマクロファージが主な産生源であり、PAF と同様に、好酸球と好中球の両者に走化性や機能発現を誘導する<sup>36-38)</sup>。これらのことより、好中球共存による好酸球基底膜遊走反応の増強には、PAF あるいは LTB<sub>4</sub> の作用を介したものである可能性が想定された。そこでこれらの関与を検討した。WEB2170 (3  $\mu$ M) および WEB2086 (10  $\mu$ M) は PAF による、BIIL260 (10  $\mu$ M) は LTB<sub>4</sub> による各々最大の遊走反応 (各 1  $\mu$ M) を其々 95 % 以上抑制し、なおかつ、反応終了時における cell viability は、Tripan blue 染色により 95 % 以上であることを確認した (データ未呈示)。PAF 受容体拮抗薬 WEB2170 (3  $\mu$ M) は、IL-8 刺激好中球共存による好酸球基底膜遊走を、部分的にではあるが有意に抑制した (7.4  $\pm$  2.1 % by control vs. 3.7  $\pm$  1.0 % by WEB2170,  $p=0.04$ , N=5, Fig. 6A)。同様に、他の PAF 受容体拮抗薬である WEB2086 (10  $\mu$ M) も、IL-8 刺激好中球共存による好酸球基底膜遊走を有意に抑制した (24.4  $\pm$  8.3 % by control vs. 17.3  $\pm$  6.1 % by WEB2086,  $p=0.03$ , N=5)。IL-8 刺激での好中球共存下による好酸球基底膜通過の増強は、LTB<sub>4</sub> 受容体拮抗薬 BIIL260 によっても、部分的にではあるが有意に抑制された (4.3  $\pm$  0.7 % by control vs. 2.7  $\pm$  0.5 % by BIIL260,  $p=0.02$ , N=7, Fig. 6B)。なお WEB2170 と BIIL260 の併用処理を行っても、抑制効果は有意には増強されなかった (データ未呈示)。



**Fig. 6.** Effects of WEB2170 (A), a PAF antagonist, and BIIL260 (B), a LTB<sub>4</sub> receptor antagonist, on the neutrophil-dependent enhancement of eosinophil trans-basement membrane migration in response to IL-8 (N=5). Eosinophils and neutrophils were preincubated with either WEB2170, BIIL260, or medium alone for 15 min at 37°C, and then applied to the upper compartment of the Matrikel®-coated Transwell® filter. The migration of eosinophils was then examined by an EPO assay. EOS alone(□), EOS+NEUT(■). Data are expressed as mean $\pm$ S.E. N.S. ; not significant.

## 6. 好中球共存下での好酸球基底膜通過反応増強における好中球・好酸球表面接着分子の関与の検討

好中球共存下での好酸球基底膜通過反応増強における、好酸球と好中球の表面接着分子の関与を検討した。IL-8 刺激での好中球共存下における好酸球基底膜通過は、好酸球と好中球の両者を抗  $\beta_2$  インテグリン抗体で処理した場合、有意に抑制された ( $5.1 \pm 1.6\%$  by control vs.  $3.1 \pm 1.0\%$  by anti-  $\beta_2$  integrin,  $p < 0.05$ ,  $N = 5$ , Fig. 7)。

## 7. 好酸球・好中球共存での superoxide anion ( $O_2^-$ ) 產生の検討

好酸球、好中球、ならびに両者の共存での  $O_2^-$  產生反応は、刺激物非存在下では有意差がなかった ( $N = 5$ , Fig. 8)。10 nM IL-8 存在下では、好酸球単独、好中球単独の場合は其々  $O_2^-$  產生を誘導しなかったが、好酸球・好中球共存下では、無刺激ならびに好酸球単独での IL-8 刺激によるそれと比較して有意な  $O_2^-$  產生の増強が観察された ( $nmole/10^6 cells$ ;  $0.7 \pm 0.2$  by control vs.  $0.9 \pm 0.3$  by IL-8,  $p < 0.05$ ,  $N = 5$ , Fig. 8)。

## 考 案

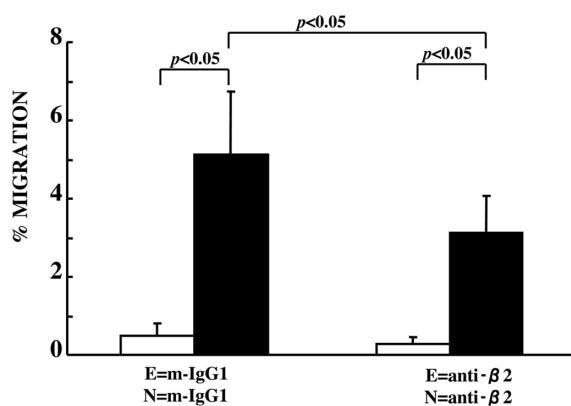
本研究において好中球共存下では、IL-8、GRO- $\alpha$ 、 $LTB_4$  刺激による好酸球の基底膜通過反応の著明な増強が観察された。IL-8 刺激での好中球共存下における好酸球の基底膜通過では、好中球が好酸球に先行して通過することが確認された。好中球共存による好酸球基底膜通過の増強効果は、PAF 受容体拮抗薬と  $LTB_4$

受容体拮抗薬によって部分的に抑制された。最後に、好酸球と好中球が共存すると、其々単独の場合よりも活性酸素産生が増強した。これらの成績は、好中球が喘息気道における好酸球の組織集積、あるいは好酸球活性化の増強因子として作用することを示唆するものである。

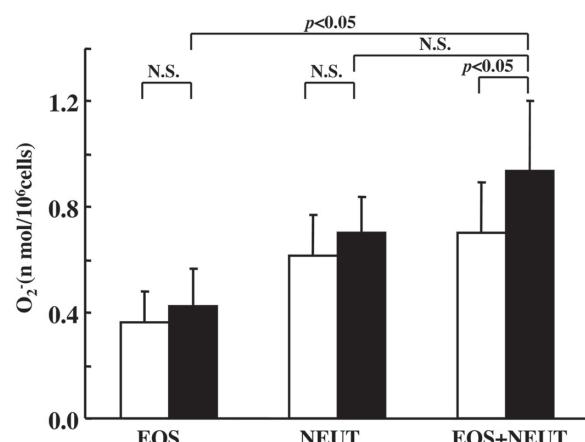
### 1. 好中球は、好酸球の基底膜通過を増強させる。

サイトカインの一つであるケモカインは、液性の白血球遊走因子であり、炎症性疾患での炎症細胞の集積における意義が注目されてきた。CXC ケモカインは、好中球に走化作用を示すものが多いとされ、気管支喘息の病態に関与するものとしては IL-8 がよく知られている<sup>22-25</sup>。本研究において、IL-8 刺激での好中球共存下における好酸球通過反応の増強は、基底膜成分を用いた場合のみならず、血管内皮細胞を用いた、より生体内の条件に近い状態でも認められた。IL-8 のリガンドである CXCR2 は、好酸球が活性化した場合に、その表面に発現する<sup>26-29</sup>との報告があるが、遊走反応の増強は、抗 CXCR2 抗体によっては抑制されなかった。この成績は、IL-8 と基底膜により活性化された好中球が好酸球に何らかの作用をすることで、好酸球の基底膜通過が促進されるのであって、IL-8 が直接好酸球を通過誘導しているのではないことを示唆するものである。

### 2. 好中球による好酸球の基底膜通過増強効果には、PAF や $LTB_4$ が関与している。



**Fig. 7.** Effect of anti-  $\beta_2$  integrin antibody on the neutrophil-dependent enhancement of eosinophil trans-basement membrane migration in response to IL-8 (N=5). Eosinophils and neutrophils were pretreated with either anti-  $\beta_2$  integrin mAb (L130) or an isotype-matched control mouse IgG1 for 15 min at ambient temperature, then applied to the upper compartment of the Matrigel<sup>®</sup>-coated Transwell<sup>®</sup> filter. The migration of eosinophils was then examined by an EPO assay. EOS alone (□), EOS+NEUT (■). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. N.S. ; not significant.



**Fig. 8.** The combined effect of eosinophils and neutrophils on  $O_2^-$  generation (N=5). Either eosinophils alone, neutrophils alone, or a combination of eosinophils and neutrophils was added to 96-well plates in the presence or absence of IL-8.  $O_2^-$  generation was examined by a cytochrome C reduction method. Control (□), IL-8 10 nM (■). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. N.S. ; not significant.

好中球共存下で好酸球の基底膜通過が促進される原因として、好中球が MMP-9 やエラスターーゼなどの組織障害性メディエーターにより、基底膜を障害して通過し好酸球の通過を容易にするか、あるいは、好中球が産生するメディエーターが好酸球に直接作用して好酸球の活性化がおこり基底膜通過が促進されるか、二つの可能性を推定した。好中球由来の代表的な基底膜障害性酵素、MMP-9 の阻害物質である TIMP-1 と、好中球エラスターーゼの阻害薬である ulinastatin による阻害実験では有意な抑制は認められず、これらの寄与の可能性は少ないと考えた。一方、PAF 受容体拮抗薬である WEB2086 と WEB2170、LTB<sub>4</sub> 受容体拮抗薬である BIIL260 は、いずれも約 40% の有意な抑制効果を示した。これは、好中球が PAF や LTB<sub>4</sub> を産生することを介して好酸球に作用し、好酸球の基底膜通過増強効果を発現することを示唆している。実際、気管支喘息においても LTB<sub>4</sub> の過剰産生が認められるとの報告がある<sup>39)</sup>。好酸球と好中球は共に LTB<sub>4</sub> による刺激に反応するが、LTB<sub>4</sub> を産生するのは主に好中球である。PAF に対しては両者とも反応性があり、また好酸球は autocrine な機序により自己刺激での PAF 産生能も有する。我々の実験では、IL-8 刺激好中球共存下における好酸球の基底膜通過増強効果は、LTB<sub>4</sub> 受容体拮抗薬と PAF 受容体拮抗薬を併用しても、其々の単独使用と比較して、抑制増強効果を認めなかった。このことより、好中球から放出された LTB<sub>4</sub> が好酸球を刺激し、これに刺激された好酸球が PAF を産生、さらに自己刺激産生して活性化し、遊走能が増加する一因になった可能性が想定されるが、詳細は不明である。

IL-8 刺激での好中球共存下による好酸球基底膜通過反応は、好酸球・好中球の両者を抗  $\beta_2$  インテグリン抗体で処理すると有意に抑制された。IL-8 の作用を受けるのはこの場合好中球であり、この一連の現象に好酸球と好中球の表面接着分子である  $\beta_2$  インテグリンが一部関与しているとすると、IL-8 によって基底膜遊走を誘導された好中球が、同時に好酸球と接着している可能性も考えられる。 $\beta_2$  インテグリンである Mac-1 は、好酸球表面には通常発現しているが、好中球では C5a, fMLP, IL-8 などで刺激された時のみ、その表面に発現する<sup>40)</sup>。また、もう一つの主な  $\beta_2$  インテグリンである LFA-1 は、すべての白血球に分布し白血球同士の接着に関与する<sup>41)</sup> とされている。我々は、走査型電子顕微鏡による観察で、Matrigel 上の好酸球 - 好中球接着像を認めており(データ未呈示)、好中球共存下における好酸球の基底膜通過増強効果の一部を、好酸球 - 好中球接着が担っている可能性が考えられる。以上の事は、好中球が PAF や LTB<sub>4</sub>、あるいは接着を介して好酸球の基底膜通過を亢進させ、結果として喘息気道における好酸球組織集積を増強させる機序を示唆するものである。

### 3. 好中球は、好酸球との共存により、活性酸素産生を誘導する。

好酸球と好中球の共存下では、IL-8 刺激による活性酸素の産生は、無刺激の場合、また好酸球単独の場合と比較して有意に増強した。活性酸素種は、従来から知られる組織傷害活性や血管透過性亢進作用に加え、近年は炎症反応の調節分子としての作用が指摘されている。好酸球について、我々は活性酸素種 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が好酸球の接着能を増強させ、ICAM-1 への接着反応を増強することを見出している<sup>14)</sup>。従って、好中球共存による活性酸素産生誘導は autocrine な機序により好酸球自身の接着能を増強し、炎症を更に増幅する可能性が考えられる。

好中球性喘息気道組織における IL-8 の正確な濃度は不明確であるが、誘発喀痰中 IL-8 濃度は、好酸球性喘息患者や健常人より明らかに高く、10 nM に達するとされることから<sup>7)</sup>、本研究で得られた IL-8 刺激好中球共存による好酸球の基底膜通過反応ならびに活性酸素産生の誘導は、実際の喘息気道においても生じ得ると想定される。今後は好中球自体の喘息気道への集積機序や、今回検討されなかった好酸球機能であるシスチニル・ロイコトリエンの産生能、あるいは特異顆粒蛋白の放出能に対する好中球由来のメディエーターの作用について検討される必要があるものと考える。

### 結 論

近年、難治性喘息や喘息重積発作における好中球の役割が指摘されてきているが、喘息気道で実際に検出されている CXC ケモカインにより活性化された好中球が、好酸球に作用しその基底膜間隙遊走あるいは活性酸素の産生を誘導することを見出した。これらの作用の一部は、PAF あるいは LTB<sub>4</sub>、ならびに接着分子である  $\beta_2$  インテグリンを介しての作用と考えられた。以上の検討から気管支喘息などのアレルギー性炎症疾患においては、好中球が、血管内皮細胞や他の炎症性細胞より産生される CXC ケモカインなどに刺激され、炎症増幅因子として、好酸球の組織への流入やエフェクター機能の発現に関与していることが示唆された。

### 謝 辞

稿を終わるにあたり、御指導、御校閲を賜りました西村重敬教授、坂本芳雄助教授に深甚なる謝意を捧げますと共に、直接御指導いただきました永田真助教授に深謝いたします。そして実験にご協力頂いた本学中央研究施設形態部門の穂田真澄教授、村井則子技師、明治製薬株式会社薬品総合研究所の土屋浩司博士、ならびに当研究室横手明美実験助手、野崎のぞみ実験助手に感謝いたします。

## 文 献

- 1) National Heart, Lung and Blood Institute. Global initiative for asthma. National Institutes of Health and World Health. pub No 02-3659, Bethesda, MD, 2002.
- 2) National Asthma Education and Prevention Program, Expert Panel Report 2 : Guidelines for the diagnosis and management of asthma. National Institutes of Health pub No 97-4051, Bethesda, MD, 1997.
- 3) Frigas E, Gleich GJ. The eosinophil and the pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 77(4): 527-37.
- 4) Busse WW, Sedgwick JB. Eosinophil eicosanoid relations in allergic inflammation of the airways. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1994; 22: 241-9.
- 5) Wenzel SE, Szeffler SJ, Leung DYM, Sloan SI, Rex MD, Martin RJ. Bronchoscopic evaluation of severe asthma. *Am J Resp Crit Care Med* 1997; 156: 737-43.
- 6) Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, Halliday JL, Trudeau JB, Gibbs RL, et al. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1001-8.
- 7) Gibson PG, Simpson JL, Saltos N. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma : Evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *CHEST* 2001; 119: 1329-36.
- 8) Pavord ID, Brightling CE, Woltmann G, Wardlaw AJ. Non-eosinophilic corticosteroid unresponsive asthma. *Lancet* 1999; 353(9171): 2213-4.
- 9) Douwes J, Gibson P, Pekkanen J, Pearce N. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax* 2002; 57(7): 643-8.
- 10) Linden A. Role of interleukin-17 and the neutrophil in asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 126(3): 179-84.
- 11) Zuurbier AE, Liu L, Mul FP, Verhoeven AJ, Knol EF, Roos D. Neutrophils enhance eosinophil migration across monolayers of lung epithelial cells. *Clin Exp Allergy* 2001; 31(3): 444-52.
- 12) Delclaux C, Delacourt C, D'Ortho MP, Boyer V, Lafuma C, Harf A. Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 14(3): 288-95.
- 13) Nagata M, Yamamoto H, Tabe K, Sakamoto Y, Matsuo H. Eosinophil adhesion-inducing activity produced by antigen-stimulated mononuclear cells involves GM-CSF. *Int Arch Allergy Immunol* 2000(supl); 122: 15-9.
- 14) Nagata M, Yamamoto H, Shibasaki M, Sakamoto Y, Matsuo H. Hydrogen peroxide augments eosinophil adhesion via  $\beta_2$  integrin. *Immunology* 2000; 101: 412-8.
- 15) Nagata M, Yamamoto H, Tabe K, Sakamoto Y. Eosinophil transmigration across VCAM-1-expressing endothelial cells is upregulated by antigen-stimulated mononuclear cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 125(s1): 7-11.
- 16) Nordström T, Knekt M, Nordström E, Lindqvist C. A microplate-based fluorometric assay for monitoring human cancer cell attachment to cortical Bone. *Analytical Biochemistry* 1999; 267: 37-45.
- 17) Nagata M, Sedgwick JB, Busse WW. Eosinophil adhesion to vascular cell adhesion molecule-1 activates superoxide anion generation. *J Immunol* 1995; 155: 2194-202.
- 18) Nagata M, Sedgwick JB, Busse WW. Differential effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on eosinophil and neutrophil superoxide anion generation. *J Immunol* 1995; 155: 4948-54.
- 19) Nagata M, Sedgwick JB, Kita H, Busse WW. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor augments ICAM-1 and VCAM-1 activation of eosinophil function. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19: 158-66.
- 20) Sedgwick JB, Vrtis RF, Gourley MF, Busse WW. Stimulus-dependent differences in superoxide anion generation by normal human eosinophils and neutrophils. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 81: 876-83.
- 21) Van Gelder BF, Slater EC. The extinction coefficient of cytochrome C. *Biochim Biophys Acta* 1962; 58: 593-608.
- 22) Lummus ZL, Alam R, Bernstein JA, Bernstein DI. Diisocyanate antigen-enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1, IL-8, and tumor necrosis factor-alpha by peripheral mononuclear cells of workers with occupational asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 265-74.
- 23) Shute JK, Vrugt B, Lindley IJ, Holgate ST, Bron A, Albers R, et al. Free and complexed interleukin-8 in blood and bronchial mucosa in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1877-83.
- 24) Kanazawa H, Kurihara N, Otsuka T, Fujii T, Tanaka S,

- Kudoh S, et al. Clinical significance of serum concentration of interleukin-8 in patients with bronchial asthma or chronic pulmonary emphysema. *Respiration* 1996; 63: 236-40.
- 25) Hsieh KH, Chou CC, Chiang BL. Immunotherapy suppresses the production of monocyte chemotactic and activating factor and augments the production of IL-8 in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 580-7.
- 26) Petering H, Gotze O, Kimmig D, Smolarski R, Kapp A, Elsner J. The biologic role of interleukin-8 : Functional analysis and expression of CXCR1 and CXCR2 on human eosinophils. *Blood* 1999; 93 : 694-702.
- 27) Heath H, Qin S, Rao P, Wu L, Larosa G, Kassam N, et al. Chemokine receptor usage by human eosinophils : The importance of CCR3 demonstrated using an antagonistic monoclonal antibody. *J Clin Invest* 1997; 99: 178-84.
- 28) Chunthrapai A, Lee J, Hebert CA, Kim KJ. Monoclonal antibodies detect different distribution patterns of IL-8 receptor A and IL-8 receptor B on human peripheral blood leukocytes. *J Immunol* 1994; 153: 5682-8.
- 29) Schweizer RC, Welmers BA, Raaijmakers JA, Zanen P, Lammers JW, Koenderman L. RANTES-and interleukin-8-induced responses in normal human eosinophils; effects of priming with interleukin-5. *Blood* 1994; 83: 3697.
- 30) Nakatani K, Takeshita S, Tsujimoto H, Kawamura Y, Sekine I. Inhibitory effect of serine protease inhibitors on neutrophil-mediated endothelial cell injury. *J Leukoc Biol* 2001; 69: 241-7.
- 31) Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines : An update. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 675-705.
- 32) Barnes PJ, Page CP, Henson P. Platelet activating factor and human disease. Oxford: Blackwell; 1989.
- 33) Chung KF. Platelet-activating factor in inflammation and pulmonary disorders. *Clin Sci* 1992; 83: 127-38.
- 34) Kimani G, Tonnesen MG, Henson PM. Stimulation of eosinophil adherence to human vascular endothelial cells in vitro by platelet-activating factor. *J Immunol* 1998; 140: 3161-6.
- 35) Kroegel C, Chilvers ER, Giembycz MA, Challiss RA, Barnes PJ. Platelet-activating factor stimulates a rapid accumulation of inositol (1,4,5) trisphosphate in guinea-pig eosinophil; Relationship to calcium mobilization and degranulation. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 114-24.
- 36) Samuelsson B, Dahlén SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN. Leukotrienes and lipoxins : Structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* 1987; 237: 1171-6.
- 37) Shimizu T, Wolfe LS. Arachidonic acid cascade and signal transduction. *J Neurochem* 1990; 55: 1-15.
- 38) Shimizu T, Wolfe LS. Lipid mediator networks in cell signaling: Update and impact of cytokines. *FASEB J* 1996; 10: 1147-58.
- 39) Turner CR, Breslow R, Conklyn MJ, Andresen CJ, Patterson DK, Lopez AA, et al. In vitro and in vivo effects of leukotriene B<sub>4</sub> antagonism in a primate model of asthma. *J Clin Invest* 1996; 97: 381-7.
- 40) Gahmberg CG, Tolvanen M, Kotovuori P. Leukocyte adhesion-structure and function of human leukocyte beta2-integrins and their cellular ligands. *Eur J Biochem* 1997; 245(2): 215-32.
- 41) Springer TA, Dustin ML, Kishimoto TK, Marlin SD. The lymphocyte function-associated LFA-1, CD2, and LFA-3 molecules: Cell adhesion receptors of the immune system. *Annu Rev Immunol* 1987; 5: 223-52.