

# 学位論文

## Doctor's Thesis

論文名： 好中球浸潤における CXC ケモカインの機能差異；  
Interleukin-8 (IL-8) と Growth Related Oncogene (GRO)  $\alpha$  について

(Functional Distinction Between Two CXC Chemokines,  
Interleukin-8 and Growth Related Oncogene  $\alpha$  in Neutrophil Infiltration)

著者名： 藤原 一徳 Fujiwara Kazunori

指導教官名： 病理学第一講座教授 吉永 秀  
整形外科学講座教授 高木 克公

審査委員名： 分子病理学講座担当教授 山本 哲郎  
転写制御分野担当教授 田賀 哲也  
分子免疫学講座担当教授 阪口 薫雄  
病理学第二講座担当教授 竹屋 元裕

2002年3月

# 目次

|        |  |    |
|--------|--|----|
| I      | 要旨                                     | 5  |
| II     | 発表論文リスト                                | 8  |
| III    | 謝辞                                     | 9  |
| IV     | 略語一覧                                   | 10 |
| V      | 研究の背景と目的                               | 12 |
| V-1    | 炎症反応                                   | 12 |
| V-2    | ウサギ膝関節炎における白血球浸潤の動態                    | 13 |
| V-3    | 炎症局所への白血球浸潤のメディエーション研究の流れ              | 14 |
| V-4    | 炎症性サイトカイン、特にケモカイン                      | 14 |
| V-5    | ケモカイン・レセプター(特に CXCR1、CXCR2 について)       | 16 |
| V-6    | IL-8 および $GRO\alpha, \beta, \gamma$    | 18 |
| VI     | 実験材料及び方法                               | 23 |
| VI-1   | リコンビナントウサギサイトカイン                       | 23 |
| VI-1-1 | ウサギ rGRO $\alpha$ の発現ベクターの作成           |    |
| VI-1-2 | ウサギ rGRO $\alpha$ の産生、精製               |    |
| VI-1-3 | ウサギ rIL-8、rTNF $\alpha$ の作成            |    |
| VI-2   | 抗ウサギサイトカイン抗体                           | 24 |
| VI-2-1 | 抗ウサギ GRO $\alpha$ 多クローンおよび単クローン抗体の作成   |    |
| VI-2-2 | 抗ウサギ TNF $\alpha$ 抗体および抗ウサギ IL-8 抗体の作成 |    |
| VI-3   | エンドトキシン                                | 25 |
| VI-4   | 関節炎の作成及びサイトカインの中和実験                    | 25 |
| VI-5   | サイトカインの測定                              | 26 |
| VI-5-1 | ウサギ GRO $\alpha$ の免疫測定                 |    |
| VI-5-2 | ウサギ IL-8 の免疫測定                         |    |
| VI-5-3 | ウサギ TNF $\alpha$ の測定                   |    |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| VI-6     | 好中球枯渇ウサギの作成  | 27 |
| VI-7     | 免疫染色   | 28 |
| VI-8     | 滑膜初代培養細胞   | 28 |
| VI-9     | RT-PCR   | 29 |
| VI-10    | ウサギ rTNF $\alpha$ の関節液による不活化                                       | 29 |
| VI-11    | 試薬の組成表   | 30 |
| VI-12    | 統計解析   | 31 |
|          |  |    |
| VII      | 実験結果   | 32 |
| VII-1    | ウサギ LPS 関節炎モデルにおける白血球浸潤動態  | 32 |
| VII-2    | LPS 関節炎モデルにおける IL-8、GRO $\alpha$ の産生動態                             | 32 |
| VII-3    | ケモカイン産生における IL-8、GRO $\alpha$ のブロック効果                              | 35 |
| VII-4    | 白血球浸潤における IL-8、GRO $\alpha$ のブロック効果                                | 35 |
| VII-5    | 小括   | 35 |
| VII-6    | rIL-8/rGRO $\alpha$ 関節内投与による炎症細胞浸潤                                 | 39 |
| VII-7    | rIL-8/rGRO $\alpha$ 関節内投与後の内因性 GRO $\alpha$ /IL-8 の産生動態            | 39 |
| VII-8    | 内因性 IL-8/GRO $\alpha$ の産生細胞の検索                                     | 42 |
| VII-8-1  | 好中球枯渇ウサギを用いた検討   |    |
| VII-8-2  | 免疫染色による検討  |    |
| VII-9    | rIL-8/rGRO $\alpha$ 投与後の好中球浸潤における内因性 GRO $\alpha$ /IL-8<br>のブロック効果 | 45 |
| VII-10   | rIL-8/rGRO $\alpha$ 投与後の好中球浸潤における内因性 TNF $\alpha$ のブロック効果          | 45 |
| VII-11   | rIL-8/rGRO $\alpha$ 投与後の内因性 TNF $\alpha$ の産生動態                     | 45 |
| VII-12   | rGRO $\alpha$ 関節内投与後の内因性 IL-8, 内因性 TNF $\alpha$ の相互作用              | 49 |
| VII-12-1 | 内因性 IL-8 への抗 TNF $\alpha$ 抗体の影響                                    |    |
| VII-12-2 | 内因性 TNF $\alpha$ への抗 IL-8 抗体の影響                                    |    |
| VII-13   | rIL-8/rGRO $\alpha$ 投与後の好中球浸潤における抑制効果の増強                           | 49 |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| VII-14   | 内因性 TNF $\alpha$ の産生細胞の検索                                    | 52 |
| VII-14-1 | 好中球枯濁ウサギを用いた検討   |    |
| VII-14-2 | 免疫染色による検討  |    |
| VII-15   | 滑膜培養細胞における rIL-8/rGRO $\alpha$ 刺激後の内因性 TNF $\alpha$ 産生       | 52 |
| VII-16   | rIL-8/rGRO $\alpha$ 刺激後の TNF $\alpha$ の mRNA 発現              | 55 |
| VII-17   | セリンプロテアーゼによる TNF $\alpha$ 不活化の検討                             | 55 |
| VII-17-1 | ウサギ rTNF $\alpha$ の関節液による不活化                                 |    |
| VII-17-2 | in vivo における内因性 TNF $\alpha$ の不活化                            |    |
| VIII     | 考察   | 58 |
| VIII-1   | ウサギ LPS 膝関節炎の場における白血球の浸潤と<br>IL-8、GRO $\alpha$ 産生との関連        | 58 |
| VIII-2   | LPS 膝関節炎における抗 IL-8 抗体、抗 GRO $\alpha$ 抗体による<br>白血球の浸潤抑制とその意義  | 59 |
| VIII-3   | rIL-8/rGRO $\alpha$ 関節内投与後の炎症細胞浸潤と内因性 GRO $\alpha$ /IL-8 の誘導 | 59 |
| VIII-4   | 内因性 GRO $\alpha$ /IL-8 の産生誘導とその産生細胞                          | 60 |
| VIII-5   | 抗 IL-8 抗体、抗 GRO $\alpha$ 抗体による好中球の浸潤抑制とその意義                  | 61 |
| VIII-6   | 抗 TNF $\alpha$ 抗体による好中球の浸潤抑制と抑制効果の増強                         | 62 |
| VIII-7   | 内因性 TNF $\alpha$ の産生細胞の検索とその意義                               | 62 |
| VIII-8   | 滑膜培養細胞におけるの内因性 TNF $\alpha$ 産生、mRNA 発現 とその意義                 | 63 |
| VIII-9   | セリンプロテアーゼによる TNF $\alpha$ 不活化の意義                             | 64 |
| IX       | 結語   | 66 |
| X        | 参考文献   | 68 |

## I 要旨

急性炎症反応における特徴的な現象の一つは好中球浸潤であり、この重要な現象はさまざまなメディエーターの関与により微生物のすり抜けを許さないように保障されている。とりわけケモカインの好中球浸潤に関与する役割は重要視されている。ケモカインは元来 *in vitro* のケモタキシス活性を指標に発見されたサイトカインの総称で、数多くのファミリー分子により構成されており、幅広い生物活性のあることが知られている。これらのケモカインはいずれも分子サイズが 8~9 kDa であり、その N 端側の C (cysteine) の存在様式により CXC ケモカイン、CC ケモカイン、C ケモカイン、CX<sub>3</sub>C ケモカインに分類される。このうち CXC ケモカインは主に好中球に、CC ケモカインは主に単球、リンパ球、好塩基球および好酸球に遊走作用を示す。これらのうち好中球浸潤に関連のある CXC ケモカインの代表的な物質として IL-8 (CXCL8; interleukin-8) と GRO $\alpha$  (CXCL1; growth related oncogene $\alpha$ ) があげられている。

我々は、第 1 の実験として大腸菌エンドトキシン (endotoxic lipopolysaccharide; LPS) で惹起したウサギの膝関節炎モデルを用いて、白血球浸潤における IL-8, GRO $\alpha$  の産生動態とその役割を解明することを目的とした。炎症反応の実験対象動物は 雌性 New Zealand white rabbits (体重 2.0-2.5 Kg) を使用した。ウサギ膝関節内に LPS 10 ng を投与し、その後の白血球浸潤動態の検索と平行して、IL-8/GRO $\alpha$  の産生動態を検索した。次に IL-8 又は GRO $\alpha$  をそれぞれの特異抗体を用いてブロックし、お互いのケモカイン産生への影響および白血球浸潤への抑制効果を調べた。このウサギ LPS 膝関節炎モデルにおける IL-8, GRO $\alpha$  の産生は両者ともに早期から始まっており、膝関節液中の IL-8, GRO $\alpha$  はともに 2 時間にピークをもつ産生動態を示した。この早期の産生細胞は、免疫染色の所見等から滑膜表層細胞などの常在性の細胞であることを明らかにした。また LPS 膝関節炎において IL-8 又は GRO $\alpha$  の一方の機能をブロックしても他方の産生量には影響がみられない事により、IL-8, GRO $\alpha$  の産生はお互いに独立している事がわかった。LPS 投与と同時に、IL-8 又は GRO $\alpha$  の機能をそれぞれの特異抗体を用いてブロックすると炎症 6 時間以後 12 時間まで 35%~50% の好中球浸潤の抑制が認められ、これら両方のケモカインを共にブロックすると好中球浸潤の抑制は、60%~65% に達し、その作用は相加的であった。以上の所見から IL-8, GRO $\alpha$  は初期の好中球浸潤

に深く関与していることが明かとなった。この研究過程で我々は、構造的にも作用的にも非常に類似した2つのCXCケモカイン：IL-8、GRO $\alpha$ に従来知られていなかった機能的な差異、役割の違いがあることに気づき、この違いについて検索をすすめた。

第2の実験では、ウサギ膝関節内に同種IL-8, GRO $\alpha$ 組換体(rIL-8, rGRO $\alpha$ )をそれぞれ10 $\mu$ g投与すると好中球の浸潤、他のサイトカイン等の産生を誘導することができ、これらの変化を指標としてin vivoにおけるIL-8, GRO $\alpha$ の機能を比較した。この組換えケモカイン注射という人工的条件下ではその浸出細胞は好中球が主体であり、rIL-8投与による浸潤細胞数は同モル量のrGRO投与後よりやや多かった。また関節液中のケモカイン定量結果からrIL-8は内因性GRO $\alpha$ の産生を誘導し、逆にrGRO $\alpha$ も内因性IL-8の産生を誘導していることが明らかとなった。一方、これらの誘導された内因性ケモカインの機能を検索する目的で、rIL-8投与時に内因性GRO $\alpha$ をブロックしても、浸出好中球の抑制が認められなかった。しかしrGRO $\alpha$ 投与時に内因性IL-8をブロックすると9~24時間で浸出好中球の抑制が認められ、内因性IL-8が2相目の好中球浸潤に関与していることが明らかになった。このことは、IL-8とGRO $\alpha$ の結合するレセプターに違いがあり、IL-8はCXCR1, CXCR2の両者に結合し、シグナルを伝達できるが、GRO $\alpha$ はCXCR2のみしか結合できないためと考えられた。つまりrIL-8投与後にはCXCR1, CXCR2両者が結合され占拠されるため、新たに誘導された内因性GRO $\alpha$ はレセプターに結合できず好中球浸潤に影響を与えない。しかしrGRO $\alpha$ 投与後にはCXCR2のみが結合されCXCR1は空いた状態にある、そして誘導された内因性IL-8はCXCR1に結合できるために2相目の好中球浸潤をもたらしたと考えた。

ケモカイン組換体の注射によって様々なサイトカインの誘導が起こるが、これらの中で、TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ )は代表的な炎症性サイトカインであり、炎症の早期から産生されること、炎症の展開に重要な役割を果たしていることから、rIL-8, rGRO $\alpha$ 投与後の内因性TNF $\alpha$ の誘導を主な指標に検討した。すなわち、rIL-8あるいはrGRO $\alpha$ とともに抗TNF $\alpha$ 抗体を同時投与した。すると、rIL-8投与による好中球浸潤は抗TNF $\alpha$ 抗体でまったく抑制されなかったが、rGRO $\alpha$ 投与による好中球浸潤は抗TNF $\alpha$ 抗体で4時間以降有意に抑制された。rIL-8, rGRO $\alpha$ 投与後の膝関節液中の内因性TNF $\alpha$ の産生は、rIL-8投与ではどの時間帯においても内因性TNF $\alpha$ が検出されないのに対して、rGRO $\alpha$ 投与では2時間をピークとする1相性の内因性TNF $\alpha$ の産生を

認め、rGRO $\alpha$  投与による好中球浸潤が抗 TNF $\alpha$  抗体によって抑制されることと一致した。好中球枯渇ウサギを用いた実験並びに滑膜組織の免疫染色から、この rGRO $\alpha$  により誘導された内因性 TNF $\alpha$  は常在性の滑膜表層細胞などから産生されていることがわかった。次にウサギ膝滑膜の培養細胞を用いて *in vivo* での事象を、*in vitro* でさらに検証すると rIL-8 刺激では内因性 TNF $\alpha$  の産生増加がみられないのに対し、rGRO $\alpha$  刺激では用量依存性に内因性 TNF $\alpha$  の産生量の増加がみられた。一方、滑膜培養細胞の RT-PCR では、rIL-8, rGRO $\alpha$  刺激後の TNF $\alpha$  の mRNA 発現は同程度であった。このことから rIL-8 投与後に誘導される内因性 TNF $\alpha$  は不活性化されているのではないかと考え、その候補としてセリンプロテアーゼを考慮した。このことを検証するためウサギ TNF $\alpha$  組換え体 (rTNF $\alpha$ ) を rIL-8 投与後 2 時間の関節液と *in vitro* でインキュベートすると rTNF $\alpha$  の生物活性が低下し、この rTNF $\alpha$  の *in vitro* での失活はセリンプロテアーゼのインヒビターである PMSF (phenyl methyl sulfonyl fluoride) によって回復した。そこで rIL-8 と PMSF を同時にウサギ膝関節に投与すると、関節液中に内因性 TNF $\alpha$  の活性が検出された。つまり、rIL-8 投与後には内因性 TNF $\alpha$  の産生は誘導されるものの、セリンプロテアーゼによって不活性化されるため好中球浸潤に関与していない。一方 rGRO $\alpha$  投与後には内因性 TNF $\alpha$  の産生が誘導され、失活が起こらないため好中球浸潤に大きく関与している事が判明した。

以上により、好中球浸潤を誘導する 2 つの CXC ケモカインの機能上の違いとその機構が明らかになった。すなわち、IL-8 は直接好中球の浸潤をおこすのに対して、GRO $\alpha$  は好中球浸潤に直接働く他に TNF $\alpha$ 、IL-8 など他のサイトカインを介して好中球浸潤をおこす経路が存在している。また IL-8/GRO $\alpha$  ともに内因性 TNF $\alpha$  の産生を誘導するが、IL-8 により誘導される内因性 TNF $\alpha$  は、同時に IL-8 によって誘導されるセリンプロテアーゼによって不活性化されることが明かとなった。

## II 発表論文リスト

1. Fujiwara K, Matsukawa A, Ohkawara S, Takagi K and Yoshinaga M:

Functional Distinction Between Two CXC Chemokines, Interleukin-8 (IL-8) and Growth Related Oncogene  $\alpha$  (GRO $\alpha$ ) in Neutrophil Infiltration.

Laboratory Investigation , vol.82, No.1, 15~24, 2002

2. Matsukawa A, Yoshimura T, Fujiwara K, Maeda T, Ohkawara S, Yoshinaga M :

Involvement of Growth Related Protein (GRO) in LPS-Induced Rabbit Arthritis: Cooperation between GRO and IL-8, and Interrelated Regulation among TNF $\alpha$ , IL-1, IL-1 Receptor Antagonist, IL-8, and GRO.

Laboratory Investigation , vol.79, No.5, 591~600, 1999

3. 藤原一徳、吉永秀

ケモカインの基礎と臨床：急性炎症とケモカイン

現代医療, vol. 33, No.6, 49(1457)~54(1462), 2001



### III 謝辞

本研究は熊本大学医学部病理学第一講座の吉永秀教授、および同整形外科学講座の高木克公教授の指導のもとに実施しました。両教授の研究をはじめ多面にわたるご指導に深く感謝いたします。

研究を実施するにあたり、病理学第一講座講師の大河原進先生、助手の松川昭博先生にも一方ならぬお世話になりました。暖かいご指導、ご援助に心から感謝いたします。また、技師の前田貴子氏、加賀矢間元子氏、工藤信次氏にも多大のご援助を戴きました。皆さまに心から感謝いたします。

さらに、本研究の実施のために、ウサギ IL-8 cDNA 並びにウサギ GRO cDNA をご供与戴きました米国 National Cancer Institute (Besaeda, Md., U.S.A.) の吉村禎造博士のご協力に厚く感謝し、御礼申し上げます。

#### IV 略語一覧

ABC: avidin-biotin complex

$\beta$ -TG:  $\beta$ -thromboglobulin

CTAP-III: connective tissue-activating protein- III

DARC: duffy antigen receptor for chemokine

DAG: diacylglycerol

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

ENA-78: epithelial neutrophil activating protein - 78

fMLP: N'-formyl methionyl leucyl phenylalanine

GRO: growth related oncogene

HAT selection medium: hypoxanthine-aminopterin-thymidine 選択培地

HUVEC: human umbilical endothelial cells

IL-1 $\beta$ : interleukin-1 $\beta$

IL-1 Ra : IL-1 receptor antagonist

IL-8: interleukin-8

IP3 : inositol trisphosphate

IP-10: interferon-inducible protein-10

IPTG: isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside

LPS: lipopolysaccharide

LTB4: leukotriene B4

mAb: monoclonal antibody

MCP-1: monocyte chemoattractant protein -1

MDNCF: monocyte-derived neutrophil chemoattractant factor (synonym of IL-8)

MEM: minimal essential medium

MIG: monokine induced by interferon- $\gamma$

MIP: macrophage inflammatory protein

MOPS : 3-[N-morpholino] propane sulfonic acid

NADPH: reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NAP-2: neutrophil activating protein -2

PBS: phosphate buffered saline

PLC: phospholipase C

PMSF: phenyl methy sulfonyl fluoride

PKC: protein kinase C

PI 3K: phosphatidylinositol 3 kinase

RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction

PF-4: platelet factor-4

RANTES: regulated on activation, normal T expressed and secreted

RPMI 1640: Rosewell Park Memorial Institute 1640 培地

rGRO: recombinant growth related oncogene

rIL-8: recombinant interleukin-8

rTNF $\alpha$  : recombinant tumor necrosis factor  $\alpha$

SDF-1: stromal cell-derived factor-1

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis

TNF $\alpha$  : tumor necrosis factor  $\alpha$

## V 研究の背景と目的

### V-1 炎症反応

炎症は生体に内的または外的な刺激が加わった場合に生体防御反応の一つとして起こる一連の適応反応であるが、この過程においては、異物、特に外来の微生物を排除して組織を守るための反応と同時に組織の損傷を引き起こす点に問題がある。このような炎症反応は哺乳動物においては、局所の微小循環系、とくに細静脈部を中心に展開され、血管床の拡張、血管透過性の亢進、血漿成分の浸出、炎症細胞の浸潤がみられることを特徴とする。この異物排除過程、組織損傷、および修復過程の両反応に主役を演じる浸潤細胞は好中球、マクロファージ、リンパ球であり、これらの白血球が時間を追って炎症局所に浸潤してくる。炎症の種類によっては、好酸球、好塩基球浸潤が強くみられる場合もある [1]。

炎症反応の機構解析にはさまざまな動物、炎症刺激が用いられているが、本研究の対象としたウサギの急性炎症においては、好中球（ウサギにおいてはその染色性から偽好酸球、pseudoeosinophil ともよばれるが、本論文では好中球と記載した。）浸潤が強くと認められ、マウスやラットなどの齧歯類のようにマクロファージ、リンパ球の反応が比較的強い反応をみせる動物に比較し、細胞浸潤の様相が、よりヒトに類似している。また、好中球浸潤に大きな役割を果たしているサイトカインの1つである IL-8 は現在、ヒト、ウサギ、ヒツジ、ブタ、イヌにおいてその存在が知られているが [2]、齧歯類ではヒトの IL-8 に相当する因子は見いだされておらず、IL-8 と同様に Glu-Leu-Arg (ELR-motif) を有する他の CXC ケモカイン、例えば GRO や ENA-78 が同様の機能を果たしていると推測されている。したがって、ヒトの急性炎症の展開機構を模倣し、とくにサイトカインの機能を分析する場合には齧歯類の炎症よりも、ヒトと同様に IL-8、GRO も保持しているウサギの炎症がより適している。

また、炎症の場として選んだ後肢の膝関節は対側をコントロールとして使用でき、しかも関節腔という遊離体腔を持つために、浸潤白血球を回収し定量できる都合の良い場所であり、好んで炎症研究に使用されているが、この場合、マウス、ラット、モルモットなどの小動物の膝関節腔は小さくて定量的な実験は困難である。

本研究で起炎刺激として用いたエンドトキシン（LPS）は細菌感染の場合を想定した刺激として好んで用いられている刺激であり、生菌または死菌を用いる場合と比べ刺激

が単純であり実験成績の再現性などにすぐれている。また、ウサギは LPS に対する感受性がヒトと同様に高く、本実験で用いている 10 ng という微量で強い炎症を起こすことが出来る。これに対し齧歯類は LPS に対する感受性が比較的 low、十分強い炎症を起こすために、通常  $\mu\text{g}$  レベルの量が用いられている。

また、ウサギリコンビナント IL-8、GRO $\alpha$  はいずれも分子量が約 8000 であり、同種コンビナントを直接ウサギ膝関節に投与する場合、その機能を定量的に比較検討できるように両者とも 10  $\mu\text{g}$  を投与した。実際 rIL-8、rGRO (10  $\mu\text{g}$ ) 投与後、共に膝関節内に十分な好中球浸潤 (1500~2500 万/joint) を誘導できた。

## V-2 ウサギ膝関節炎における白血球浸潤の動態

ウサギの LPS 膝関節炎では、好中球の浸潤は 9 時間をピークとし、マクロファージの浸潤のピークは 24 時間である。この炎症巣における白血球の浸潤動態には 2 種の要因が関与している。すなわち、1 つは炎症巣への白血球の流入の速度と時間であり、他は炎症巣からの白血球の流出や、細胞死による消失の速度と時間である。好中球についてみれば、その集積は 9 時間をピークとするが、その流入は 3 時間をピークとしており [3]、9 時間までは流入の速度が消失の速度を上回っているが、それ以後は消失の速度が流入のそれを上回っている。この好中球の消失にも 2 種の機構が知られている。すなわち、1 つは炎症巣における好中球の apoptosis を主体とした細胞死であり、死滅した好中球は、その場に浸潤したマクロファージにより貪食されて消失する。他の消失の要因は炎症巣からの、好中球のリンパ管を介する流出であり、流出した好中球のほとんどは局所リンパ節で貪食処理される。マクロファージについてみれば、その集積のピークは 24 時間であるが、流入のピークは 3~4 時間であり、好中球の場合と異なり少数のマクロファージの流入が長時間持続している [4]。また、マクロファージは好中球よりも apoptosis に陥りにくく、炎症巣への流入速度が消失速度を上回る時間が長いために、炎症後期までその集積は強くなり、炎症後期ではその集積が目立つようになる。

炎症反応の進展は異物、刺激の種類によってさまざまな修飾を受けるが、基本的な反応のパターンは類似しており、生体にプログラムされた反応が時間を追って順次展開されることによって機能を果たしている。すなわち、炎症の基本的な反応は刺激そのものによっておこるのではなく、その刺激によってホストの体液性物質や細胞が産生する生理活性因子によって誘導、展開される。このような生理活性因子はメディエーターと称

され、炎症反応の物質的基盤を理解するために重要な物質群である。

### V-3 炎症局所への白血球浸潤のメディエーション研究の流れ

炎症反応を構成するさまざまな現象のうち、炎症の場への白血球の浸潤は生体防御の観点からも、また炎症反応による組織障害の観点からも、最も重要な反応である。特に好中球の浸潤とマクロファージの浸潤は炎症刺激の種類を問わず認められる共通の反応であり、その機構解析は古くから炎症研究の中心的な興味を集めてきた。この白血球浸潤に関与するメディエーターの研究は Boyden によるケモタキシス測定のためのチャンバーの開発により *in vitro* で多量のサンプルについてケモタキシスの測定が可能になって以後急速に進展した [5]。これらの研究により、ケモタキシス因子としては細菌性のペプチド（formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine: fMLP 等）、補体関連因子（C5,6,7 complex, C3a および C5a 等）の関与がまず明らかにされた。また、arachidon 酸カスケード産物（leukotriene B<sub>4</sub> 等）の関与も明瞭になったが、これらの因子の作用は白血球の種類に関して特異的ではなく、炎症の場において見られる好中球、マクロファージ、リンパ球等の浸潤の時間的なずれや、炎症の種類による浸潤細胞の構成比率の違いなどを説明することが出来なかった。Hayashi らは、炎症局所から抽出された免疫グロブリンの分解産物である leukoegresin が好中球に特異的なケモタキシスと *in vivo* における好中球浸潤を起すことを報告し、白血球浸潤には特異的な浸潤機構が存在することが明らかにされた [6]。さらに、ケモカインの研究が進展するにつれて、白血球浸潤には多くの白血球特異性を示すケモタキシス因子が存在することが明らかになった。特に、ケモカイン研究のエポックとなったのは吉村らを中心にした好中球特異的な作用を示す IL-8 (MDNCF) の発見 [7] と、単球特異的な作用を示す MCP-1 の発見 [8] であり、この研究がスタートとなって炎症の場の白血球浸潤機構に関するサイトカイン研究は新しい展開を迎えることになった。

### V-4 炎症性サイトカイン、特にケモカイン

炎症反応にかかわる重要な役割を果たしている生理活性因子（炎症メディエーター）としてサイトカインと呼ばれる炎症局所の細胞により微量活性因子群が注目され多くの研究が行われている。これらのサイトカインはさまざまな刺激によって産生が誘導され、ひとつのサイトカインは他のサイトカインの産生を誘導したりその生物活性を修飾する

など互いにネットワークを形成しながら炎症反応の展開と収束にかかわっていると考えられている [9]。

サイトカインは種々の細胞から分泌される生理活性を持つペプチドまたは糖ペプチドで、抗体のような特異性を持たないものの総称であり、当初はリンパ球が抗原刺激によって産生する因子として、lymphokine と呼ばれるものが知られていたが、リンパ球以外の細胞もこのような微量活性因子の産生に関与していること、炎症や免疫現象以外においても、このような微量活性因子による autocrine、paracrine 機能が生体調節に重要な役割を果たしていることが次々に明らかにされるようになり、現在はサイトカインという概念のもとに、便宜上まとめられている因子である。すなわち、サイトカインは生体内で炎症反応のみならず免疫、造血機構などにも深く関与し、感染や腫瘍に対する生体防御機構において重要な役割をもつことが知られてきている。このような概念の出現は極めて早く、すでに 1926 年 Zinsser and Tamiya [10] はツベルクリン抗原で刺激されたモルモットの細胞が血管透過因子を培養上清中に遊離することを報告している。

この報告において追求したマクロファージの浸潤にもサイトカインが関与していると考えられているが、白血球に対し走化性を持つサイトカインはケモカインと総称され、そのほとんどは塩基性のペプチドで、ヘパリンへの結合性を示す (CX<sub>3</sub>C ケモカインである fractalkine は例外)。ケモカインは、その構造から 4 種類に分類されている。すなわち、4 個のシステイン残基のうち、N 端側の 2 個のシステインの間にアミノ酸 1 残基を持つ CXC ケモカイン、2 個のシステイン残基が隣接している CC ケモカイン、この部分にシステイン残基が 1 個しかない C ケモカイン、アミノ酸残基が 3 個挿入されている CX<sub>3</sub>C ケモカインである。これらのケモカインには多数の因子が知られ、ファミリー分子群を構成している。CXC ケモカインファミリーにも多数の因子が発見されているが、これら CXC ケモカインのうち、CXC 構造の N 端側に近接して Glu-Leu-Arg のいわゆる ELR-motif が存在するものと、この構造が存在しないものがあり、それぞれの生物機能が異なっていることが注目されるようになってきている。ELR-motif を有する CXC ケモカインは、in vitro で好中球に強いケモタキシス効果を示し、IL-8、GRO  $\alpha$ 、GRO  $\beta$ 、GRO  $\gamma$ 、neutrophil activating protein-2 (NAP-2)、epithelial neutrophil activating protein-78 (ENA-78)、connective tissue-activating protein-III (CTAP-III)、 $\beta$ -thromboglobulin ( $\beta$ -TG) などが知られており、主に好中球、好塩基球、繊維芽細胞などに対し走化性をもち、これらのケモタキシス作用に加え

て、血管新生作用も示す。しかし ELR-motif を有しない CXC ケモカインは、主にリンパ球に対しケモタキシス作用を示し、血管新生に関しては抑制作用が報告されており、炎症などの組織修復においてはこれら両者の CXC ケモカインは共同してケモタキシスとは別の機能を担っていることが明らかになりつつある。この ELR-motif が存在しない CXC-ケモカインとしては、現在 platelet factor-4 (PF-4)、interferon-inducible protein-10 (IP-10)、monokine induced by interferon- $\gamma$  (MIG)、stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) が知られている。ほとんどの CXC ケモカイン遺伝子はクラスターを形成して、ヒトでは 4q12-21 染色体に存在している。なお、本研究の主題のある CXC ケモカインについても極めて多数の因子の遺伝子がクローニングされつつあり、その名称も統一的な番号を付した表示が提唱されつつあるので、この新しい名称も含んで表 1 に現在知られている知見を整理した。

一方、CC ケモカインファミリーには MCP-1、MCP-2、MCP-3、MIP-1  $\alpha$ 、MIP-1  $\beta$ 、RANTES (regulated on activation, normal T expressed and secreted) などが主要な因子として知られ、ヒトでは 17q11-12 染色体に存在している。その機能は主に単球、T 細胞、好酸球、繊維芽細胞などに対し走化性を持つ。

また、C ケモカインファミリーには lymphotactin  $\alpha$  および  $\beta$  が知られリンパ球に走化性を持つ。そして、CX<sub>3</sub>C ケモカインにはフラクタルカインが知られる [11-13]。

## V-5 ケモカイン・レセプター (特に CXCR1、CXCR2 について)

ケモカインには現在では極めて多数の因子が含まれており、巨大なファミリーを形成していることが明らかになっている。したがって、リガンドであるケモカインに対するレセプターも極めて多彩なものが知られるようになってきている。

ケモカイン・レセプターはいずれも細胞膜を 7 回貫通する 3 量体の G protein 結合型のレセプター (G タンパク質共役型 7 回膜貫通型レセプター) であるという共通の特徴を持っており、対応するケモカインに応じて、それぞれ CXCR、CCR およびその他の 3 種類に分類されている。現在、CXCR には CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR 4 の 4 種が知られており、ヒトでは 2q33-36 染色体に存在する。CCR には CCR1 から CCR9 までの 9 種のレセプターが報告されており、これらの多くはヒトで 3p21 染色体に存在する。その他に分類されている Duffy 抗原レセプター (DARC, Duffy antigen receptor for chemokine) も多くの CXC ケモカインと結合するので CXCR の 1 つで



もあるが、また CC ケモカインとも結合能がある。また、サイトメガロウイルス産物 (US28) に対するレセプターとして発見された CMV-US28R は CCR として機能している。

CXCR1 の発現細胞は主に好中球であり、他に単球、好塩基球、好酸球、CD8<sup>+</sup>T 細胞、NK 細胞がある。その機能は、好中球の細胞表面に発現し、IL-8 などと結合してこれらの細胞の活性化・炎症部位への遊走に関与する。CXCR1 を発現している細胞、および CXCR1 を導入した Jurkat 細胞は、IL-8 や NAP-2 に対して遊走活性を示す。IL-8 と CXCR1 の結合は、Ca<sup>2+</sup> 流入、Mac-1 などの細胞接着分子の発現亢進、脱顆粒、アクチン重合、レセプター-C 末端のリン酸化を引き起こす [14-21]。ケモカインレセプターを介した情報伝達については、CXCR1 を用いた解析が最も進んでいる。他の G 蛋白結合型レセプターと同様に、IL-8 は CXCR1 に結合するとレセプターに会合している  $\alpha\beta\gamma$  からなる 3 量体の G 蛋白が解離することによって、PLC が活性化され IP3 および DAG が生成される。IP3 はカルシウム濃度を上げ、好中球からのリソソームの放出や呼吸バーストを起こす。DAG は PKC を活性化させ細胞を刺激する。G 蛋白活性化は、さらに低分子の G 蛋白である RhoA と PI 3K を活性化させる。RhoA の活性化はインテグリンを介した細胞の接着を誘導し、NADPH オキシダーゼの活性化をもたらす。また、PI 3K の活性化は MAP キナーゼを活性化し、細胞の活性化、接着、分化並びに増殖に作用する [22]。

最近、ヒト CXCR1 の立体構造が解明され、CXCR1 の中央にある亀裂に IL-8 が結合することが明らかとなった [23]。これにより、立体構造から IL-8 アンタゴニストをデザインすることが可能になると考えられている。敗血症患者の末梢血好中球では、CXCR2 の発現は正常人のに比べて著明に低下しているが、CXCR1 の発現は低下していないことから、敗血症患者において CXCR1 が好中球浸潤に主要な働きをしていると推測される [24]。

CXCR2 の発現細胞は主に好中球であり、他に単球、好塩基球、好酸球、CD8<sup>+</sup>T 細胞、NK 細胞がある。その機能は、好中球の細胞表面に発現し、IL-8 などと結合してこれらの細胞の活性化・炎症部位への遊走に関与する。CXCR2 を導入した Jurkat 細胞は、IL-8、GRO、NAP-2 や ENA-78 に対して遊走活性を示す。IL-8 と CXCR2 の結合は、Ca<sup>2+</sup> 流入、CD11b の発現亢進、Mac-1 などの細胞接着分子の発現亢進、脱顆粒、アクチン重合、レセプター-C 末端のリン酸化を引き起こす [14-21,25-31]。CXCR2 は乾癬患

者の皮膚病変において発現している [32]。また最近、肥満細胞の炎症局所への遊走に CXCR2 が関与している可能性が示唆されている [33]。マウス CXCR1, CXCR2 ノックアウトマウスでは、脾腫、頸部リンパ節腫大、骨髄外造血、急性炎症時の好中球浸潤の欠如が認められた [34]。

つまり好中球上には CXCR1、CXCR2 は恒常的に発現しており、CXCR1 は IL-8 及び GCP-2 とのみ高親和性にて結合するのに対して、CXCR2 は IL-8 以外に GRO、NAP-2、ENA-78 など最初のシステイン残基の前に ELR モチーフを保有する複数の CXC ケモカインとも高親和性を示して結合する (表 1, 2A)。この 2 つのレセプターの違いによる生体反応の違い、クロストーク、シグナル伝達に関して現在研究が進められている。

## V-6 IL-8 および GRO $\alpha, \beta, \gamma$

1987 年、吉村と松島は米国国立癌研究所において活性化ヒト白血球が産生する好中球遊走因子の精製とその遺伝子のクローニングに成功した。その後、この因子は T リンパ球や好塩基球にも遊走活性を示し、好中球の種々の活性化にも働く一方、様々な組織細胞からも炎症惹起性の刺激に応じて多量に産生されることが判明し IL-8 と命名された [35,36]。IL-8 はヒトでは 99 個、ウサギでは 101 個のアミノ酸からなる前駆体として合成され、N 端からセリンプロテアーゼによりシグナルペプチドが切り離されて最終的にヒトでは 77 個、ウサギでは 78 個のアミノ酸からなる成熟型のタンパク質となる。このタンパク質は、分泌顆粒中に移行した後、刺激により分泌される分泌ペプチドである。成熟型 IL-8 はヒト、ウサギとも分子量約 8000 で、4 つのシステイン残基を持ち、1、3 番目および 2、4 番目のシステイン残基が disulfide 結合で結ばれる。1 番目と 2 番目の 2 つのシステイン残基は C-Q-C (Cys-Gln-Cys)、すなわち CXC 構造をとる。この CXC 構造に続く N 末端側には、ELR-motif が存在する [37]。IL-8 のアミノ酸配列を表 2B に示す。IL-8 を産生する細胞は、単球、マクロファージ、線維芽細胞、肥満細胞、表皮細胞など種々の細胞があげられる。IL-8 の主な機能は好中球走化性、好塩基球・T 細胞の遊走活性、骨髄より末梢血への好中球の動員、好中球における細胞内リゾチーム酵素の放出・LTB<sub>4</sub> の産生誘導・活性酸素の産生誘導など好中球の活性化、好中球の血管内皮細胞への接着増強、培養内皮細胞に対する好中球の接着促進、血管新生への関与などが明らかとなっている。抗 IL-8 抗体を用いた研究では、ウサギ脳虚血

再灌流障害モデルにおいて脳血液関門の透過性を著明に抑制・脳梗塞領域の拡大を抑制し、ウサギ敗血症誘導性成人呼吸促迫症候群（ARDS）モデルにおいては好中球の肺組織への浸潤とそれに伴う肺浮腫ならびに肺胞構造の破壊を著明に抑制・肺機能の低下を抑制したと報告されている [38-40]。これらの知見から IL-8 が病態の悪化に重要な役割を果たしていることが明らかにされ、炎症・免疫介在物質としてケモカインが位置づけられた。最近の研究では、血管内皮細胞の間を白血球が通り抜ける際に、今まではケモカインが血管内皮細胞間を拡散して白血球が通り抜けると考えられていたが、実際は IL-8 が血管内皮細胞に取り込まれて内皮細胞間腔に表出し、そこを白血球が通って血管外へと浸潤していくことが判明した。このとき IL-8 の C 末端部分が血管内皮細胞との接着に重要な役割を担っていることが明らかとなった [41]。この IL-8 をターゲットにした抗炎症剤として、モノクローナル抗体が注目されており、実際にヒト型化にも成功している。このモノクローナル抗体は臨床応用の最有力候補として考えており、現在、乾癬や慢性関節リウマチに対する臨床治験も進行中である。

GRO は、ヒトでは 107 個、ウサギでは 104 個のアミノ酸からなる前駆体として合成され、N 端からシグナルペプチドが切り離されて、ヒトでは 72 個、ウサギでは 71 個のアミノ酸からなる成熟型のタンパク質となる。このタンパク質は分泌顆粒中に移行した後に、刺激により分泌される分泌ペプチドである。成熟型 GRO はヒト、ウサギとも分子量約 8000 であり、分子内に 4 つのシステイン残基を有し、最初の 2 つのシステイン残基は C-Q-C (Cys-Gln-Cys)、すなわち CXC 構造をとる。この CXC 構造に続く N 末端側には、ELR-motif が存在する [37]。GRO $\alpha$  のアミノ酸配列を表 2B に示す。GRO を産生する細胞は、単球、気道上皮細胞、肺胞マクロファージ、ケラチノサイト、メラノーマ細胞など種々の細胞があげられ、GRO には互いに相同性の高い GRO  $\alpha$ 、GRO  $\beta$ 、GRO  $\gamma$  の 3 つの分子が存在している。GRO  $\alpha$  は、ヒトメラノーマ細胞で分泌される細胞分裂誘導因子として発見され、マウスのヒトメラノサイトに悪性形質転換を誘導すること、さらに抗 GRO $\alpha$  抗体の投与によりその増殖が抑制されることが明らかとなった [42-45]。一方、他のケモカインと構造が似ていることから、GRO $\alpha$  は炎症細胞遊走因子としても注目され、IL-1 や TNF $\alpha$ 、LPS 刺激により単球、関節滑膜細胞、皮膚線維芽細胞、眼球毛様体上皮細胞で GRO $\alpha$  遺伝子ならびにタンパク質の発現が亢進し、かつそれらが好中球遊走性を持つことが確認された [46-48]。炎症性疾患との関連については、ヒトでは慢性関節リウマチ患者の滑膜由来線維芽細胞や乾癬患者の表皮

において GRO  $\alpha$  の遺伝子ならびにタンパク質の発現が亢進しており、GRO $\alpha$  が皮膚や関節における炎症ならびに細胞増殖に重要な役割を果たしていることが判明した [49-51]。抗 GRO $\alpha$  抗体により経気道的 LPS 刺激による多核白血球の肺組織への浸潤抑制、内皮細胞、ヒトメラノーマ細胞の増殖抑制、血管新生の抑制が認められることから、急性炎症に対する抗炎症剤としての可能性や抗腫瘍活性をもつ薬剤への可能性が示唆されている [52-54]。

ヒトメラノーマ細胞において GRO  $\beta$  とそのレセプターである CXCR2 の発現が報告され、メラノーマ細胞の増殖への関与が注目されている [55]。GRO  $\beta$  は、好中球走化性や好中球脱顆粒などがその機能としてあげられるが、*in vivo* における生理的・病理的意義については不明な点が多い。

GRO  $\gamma$  の機能としては、ヒト骨髄由来の造血幹細胞・前駆細胞に対する増殖抑制、好中球に対する走化性・ケモカインシスなどがあげられる。単球からは成熟体タンパク質の N 末端にある 4 つのアミノ酸が欠損した GRO  $\gamma$  が主に分泌され、メラノーマ細胞からは全長の成熟体タンパク質が主に分泌される。ヒトメラノーマ細胞において GRO  $\gamma$  とそのレセプターである CXCR2 の発現が報告されている。また、ラットの網膜を用いた血管新生の実験において、GRO  $\gamma$  の投与によって血管新生が誘導され、この活性は GRO  $\gamma$  に対する中和抗体の投与によって顕著に抑制されたとの報告もある [56,57]。

以上述べたように、IL-8、GRO $\alpha$  はいずれも CXC ケモカインに属し、ELR-motif を有していること、*in vitro* および *in vivo* において好中球遊走能を示し、分子構造上、機能上も類似した因子として知られている。また IL-8、GRO $\alpha$  は臨床的にも多数の好中球浸潤を特徴とする疾患において検出されており、血中好中球の炎症組織への遊出において鍵となるケモカインであるとして注目されている。IL-8 については、*in vivo* における作用、機能についての報告がある。しかし、GRO $\alpha$  については *in vivo* での報告がほとんどなく、いまだにその生物作用が明らかでない。さらにお互いの機能的な差異については報告がない。今回、CXC ケモカインのうち代表的な IL-8、GRO $\alpha$  に注目し、*in vivo* での生物作用並びに機能差異についても検討した。

表 1. CXC ケモカイン及びそのレセプター

| 新しく提唱されている名称 |           | 通常知られている名称                   | 標的細胞         | レセプター        |
|--------------|-----------|------------------------------|--------------|--------------|
|              | ELR-motif |                              |              |              |
| CXCL1        | +         | GRO $\alpha$ /MGSA- $\alpha$ | N, MC        | CXCR2 >> R1  |
| CXCL2        | +         | GRO $\beta$ /MGSA- $\beta$   | N            | CXCR2        |
| CXCL3        | +         | GRO $\gamma$ /MGSA- $\gamma$ | N            | CXCR2        |
| CXCL4        | -         | PF4                          | M, EC        | CXCR2        |
| CXCL5        | +         | ENA-78                       | N, MC        | CXCR2        |
| CXCL6        | +         | GCP-2                        | N            | CXCR1, 2     |
| CXCL7        | +         | NAP-2/CTAP-III               | N, MC        | CXCR2        |
| CXCL8        | +         | IL-8/NAP-1/MDNCF             | N, MC, E, NK | CXCR1, 2     |
| CXCL9        | -         | MIG                          | T, NK, EC    | CXCR3        |
| CXCL10       | -         | IP-10/CRG-2                  | T, NK, EC    | CXCR3        |
| CXCL11       | -         | I-TAC/ beta-R1/H174/IP-9     | T, NK        | CXCR3        |
| CXCL12       | -         | SDF-1/PBSF                   | T, M, DC, NK | CXCR4        |
| CXCL13       | -         | BLC/BCA-1                    | B, T, M      | CXCR5        |
| CXCL14       | -         | BRAK/bolekine                | M            |              |
| CXCL15       | +         | Lungkine (murine)            | N            |              |
| CXCL16       | -         |                              | T            | STRL33/BONZO |

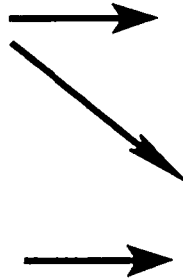
Cell abbreviation: B; B cell, DC; dendritic cell, EC; endothelial cell, M; monocyte/macrophage, MC; mast cell, N; neutrophil, NK; natural killer cell T; T cell

表 2A, CXC ケモカインと CXCR1, CXCR2 との対応関係

CXC ケモカイン

**IL-8**  
**GCP-2**

**GRO $\alpha$**   
**NAP-2**  
**ENA-78**



好中球

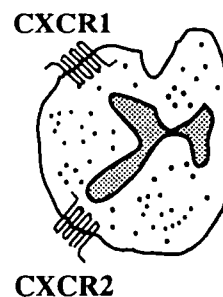


表 2B, IL-8 と GRO $\alpha$  のアミノ酸配列

Human IL-8

AVLPRSAK**ELRC**<sub>Q</sub>**C**IKTYSKPFHPKFIKELRVIES  
GPH**C**ANTEIIVKLSDGREL**C**LDPKENWVQRVVEKFLKRAENS

Rabbit IL-8

AVLTRIGT**ELRC**<sub>Q</sub>**C**IKTHSTPFHPKFIKELRVIES  
GPH**C**ANSEIIVKLVLDGREL**C**LDPKEKWWVQKVQIFLKRAEQQE

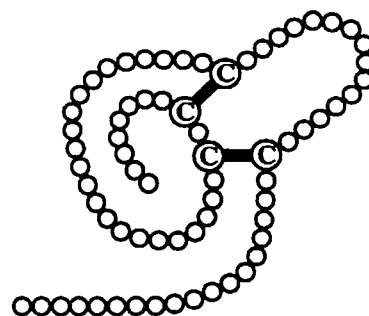
Human GRO $\alpha$

LVAAGRRAAGASVAT**ELRC**<sub>Q</sub>**C**LQTLQGIHPKNIQSVNVKSP  
GPH**C**AQTEVIATLKNGRKA**C**LNPAAPMVKKFLOKRLSNGNSS

Rabbit GRO $\alpha$

ALT**ELRC**<sub>Q</sub>**C**LQTVQGIHLKNIQNLKVLSP  
GPH**C**AQTEVIATLKSGQEA**C**RNPAAPMVKKFLOKRLSNGNSS

CXC ケモカインの構造



- ⊙ システイン残基
- disulfide 架橋
- アミノ酸

分子内に 4 つのシステインを有し、最初の 2 つのシステインは C-Q-C (Cys-Glu-Cys)、すなわち CXC 構造をとり、その N 末端には、ELR (Glu-Leu-Arg) モチ - フが存在する。また、N 末端より 1 番目と 3 番目のシステイン間、2 番目と 4 番目のシステイン間には disulfide 架橋が形成されている。(アミノ酸配列は N 末端より示している。)

4 つのシステイン： **C**、 ELR モチ - フ： **ELR**

## VI 実験材料及び方法

### VI-1 リコンビナントウサギサイトカイン

#### VI-1-1 ウサギ rGRO $\alpha$ の発現ベクターの作成

ウサギ rGRO $\alpha$  cDNA はウサギ脾細胞を concanavalin A で刺激して得られた cDNA ライブラリーからクローニングされたものを米国 NCI 吉村博士より供与戴いた。その遺伝子全長を baculovirus の発現ベクター pBlueBac4.5 に組み込み、Bac-N-Blue DNA と共に lipofectin 存在下に Sf9 細胞にトランスフェクションした。その培養上清から、GRO $\alpha$  遺伝子を含む遺伝子組み換えウイルスを分離精製した。さらに、この遺伝子組み換えウイルスを Sf9 細胞に感染させウイルス量を増幅し、多量のウイルスを含む培養上清を得た。

#### VI-1-2 ウサギ rGRO $\alpha$ の産生、精製

ウサギ rGRO $\alpha$  は GRO $\alpha$  遺伝子を含む遺伝子組み換えウイルスを High Five insect cell に感染させた培養上清から限外濾過法、ゲル濾過法、および CM-Sepharose カラム、Mono S カラムによる陽イオン交換法を用いて精製した。

High Five insect cell  $3 \times 10^6$  / 10 ml 培地（組成表を参照）を T-75 フラスコ中で、27 $^{\circ}$ C 孵卵器内に 3-4 日間静置し confluent になった後、ピペッティングにより剥離、回収した。この細胞  $9 \times 10^6$  を新しい T-75 フラスコへ移し、これに上記遺伝子組換えウイルスを MOI (multiplicity of infection) =5 となるように入れた。培地の量は最終的に 10 ml/T-75 とし、27 $^{\circ}$ C 孵卵器内 3-4 日間静置し培養液を回収、遠心した培養上清を限外濾過法（Amicon YM-3 膜、排除限界 Mr. 3 kDa ; Amicon Grace Japan, 東京）により 10 倍程度濃縮した。その後、HiLord G-75 カラムを 100 mM Tris + 0.2 M NaCl + 0.05 % NaN<sub>3</sub> で平衡化した後サンプルを注入した。この溶出活性分画を Amicon YM-3 で濃縮後、100 mM ammonium acetate + 0.1 M NaCl (PH 5.5) に対して透析、さらに HiTrap CM-Sepharose カラムによる活性分画を 100 mM HEPES + 0.1M NaCl (pH7.4) に対して透析し、この分画を陽イオン交換体である Mono S カラムを用いて精製した。溶出は、100 mM HEPES + 0.5M NaCl (pH7.4) を最終溶出バッファーとする直線濃度勾配法により溶出した。この条件下で活性分画は、380 ~ 420 mM NaCl の位置に溶出される。この活性分画を PBS(-) に対して透析後、Micro BCA protein assay kit (Pierce Cat No.23023235) (フナコシ) を用いてタンパク量を測定した。なおこの精製過程における生物活性は in vitro ケモタキシス法により測定した。

#### VI-1-3 ウサギ rIL-8、rTNF $\alpha$ の作成

これらの組換体はそれぞれ、過去に我々が開発した方法により作成した。すなわち、ウサギ rIL-8 は concanavalin A で刺激したウサギ脾細胞から単離し、pBluescript II, SK(-) に組み込んだ IL-8 cDNA から EcoRI で切断した成熟型の分子をコードする cDNA を発現ベクター pCAGGS に組み込み、カルシウム沈殿法により、COS-7 細胞にトランスフェクトし、その培養上清からゲル濾過法、および Mono S カラムによる陽イオン交換法を用いて精製した [60]。

ウサギ rTNF $\alpha$  は concanavalin A で刺激したウサギ脾細胞から、報告された方法にしたがって [58-59] PCR 法により成熟型をコードする部分の cDNA を増幅し、発現ベクター pQE-30 (QIAGEN, Inc., Chatsworth, California) に組み込み、E. Coli M15[pREP4] (QIAGEN) をトランスフォームした。この大腸菌を 1mM isopropyl B-D-thiogalactopyranoside (IPTG) で刺激して培養し、菌体抽出物を出発材料とし、Ni<sup>2+</sup>-chelate カラム、Mono S カラムをこの順番に使用して精製した [59]。

なお、これらの組換体は、極力エンドトキシンを含まない試薬、緩衝液を用いて作成したが、最終段階において、さらに、Kurimover II カラム (栗田工業) を通過させて、エンドトキシンの混入を除去した。これらの標品のエンドトキシン混入量は QCL-1000 キット (Bio-Whittaker, Walkersville, MD) により測定し、1ng/mg 組換体以下であることが確認された。

## VI-2 抗ウサギサイトカイン抗体

### VI-2-1 抗ウサギ GRO $\alpha$ 多クローンおよび単クローン抗体の作成

抗ウサギ GRO $\alpha$  多クローン抗体はヤギを免疫して作成した。すなわち、ウサギ rGRO  $\alpha$  100  $\mu$ g を Freund 完全アジュバント (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) を用いて 2 週毎に免疫し、8 回の免疫後、血清沈降抗体価が上昇しているのを確認後、さらに 100  $\mu$ g の rrGRO $\alpha$  を Freund 不完全アジュバント (Difco Laboratories) に混じてブースター免疫し、1 週後に採血し、血清を分離した。なお、rGRO $\alpha$  特異的多クローン IgG 抗体が必要な場合は、この抗血清から DEAE カラムによる IgG 分画を採取した後、これを 1 mg rrGRO $\alpha$  を結合させたアフィニティー・カラムに吸着させ、0.2 M, pH 3.0 酢酸緩衝液により溶出して作成した。

抗ウサギ GRO $\alpha$  単クローン抗体は、rrGRO $\alpha$  100  $\mu$ g を Freund 完全アジュバントと混じり、2 週間隔でマウスを 3 回免疫後、100  $\mu$ g の rrGRO  $\alpha$  でブーストし、4 日後に脾細胞を採取し、50 % polyethylene glycol 4000 (Dupont Merck Pharmaceutical Co., Darmstadt, Germany) 中で、NS-1 myeloma 細胞と、脾細胞/NS-1 細胞比 10/1



の条件下で融合させた。この hybridoma 細胞は 10% fetal calf serum (FCS) 添加 RPMI 1640 - HAT 選択培地中で、96-well プレートを用いて増殖、選択し、クローニングは、特異的に精製した抗ウサギ GRO $\alpha$  多クローン IgG でコートし、rrGRO $\alpha$  を結合させたプレートにより、結合する hybridoma クローンを選択した。結合したマウス IgG の検出は、peroxidase 標識ヤギ抗マウス IgG 多クローン抗体 (Cappel Laboratories, Malvern, PA.) により行った。最終的に選択した hybridoma は無血清 SF-O 培地 (三光純薬) 中で増殖させ、その上清中の単クローン抗体は Protein-A カラム (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA.) を用いて精製した。

上述の抗ウサギ GRO $\alpha$  多クローン抗体並びに単クローン抗体は、in vitro ケモタキシン活性を指標に、中和活性を測定した結果、中和機能を持つことが確認された。

#### VI-2-2 抗ウサギ TNF $\alpha$ 抗体および抗ウサギ IL-8 抗体の作成

rTNF $\alpha$ 、rIL-8 に対する抗体も、以前に報告した [59-61] 方法 (今回の免疫方法とほぼ同様) により作成したものを使用した。

これらの精製した抗体分画、抗ウサギ GRO $\alpha$ mAb、抗 IL-8 IgG、抗 TNF $\alpha$  mAb へのエンドトキシンの混入量は QCL-1000、または Toxy Color System (生化学工業、東京) により測定した結果、それぞれ 1.0 ng/mg、0.9 ng/mg および 3.2 ng/mg 以下であった。

#### VI-3 エンドトキシン (endotoxic lipopolysaccharide; LPS)

E.coli LPS (0144, B4; Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) を生理食塩水で希釈し、1 mg/ml 溶液とした後、非動化 (60  $^{\circ}$ C 30 分) をおこない、さらに生理食塩水で 100 ng/ml まで希釈し、-50  $^{\circ}$ C で保存し、この 100 $\mu$ l (10 ng LPS) を関節炎惹起に使用した。

#### VI-4 関節炎の作成およびサイトカインの中和実験

全ての動物実験は熊本大学医学部の動物取扱い規定のガイドラインにしたがって実施した。雌性 New Zealand white rabbits (体重 2.2 ~ 2.5 kg; 井上実験動物) に pentobarbital sodium (30 mg/kg) を使用し静脈麻酔を行った。ウサギの後肢の膝関節に膝蓋靭帯上より 26 ゲージ針付き注射器を用い LPS 10 ng を関節内に投与した。関節内投与後、経時的にウサギを屠殺し、生理食塩水 1 ml を膝関節内に注入し関節内を洗い込み、これを滲出液とした。採取液は 1 分間遠心 (12000 回転/分) し、上清と細胞に分離後、浸潤細胞数を計測しその浸潤細胞の分類はギムザ染色、エラスターゼ染色

を行い細胞種別に計測した [63]。また、細胞の 1 部、関節上清液は $-80^{\circ}\text{C}$  で保存し、後に種々の測定に利用した。

また、ケモカインによる好中球浸潤の機構を比較するための実験として rIL-8 (10  $\mu\text{g}$ )、rGRO $\alpha$  (10  $\mu\text{g}$ ) を同様にウサギの後肢の膝関節内に注射した。滲出液中の浸潤好中球数を計測し、関節上清液は種々の測定に利用した。これらの *in vivo* 実験で関節腔内に投与した材料については、最終的に混在する LPS の量は 30 pg/site 以下、通常は 10 pg/site 以下となっており、この量の LPS はウサギの膝関節炎を全く起さないことを確認しているが、念のため LPS の生物作用をブロックする目的で polymyxin B の 10 U (ファイザー製薬、東京) とともに膝関節内に投与した。

炎症局所で産生される内因性 IL-8、GRO $\alpha$ 、TNF $\alpha$  の機能をブロックするために、それぞれ抗 IL-8 IgG 抗体 (10  $\mu\text{g}$ )、抗 GRO $\alpha$  mAb (10  $\mu\text{g}$ )、抗 TNF $\alpha$  mAb (10  $\mu\text{g}$ ) を使用し、関節内へ組換えケモカインと同時に投与した。

さらに、セリンプロテアーゼによる TNF $\alpha$  の不活化の検索のため、IL-8 (10  $\mu\text{g}$ ) と PMSF (1~30 mM) をウサギ膝関節に同時投与し、2 時間後の関節液を回収した。関節上清液は $-80^{\circ}\text{C}$  で保存し、後に TNF $\alpha$  の測定に利用した。

## VI-5 サイトカインの測定

検体とする関節上清液は、測定の障害となる被験液の粘性を低下させる目的で一般的に使用されているヒアルロニダーゼ処理 (組成表を参照) を実施した。すなわち、被験液の関節液上清に等量の 100U/ml hyaluronidase (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) を加え、サイトカイン測定の前 1 時間前に  $37^{\circ}\text{C}$  で前処理を行った [61,62]。

### VI-5-1 ウサギ GRO $\alpha$ の免疫測定

GRO $\alpha$  の定量は Barnard らの方法を応用した時間分割蛍光測定により実施した。1 次抗体としてコーティング・バッファー (組成表を参照) に溶解した抗 GRO $\alpha$  単クローン抗体 (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を用いて、プレートを被覆し、PBS-Tween (0.05%) により 5 回洗滌後、コーティング・バッファーに溶解した 1% BSA (組成表を参照) を用いて、 $4^{\circ}\text{C}$  で 1 夜ブロックする。このプレートを PBS-Tween により洗滌後、サンプル 100  $\mu\text{l}$  を加え、1 夜  $4^{\circ}\text{C}$  に静置する。サンプルを添加したプレートを PBS-Tween により洗滌後、Eu 標識抗ウサギ GRO $\alpha$  多クローン IgG 抗体を 2 次抗体として、その 100 ng/ml DELFIA assay buffer (Wallac Oy, Turku, Finland) を加え、室温 2 時間、静置後、PBS-Tween により洗滌し、DELFLIA enhancement solution (100  $\mu\text{l}$ , Wallac Oy) を加え、室温で 15 分静置する。この結果、遊離した  $\text{Eu}^{3+}$  は Eu-(2-NTA) 2

(TOPO) 2-3 micellar chelate を生じ、強い蛍光を発するので、この蛍光を DELFIA 装置 (Wallac Oy) を用いて時間分割法により測定し、既知量の rGRO $\alpha$  を内的コントロールとして比較測定する。なお、GRO $\alpha$  の免疫測定については 2 次抗体を biotin 標識し、ABC キットを用いて発色、定量する通常の ELISA 法も試みたが、現有の抗体を用いては、満足する測定感度が得られなかったため、時間分割蛍光法による免疫測定系を開発した。

#### VI-5-2 ウサギ IL-8 の免疫測定

IL-8 は、1 次抗体として抗 rrIL-8 ヤギ IgG を用い、2 次抗体として biotin 標識した抗 rrIL-8 ヤギ IgG を用いて通常の ELISA 法により、波長 492 nm でプレート・リーダー (ラボシステムズ社、東京) を用いて、少なくとも 4 点の濃度について測定し、既知量の各標準組換体を用いて作成した標準曲線と対比して定量した [59,61]。

#### VI-5-3 ウサギ TNF $\alpha$ の測定

TNF $\alpha$  は 上述の抗 TNF $\alpha$  抗体を biotin 化し、ABC 法を用いた ELISA 法による測定も試み、測定感度としては 30 pg/100  $\mu$ l まで検出可能な ELISA 系を開発できたが、生物活性と ELISA 法による抗原量との相関に問題点が認められたため、生物学的測定を L929 cell cytotoxic assay 法により実施した。活性からのペプチド量の算出は内的コントロールとして、同一実験において施行したウサギ TNF $\alpha$  組換体による標準曲線との対比によって求めた [64]。ELISA 法による測定と生物学的測定の間の不整合は、TNF $\alpha$  が 2, 3, 4 量体等の混合物であり、しかも多量体の示す生物活性 (L929 細胞の apoptosis 誘導活性) が単量体に比べ著しく高い事によると考えられた。

それぞれのサイトカインの検出限界値は GRO $\alpha$  が 3pg/ml、IL-8 と TNF $\alpha$  が 10pg/ml であった。それぞれの検出系においてその他のサイトカインとクロス反応はなかった。

#### VI-6 好中球枯渇ウサギの作成

Rosenshein らの方法に従って 0.75mg/Kg の vinblastine (Sigma) を実験開始の 72 時間前に静脈投与し好中球枯渇ウサギを作製 [64-66] し、実験をおこなった。Rosenshein ら [66] は vinblastine はマクロファージの数、および微小循環機能、その浸潤に影響を与えないと報告している。今回の我々の研究においても vinblastine 投与前後の末梢血中の白血球数は  $7.3 \pm 0.7 \times 10^6$ /ml (7 rabbits) であり、好中球/単核球比は 0.29 であったが、vinblastine 投与後では、白血球総数は  $3.4 \pm 0.8 \times 10^6$ /ml (7 rabbits) と減少しており、好中球/単核球は 0.034 となっており、好中球の残存は

0.11 ± 0.037 × 10<sup>6</sup>/ml となっていた。

好中球枯渴ウサギに LPS (10 ng), rIL-8 (10 µg), rGROα (10 µg) 投与後 6 時間の好中球浸潤数は、おのこの (0.4 ± 0.1 × 10<sup>6</sup>/joint n=8), (0.3 ± 0.1 × 10<sup>6</sup>/joint n=8), (0.3 ± 0.2 × 10<sup>6</sup>/joint n=8) であり、好中球枯渴ウサギではほとんど関節内に好中球浸潤は認められなかった。

#### VI-7 免疫染色 (IL-8, GROα, TNFα)

切除した滑膜組織は 4% paraformaldehyde で固定し、脱水後、パラフィン包埋し、薄切片を作成した。浸潤細胞の標本はウシ血清アルブミンで被覆したスライドガラス上に白血球を塗抹した。これらの標本の内因性ペルオキシダーゼはメタノールに溶解した 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で消去し、5% 正常ウサギ血清によるブロック、それに引き続き抗体の浸透を良好にする 0.05% trypsin 処理を加えた後、それぞれ 1 次抗体として、抗 rIL-8 ヤギ IgG (5 mg/ml)、抗 rGROα ヤギ IgG (5 mg/ml)、抗 rTNFα ヤギ IgG (5 mg/ml) と 4℃ で 1 夜インキュベートした。この標本を洗滌後、2 次抗体として、5 mg/ml ビオチン標識ウサギ抗ヤギ IgG 抗体 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) と室温 30 分インキュベートし、洗滌後、avidin-biotin-peroxidase complex (Vector) を滴下し、クロモゲンとして diaminobenzidine (和光純薬) を使用して発色した。対比染色にはヘマトキシリンを使用した。コントロールとしては免疫前ヤギ IgG を使用した。

#### VI-8 滑膜初代培養細胞

健康なウサギから膝滑膜組織を採取後、細切刻し、コラゲナーゼ処理液 (4 mg/ml; Worthington Biochemical, Freehold, NJ) 中で 37℃ - 30 分攪拌し単一細胞浮遊液を得た。この浮遊液を遠心し上清を捨て、細胞を洗滌、回収した。細胞は 24 穴、培養プレートに 0.25 × 10<sup>6</sup> 個/well 分注し、37℃ で 1 時間培養し、非付着細胞を除去した。付着細胞は 4~6 日培養し、均一に増殖した滑膜培養細胞 (1 × 10<sup>6</sup> 個/well) を実験に用いた。各濃度の rIL-8/rGROα を加えて刺激し培養 24 時間後、上清を回収した。24 時間後の培養上清は -30℃ で保存してその後の TNFα の測定に用いた。

また各濃度の rIL-8/rGROα を加えて刺激した培養 9 時間後の滑膜培養細胞からは下記の方法で mRNA を抽出し、TNFα mRNA に対する RT-PCR を施行した。なお、各培養細胞間で生存率に差がないことはトリパンブルー染色法にて確認した。

## VI-9 RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)

IL-8/GRO $\alpha$  を加えて刺激した培養 9 時間後の滑膜培養細胞から RNeasy Mini Kit (QIAGEN Co, Tokyo, Japan) を用いて mRNA を抽出した。そして、一本鎖 cDNA は Oligo(dT) primer, 5  $\times$  First strand Buffer, 0.1M DTT, 10mM dNTP mix (以上、Gibco-BRL 社、Rockville, MD) 及び Superscript<sup>TM</sup> II を使用して mRNA より作製した。

一本鎖 cDNA は Taq ポリメラーゼ (TaKaRa 社、東京) と特異的なプライマーの存在下で PCR 法にて増幅した。特異的なプライマーとしてはウサギの TNF $\alpha$  とグリセルアルデヒド -3- リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) の cDNA 構造から選択した下記のものを用いた。

TNF $\alpha$  : sense primer; 5'-TCAGCTTCTCGGGCCCTGAGTGAC-3'

antisense primer; 5'-TCACAGGGCAATGATCCCAAAGTAGAC-3'

GAPDH: sense primer; 5'-GATCCATTCATTGACCTCC-3'

antisense primer; 5'-GATCTCGCTCCTGGAAGATG-3'

PCR 反応の条件は以下のようにし、35 サイクルとした。

denature 94 $^{\circ}$ C, 1 分

annealing 55 $^{\circ}$ C, 1 分 (GAPDH の annealing は 55 $^{\circ}$ C)

elongation 72 $^{\circ}$ C, 2 分

PCR 産物は臭化エチジウム入り 2% アガロース寒天にて電気泳動し、UV transilluminator (ULTRA-LUM 社、Carson, CA) にて観察し、写真とした。

おのおのの写真は、スキャナーで取り込まれ NIH image でバンドの密度を測定し、GAPDH の密度と比較した。この結果は半定量の分析結果といえる。

Relative intensity ratio = PCR product/GAPDH band density

## VI-10 ウサギ rTNF $\alpha$ の関節液による不活化

ウサギ rTNF $\alpha$  (1  $\mu$ l of 100 ng/ml) を rIL-8 投与後 2 時間の関節液 (100  $\mu$ l) に加え 37 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させた。また、セリンプロテアーゼの影響を調べるため、そのインヒビターである PMSF (0.1 mM) をウサギ TNF $\alpha$  と関節液に同時に加え同様に反応させた (最終濃度; rTNF $\alpha$ : 1 ng/ml., PMSF: 0.1 mM)。反応後の上清は -30 $^{\circ}$ C で保存してその後の TNF $\alpha$  の測定に用いた。

## VI-11 試薬の組成表

なお、特記しない限り、すべての試薬溶液は 0.45  $\mu$ m ポアサイズフィルターにより無菌化して用いた。

### {ウサギ rGRO $\alpha$ の産生の試薬}

2 $\times$  BBS

50 mM BES (N,N - bis [2 - hydroxyethyl] - 2 - aminoeth - aesulfonic acid)

280 mM NaCl

1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

以上 3 つの試薬を混ぜ、1N NaOH を用いて室温で正確に PH 6.95 とする

### {ウサギ rGRO $\alpha$ の作成と精製の試薬}

medium 100ml の組成

|  |   |
|--|---|
| Iscove's modified Dulbecco's medium (Sigma : I - 7633) | 89 ml   |
| FCS  | 10 ml   |
| penicilin  | 0.5ml (2 $\times$ 10 <sup>3</sup> U/ml)       |
| Streptomycin   | 0.5ml (2 $\times$ 10 <sup>3</sup> $\mu$ g/ml) |
| 2 ME ( $\times$ 1/140)                                 | 20 $\mu$ l                                    |
| MC - 210 (大日本製薬)                                       | 200 $\mu$ l                                   |

Ca<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>free PBS 1000ml の組成

|   |        |
|---|--------|
| NaCl  | 8.0 g  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O | 2.9 g  |
| KCl   | 0.2 g  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | 0.2 g  |
| NaN <sub>3</sub>                                      | 0.2 g  |
| DW で  | 1000ml |

### {関節液のヒアルロニダーゼ処理の試薬}

ヒアルロニダーゼ処理液

0.02 M Sodium Phosphate + 0.45% NaCl + 0.01% BSA (PH 7.0)

0.02 M Sodium Phosphate (PH 7.0)

0.02 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O + 0.45% NaCl

0.02 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O + 0.45% NaCl

100 U/ml Hyaluronidase

Hyaluronidase (sigma) をヒアルロニダーゼ処理液で 100 U/ml にして使用。

{時間分割蛍光測定法の試薬}

coating buffer (PH 9.6)

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 1.59 g |
| NaHCO <sub>3</sub>              | 2.93 g |
| NaN <sub>3</sub>                | 0.2 g  |
| DW で 1 L                        |        |

ブロッキング buffer (1% BSA in coating buffer)

|                |      |
|----------------|------|
| coating buffer | 1 L  |
| BSA (1%)       | 10 g |

洗浄用 buffer····Ca<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>freePBS + Tween 20

|   |        |
|---|--------|
| NaCl  | 8 g    |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O | 2.9 g  |
| KCl   | 0.2 g  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | 0.2 g  |
| DW で  | 1 L    |
| Tween 20  | 0.5 ml |

{ウサギ 滑膜培養細胞の培養液}

medium 100ml の組成

|  |                                 |
|--|---------------------------------|
| Iscove's modified Dulbecco's medium (Sigma : I - 7633) | 88 ml                           |
| FCS  | 10 ml                           |
| penicilin  | 0.5ml (2×10 <sup>3</sup> U/ml)  |
| Streptomycin   | 0.5ml (2×10 <sup>3</sup> µg/ml) |
| L-Glutamine  | 1ml (30mg/ml)                   |

VI-12 統計解析

統計解析は two-tailed unpaired t-test によっておこなった。p < 0.05 以下を統計的有意差を認めると評価した。全ての数値は平均±標準偏差で表示した。

## VII 実験結果

### VII-1 ウサギ LPS 関節炎モデルにおける白血球浸潤動態

LPS 10 ng をウサギ膝関節内に投与し、その後浸潤細胞を経時的に測定した。LPS 1 回投与による関節炎は急性炎症の経過をとり LPS 投与後 2 時間頃より炎症細胞の浸潤が見られ 9 時間でピークとなり 48 以降は炎症細胞はほぼ関節腔より消失する。その炎症細胞は 12 時間までは好中球 ( $25.9 \pm 1.4 \times 10^6/\text{joint}$  n=10) が優位で、単核球は徐々にその割合を増加させ 12 時間ではピーク ( $2.7 \pm 0.3 \times 10^6/\text{joint}$  n=12) をつくり、その後 24 時間では単核球 ( $2.3 \pm 0.2 \times 10^6/\text{joint}$  n=10) が優位な像を示す (図 1)。

### VII-2 LPS 関節炎における IL-8, GRO $\alpha$ の産生動態

LPS 10ng 関節内投与後、関節上清液中の IL-8, GRO $\alpha$  の量を経時的に測定した。関節液中の IL-8 は、LPS 投与後 1 時間より検出され ( $2.2 \pm 0.3$  ng/joint n=8)、2 時間でピーク ( $3.4 \pm 0.5$  ng/joint n=12) となる。その後は急速に減少し、4 時間以降はなだらかな減少を示した (図 2)。また、関節液中の GRO $\alpha$  は、LPS 投与後 1 時間より検出され ( $0.2 \pm 0.1$  ng/joint n=8)、2 時間でピーク ( $4.8 \pm 0.8$  ng/joint n=12) となる。その後は急速に減少するものの、4 時間以降再度増加して 9 時間で第 2 のピーク ( $1.9 \pm 0.3$  ng/joint n=8) をもちそれ以降はなだらかな減少となった (図 2)。IL-8 は 1 相性、GRO $\alpha$  は 2 相性の産生動態を示し、ピーク時の GRO $\alpha$  の産生量は IL-8 の産生量よりわずかに多い程度であった。また、免疫染色の結果ならびに好中球枯渇ウサギを用いた実験で、これらのケモカインの産生量が低下しないことから、LPS 投与後早期の IL-8/GRO $\alpha$  の産生細胞は滑膜表層細胞および血管内皮細胞などの常在性の細胞であることが判明した。



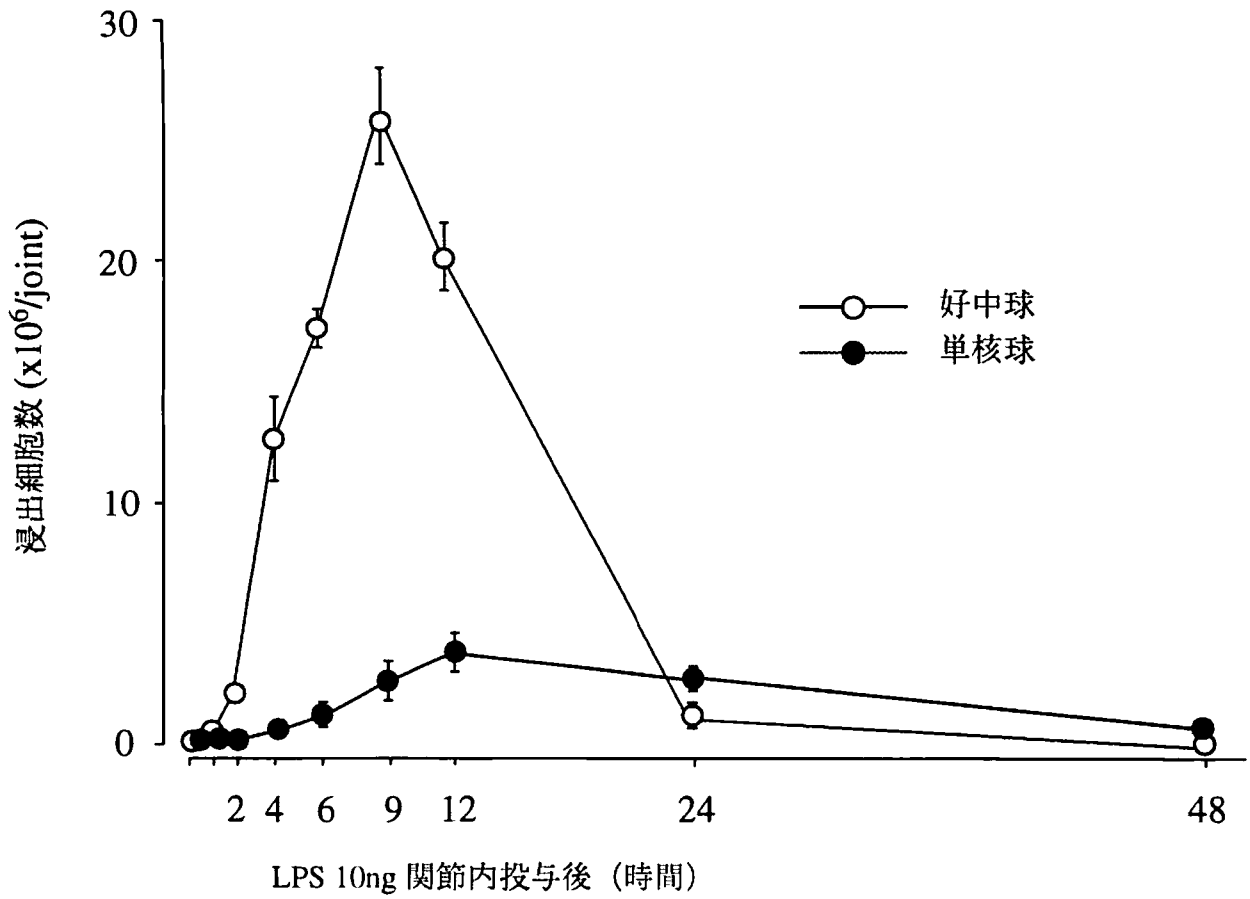


図1、ウサギLPS関節炎における白血球浸潤動態。  
 ウサギ膝関節にLPS 10ng投与後、関節内浸出細胞を経時的に計測。  
 各値は8~12膝の平均±SE

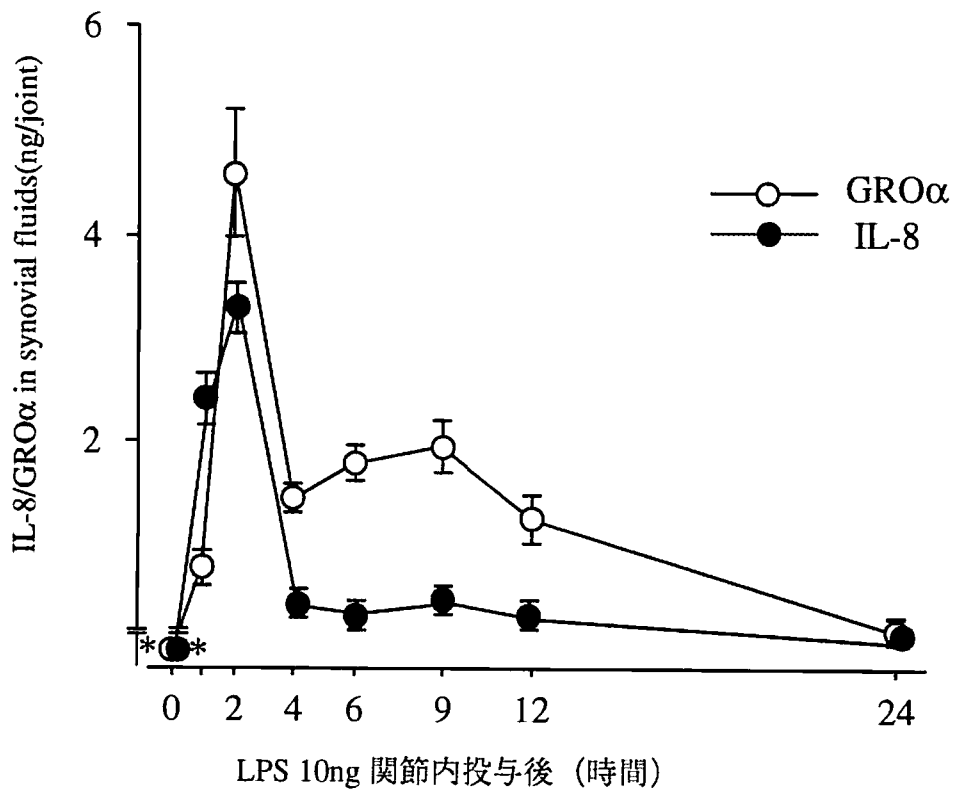


図 2、LPS 関節炎モデルにおける IL-8, GROα の産生動態。  
 ウサギ膝関節に LPS 10ng 投与後各時間の関節上清中に産生される IL-8, GROα 量を測定。  
 各値は 8~20 膝の平均±SE \*：検出限界以下

### VII-3 ケモカイン産生における IL-8, GRO $\alpha$ のブロック効果

LPS 関節炎において IL-8, GRO $\alpha$  の機能の特異抗体を用いてそれぞれブロックするとおのおのの産生量にどのような影響があるか検索した。膝関節液中の IL-8 のピーク時の産生量は、抗 GRO $\alpha$  抗体を LPS と同時投与しても LPS 単独の時と変化がなかった。GRO $\alpha$  の産生量も抗 IL-8 抗体を LPS と同時投与しても 2 時間, 9 時間ともに LPS 単独の時と変化がなかった (図 3)。これらの実験成績は IL-8, GRO $\alpha$  の産生はお互いに独立していることを示しており、一方のケモカインの機能をブロックしてもそれぞれの産生は影響をうけないということがわかった。

### VII-4 白血球浸潤における IL-8, GRO $\alpha$ のブロック効果

IL-8, GRO $\alpha$  の機能をそれぞれブロックすると炎症細胞浸潤はどのような影響を受けるか調べた。抗 IL-8 抗体 (10  $\mu$ g) を用いると、炎症 4 時間以後 12 時間まで 35% ~ 50% の細胞浸潤の抑制が認められ、抗 GRO $\alpha$  抗体 (10  $\mu$ g) でも炎症 4 時間以後 12 時間まで 30% ~ 55% の細胞浸潤の抑制が認められた。これら両方のケモカインを同時にブロックすると細胞浸潤の抑制は、60% ~ 65% に達した (図 4)。しかし、これ以上の高度の抑制は抗体の量を増加しても認められなかった。

### VII-5 小括

これらの結果をまとめると

1. LPS 関節炎による in vivo での IL-8, GRO $\alpha$  の産生は、非常に早期から始まっており、お互いに独立している。その早期の産生細胞は、滑膜表層細胞などの常在性の細胞である。
2. LPS 関節炎において、抗 GRO $\alpha$  抗体、抗 IL-8 抗体単独投与で 35% ~ 50% の細胞浸潤の抑制が認められ、これら両者の同時投与で 60% ~ 65% まで増強した。
3. IL-8, GRO $\alpha$  はともに、初期の好中球浸潤に深く関与している。

以上の事が判明した (図 5)。

そこで我々は、この構造的にも作用的にも非常に類似した 2 つの CXC ケモカインである IL-8, GRO $\alpha$  に何らかの機能的な差異はあるのだろうかと考え次の実験へとすすんだ。

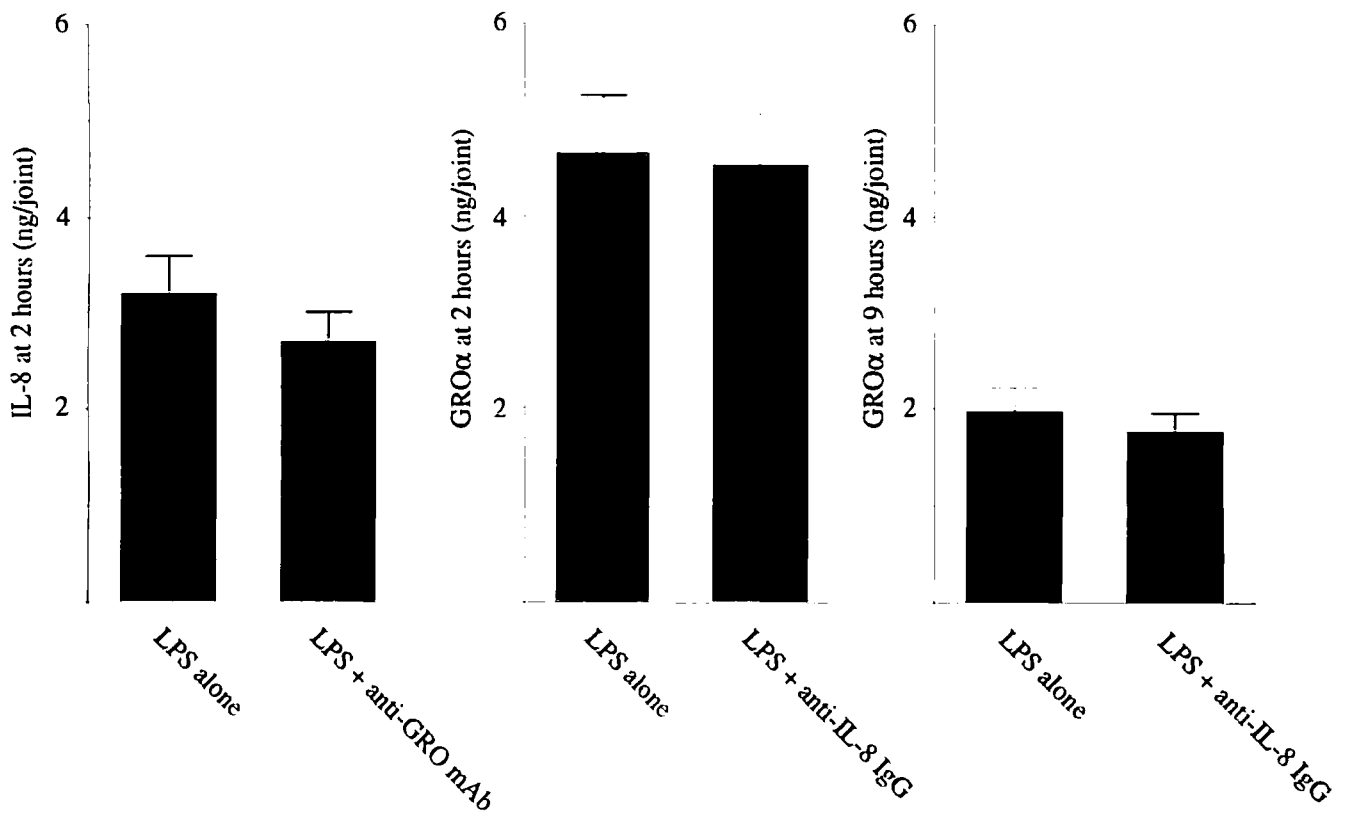


図3、ケモカイン産生における IL-8, GROα のブロック効果。  
 LPS+ 抗 GROα 抗体 / 抗 IL-8 抗体投与後、関節上清中に産生される IL-8/GROα 量を測定。  
 各値は 8~20 膝の平均 ± SE

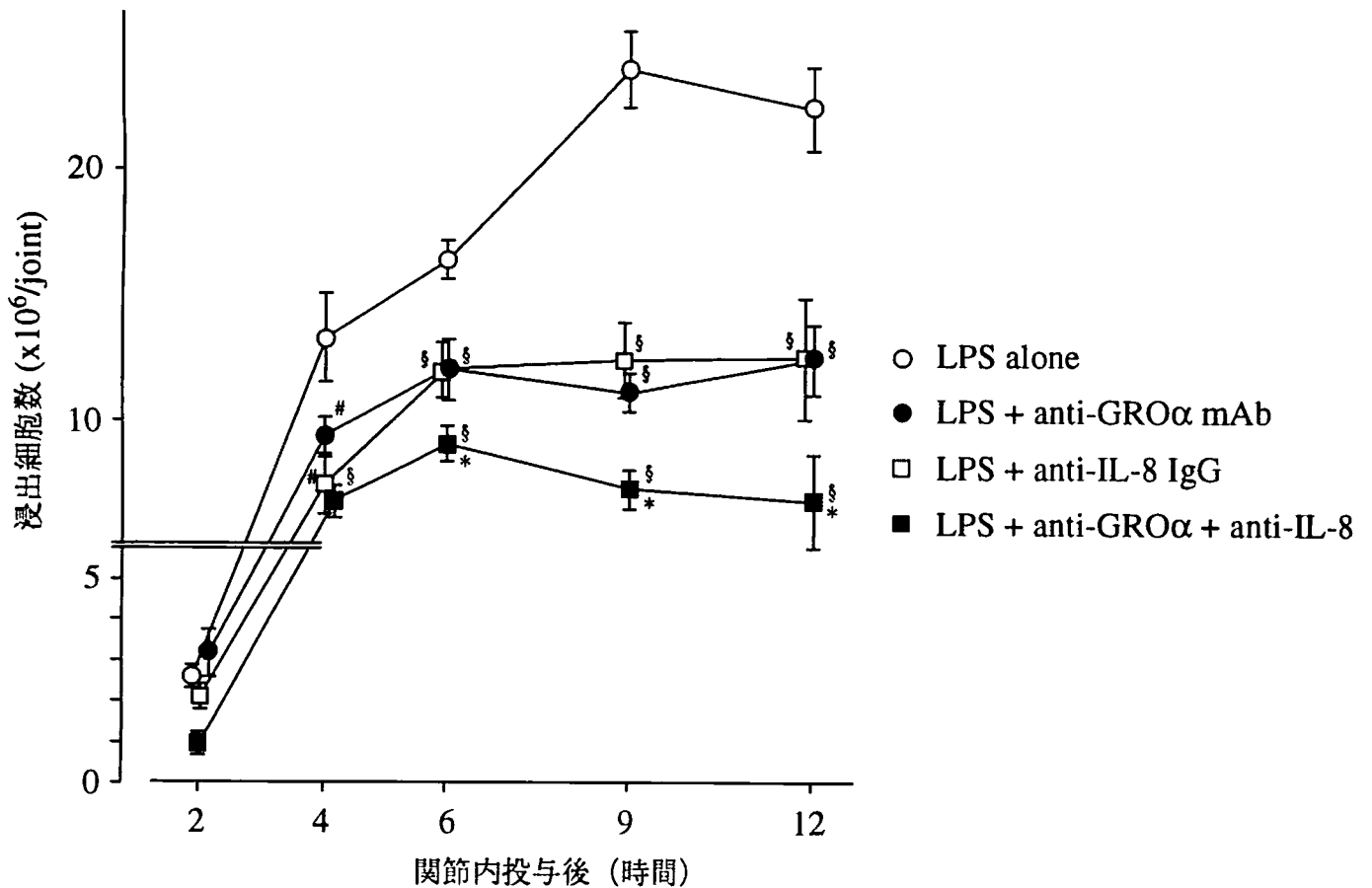


図4、白血球浸潤における IL-8, GRO $\alpha$  のブロック効果。  
 LPS+ 抗 GRO $\alpha$  抗体 / 抗 IL-8 抗体投与後、各時間の関節内浸出細胞数を計測。  
 各値は 8~12 膝の平均 $\pm$  SE  
 #: p<0.05, §: p<0.01 (LPS alone と比較)  
 \*: p<0.05 (LPS +anti-GRO $\alpha$ , LPS +anti-IL-8 と比較)

## 小括 (図5)

1. LPS関節炎による *in vivo* での IL-8, GRO $\alpha$  の産生は、非常に早期から始まっておりお互いに独立している。  
その早期の産生細胞は、滑膜表層細胞などの常在性の細胞である。
2. LPS関節炎において、anti-GRO $\alpha$  mAb, anti-IL-8 IgG 単独投与で 35~50%の細胞浸潤の抑制、これら両方の投与で60~65%の抑制が認められた。
3. IL-8, GRO $\alpha$ は、初期の好中球浸潤に深く関与している。



これら CXC chemokine に何らかの機能的な差異があるのか？

## VII-6 rIL-8, rGRO $\alpha$ 関節内投与による炎症細胞浸潤

ウサギ膝関節内に同種 rIL-8, rGRO $\alpha$  をそれぞれ 10 $\mu$ g 投与し、その後の細胞浸潤について検討し、おのおのの生物作用を比較した。

rIL-8 投与後、好中球は 6 時間にピークを示す 1 相性の細胞浸潤を認め、弱い単核球浸潤が 24 時間をピークとして認めた。また rGRO $\alpha$  では投与後、好中球は 6 時間と 12 時間にピークのある 2 相性の細胞浸潤を認め、弱い単核球は 24 時間にピークを認めた。これらの誘導される浸潤細胞数は rGRO $\alpha$  に比べ rIL-8 投与後のほうがやや多かった (図 6)。以上によりウサギ膝関節内に同種 IL-8, GRO $\alpha$  をそれぞれ投与すると一過性の細胞浸潤を再現でき、その浸潤細胞は好中球が主体であり 6 時間以降は弱いながらも単核球も浸出してくるといえる。

## VII-7 rIL-8/rGRO $\alpha$ 関節内投与後の内因性 GRO $\alpha$ /IL-8 産生動態

rIL-8/rGRO $\alpha$  関節内投与後の内因性 GRO $\alpha$ /IL-8 の産生動態を示す (図 7)。すなわち、膝関節液中に誘導された内因性 GRO $\alpha$ , IL-8 の産生量を定量したグラフである。rIL-8 投与後の内因性 GRO $\alpha$  は 2 時間と 12 時間にピークをもつ 2 相性の産生動態を認めた。また rGRO $\alpha$  投与後の内因性 IL-8 も 2 時間と 12 時間にピークをもつ 2 相性の産生動態を認めた。

この結果により rIL-8 は内因性 GRO $\alpha$  の産生を誘導し、逆に rGRO $\alpha$  も内因性 IL-8 の産生を誘導していることがわかった。

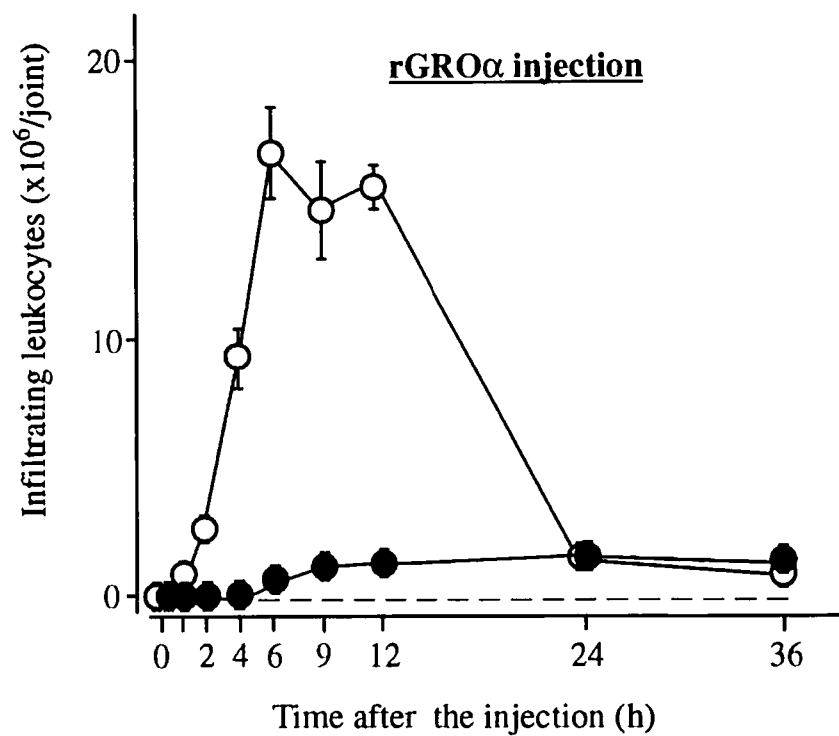
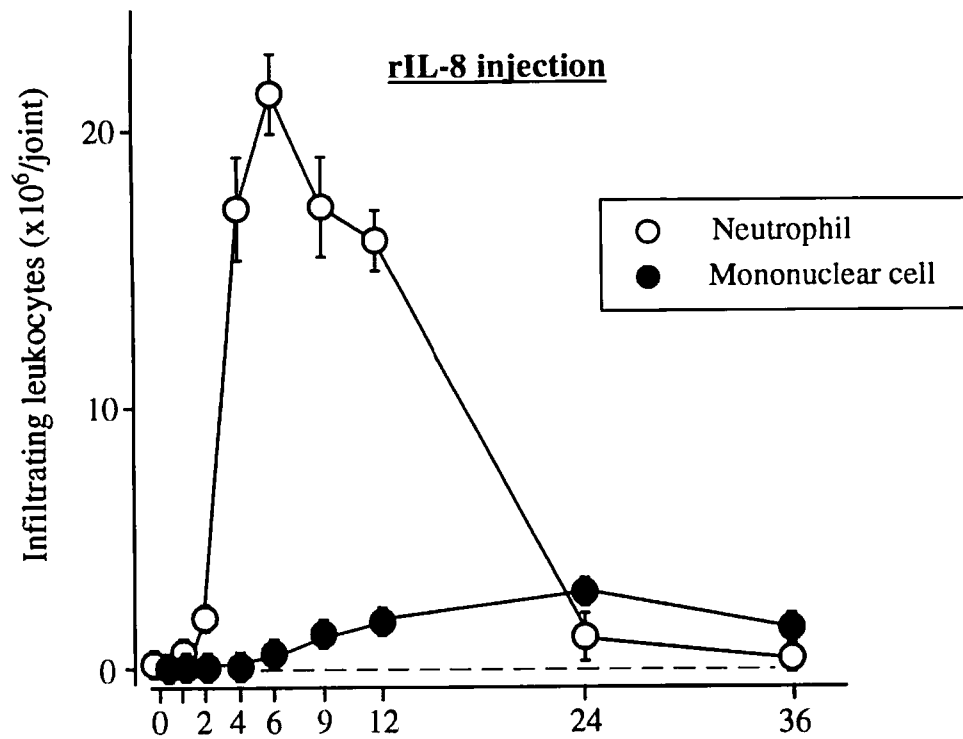


図 6、rIL-8/rGRO $\alpha$  関節内投与による炎症細胞浸潤動態。  
 ウサギ膝関節に rIL-8/rGRO $\alpha$  (10  $\mu$ g) 投与後、関節内浸出細胞を経時的に計測。  
 各値は 8~12 膝の平均  $\pm$  SE



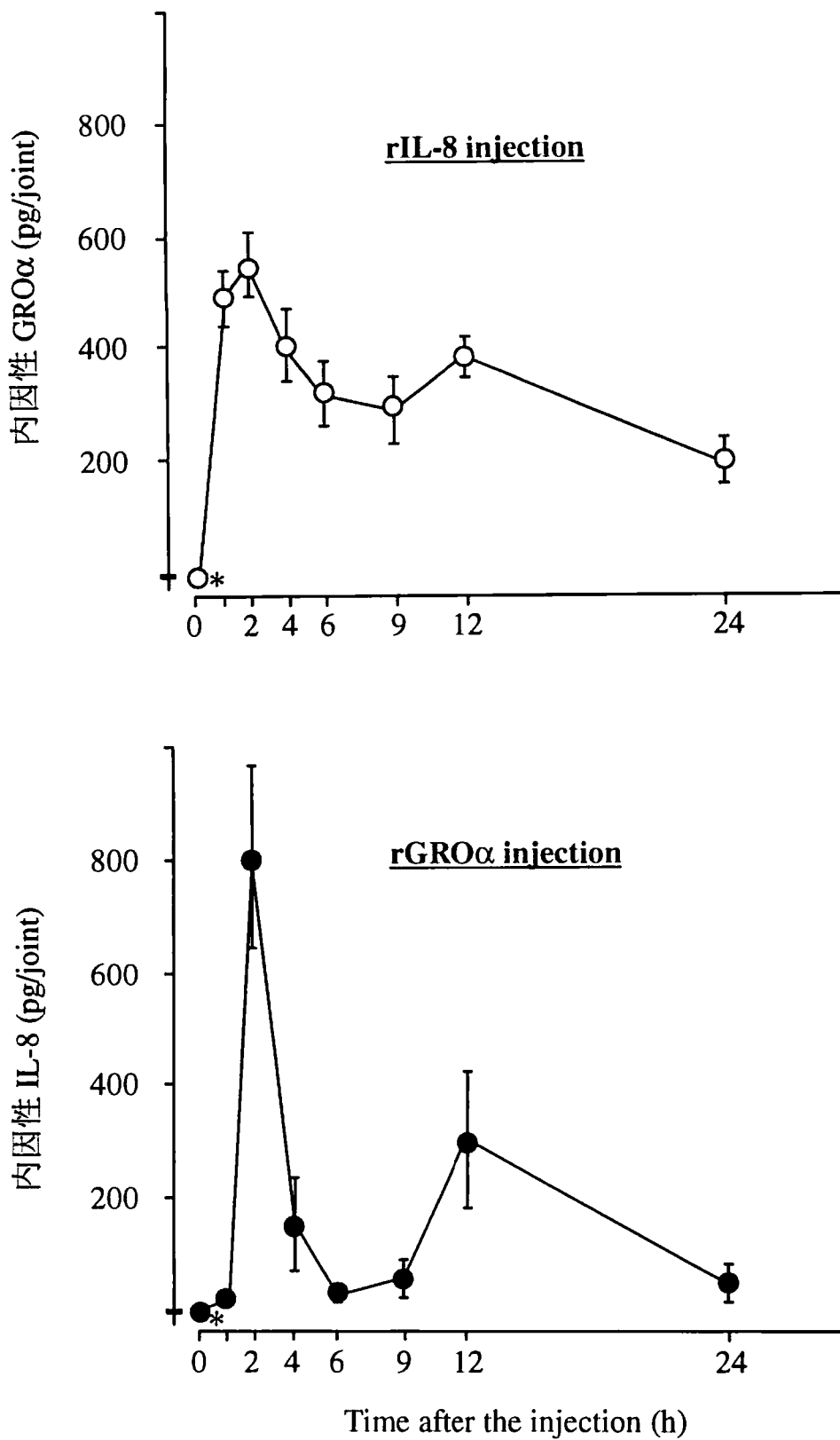


図7、rIL-8/rGROα 関節内投与後の内因性 GROα/IL-8 の産生動態。  
 ウサギ膝関節内に rIL-8/rGROα 投与後、関節上清中に産生される内因性 GROα/IL-8 量を測定。  
 各値は 8~20 膝の平均± SE \*：検出限界以下

## VII-8 内因性 GRO $\alpha$ /IL-8 の産生細胞の検討

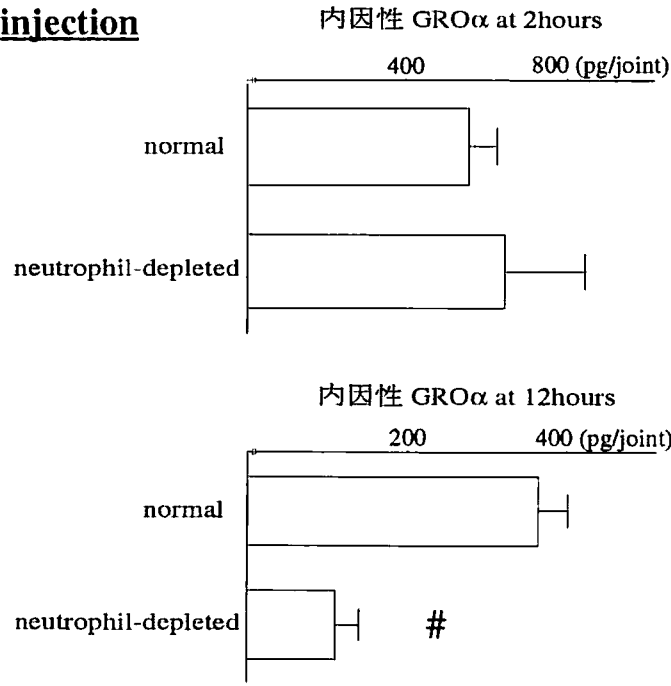
### VII-8-1 好中球枯渇ウサギを用いた検討

関節液中に検出される内因性 GRO $\alpha$ /IL-8 のうち、浸潤白血球に由来する量を知るため好中球枯渇ウサギにおける関節液中の内因性 GRO $\alpha$ /IL-8 量を測定した。正常ウサギ、好中球枯渇ウサギに同種 rIL-8/rGRO $\alpha$  をそれぞれ 10 $\mu$ g 投与した。投与後 2 時間の時点では正常ウサギと好中球枯渇ウサギの間で rIL-8 投与後の内因性 GRO $\alpha$ 、rGRO $\alpha$  投与後の内因性 IL-8 の産生量に差は認めなかった。しかし 12 時間の時点では好中球枯渇ウサギで内因性 GRO $\alpha$ /IL-8 の産生量が有意に低下していた (図 8)。これにより早期の内因性 GRO $\alpha$ /IL-8 の産生は、浸出細胞でなく他の常在性の細胞よること、12 時間の時点では浸出好中球による内因性ケモカインの産生が主体となっているということがわかった。

### VII-8-2 免疫染色による検討

早期の内因性 GRO $\alpha$ /IL-8 産生細胞を組織学的に同定するため、同種 rIL-8/rGRO $\alpha$  をそれぞれ 10 $\mu$ g 投与した膝関節組織について、生理食塩水注射組織をコントロールとして免疫染色法による検索をおこなった。滑膜組織は関節液中の内因性 GRO $\alpha$ /IL-8 がピーク (2 時間) となる前、rIL-8/rGRO $\alpha$  関節投与 1 時間で採取した組織を用いた。その結果、GRO $\alpha$ /IL-8 ともに免疫染色法によって滑膜表層細胞が陽性に染色された (図 9)。すなわち、同種 rIL-8/rGRO $\alpha$  投与によってウサギ膝関節腔内には内因性 GRO $\alpha$ /IL-8 が産生されていることが確認され、その早期の主な産生細胞は滑膜表層細胞であることが判明した。

## rIL-8 injection



## rGRO $\alpha$ injection

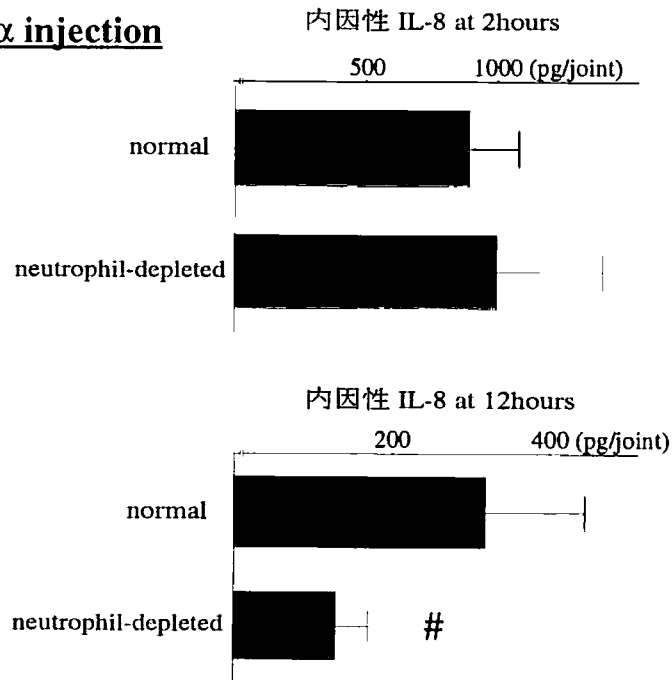


図 8、正常ウサギ及び好中球枯渇ウサギにおける内因性 GRO $\alpha$ /IL-8 の産生。  
好中球枯渇ウサギは nitrogen mustard (1.8mg/Kg) の静脈投与で作成した。  
それぞれの産生のピクである 1 相目 (2 時間) と 2 相目 (12 時間) で比較検討。  
各値は 8~20 膝の平均  $\pm$  SE, #:  $p < 0.05$  (正常ウサギと比較)

**A**

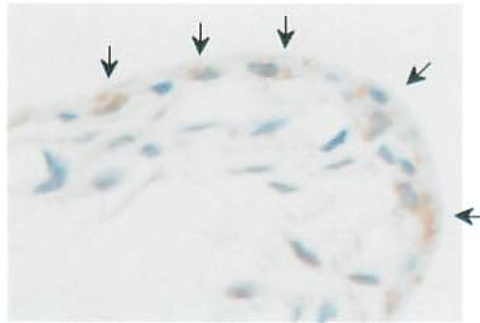


図 9 A、rIL-8 投与後のウサギ膝滑膜組織の GRO $\alpha$  の免疫染色。  
rIL-8 投与後、GRO $\alpha$  は 1 時間の時点で滑膜表層細胞が陽性である。

**B**

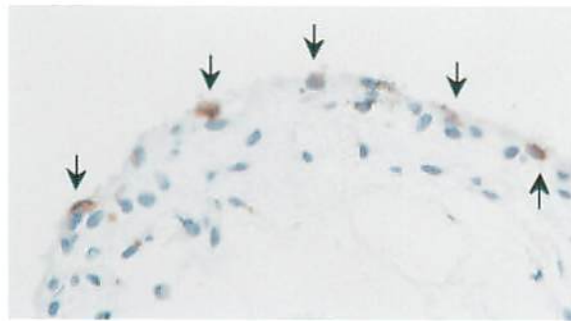


図 9 B、rGRO $\alpha$  投与後のウサギ膝滑膜組織の IL-8 の免疫染色。  
rGRO $\alpha$  投与後、IL-8 は 1 時間の時点で滑膜表層細胞が陽性である。

## VII-9 rIL-8/rGRO $\alpha$ 投与後の好中球浸潤における

### 内因性 GRO $\alpha$ /IL-8 のブロック効果

次にこれら rIL-8/rGRO $\alpha$  によって誘導される内因性 GRO $\alpha$ /IL-8 の細胞浸潤への関与を知るために、それぞれ抗 IL-8/GRO $\alpha$  抗体を用いてコントロール投与時と比較した。図 10 に示すように、好中球浸潤は rIL-8 投与群では内因性 GRO $\alpha$  をブロックしても変化が認められなかった。一方、rGRO $\alpha$  投与群では内因性 IL-8 をブロックすると 9 時間、12 時間、24 時間で浸出好中球の抑制が認められ、好中球浸潤の動態は 6 時間をピークとする 1 相性となった。

つまり rIL-8 投与群では内因性 GRO $\alpha$  の産生が誘導されるものの好中球浸潤の増強への関与は認められなかった。一方、rGRO $\alpha$  投与群では内因性 IL-8 の産生が誘導され 2 相目の好中球浸潤の誘導に関与していることが判明した。

## VII-10 rIL-8/rGRO $\alpha$ 投与後の好中球浸潤における

### 内因性 TNF $\alpha$ のブロック効果

TNF $\alpha$  は代表的な炎症性サイトカインであり、炎症の早期から産生されること、さまざまな刺激で容易にその産生が高まること、rIL-8, rGRO $\alpha$  投与という人工的条件下であることから内因性 TNF $\alpha$  の関与を考慮する必要がある。そこで、rIL-8 あるいは rGRO $\alpha$  とともに抗 TNF $\alpha$  抗体を同時投与した。すると、rIL-8 による好中球浸潤は抗 TNF $\alpha$  抗体でまったく抑制されなかったのに対し、rGRO $\alpha$  による好中球浸潤は抗 TNF $\alpha$  抗体で 4 時間以降有意に抑制された (図 11)。以上により rIL-8 投与群では内因性 TNF $\alpha$  は、細胞浸潤の増強には関与していない。一方 rGRO $\alpha$  投与群では内因性 TNF $\alpha$  は細胞浸潤の誘導に大きく関与している事がわかった。

## VII-11 rIL-8/rGRO $\alpha$ 投与後の内因性 TNF $\alpha$ の産生動態

rGRO $\alpha$ /rIL-8 関節内投与後の内因性 TNF $\alpha$  の産生動態を示す。図 12 は、膝関節液中の TNF $\alpha$  の生物活性を定量した結果を示している。rIL-8 投与ではどの時間帯においても内因性 TNF $\alpha$  が検出されないのに対して、rGRO $\alpha$  投与後の内因性 TNF $\alpha$  は 2 時間にピークをもつ 1 相性の産生動態を認めた。よって rIL-8 投与群では内因性 TNF $\alpha$  の生物活性は検出されず、細胞浸潤の増強にも関与していない。一方、rGRO $\alpha$  投与群では内因性 TNF $\alpha$  が誘導され細胞浸潤の増強に大きく関与している事が判明した。

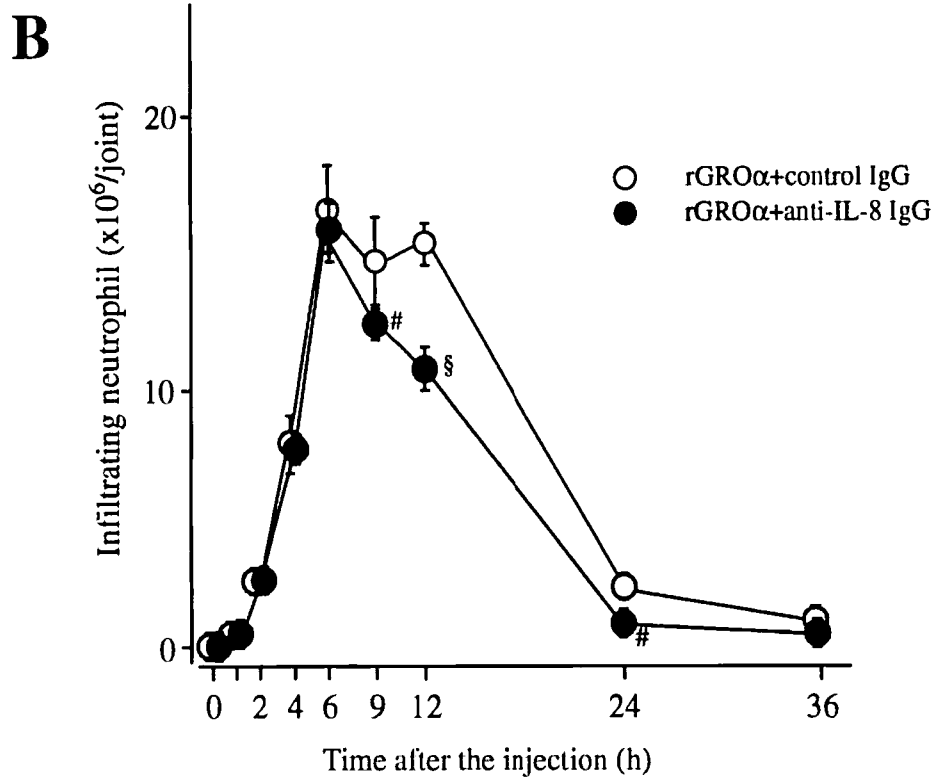
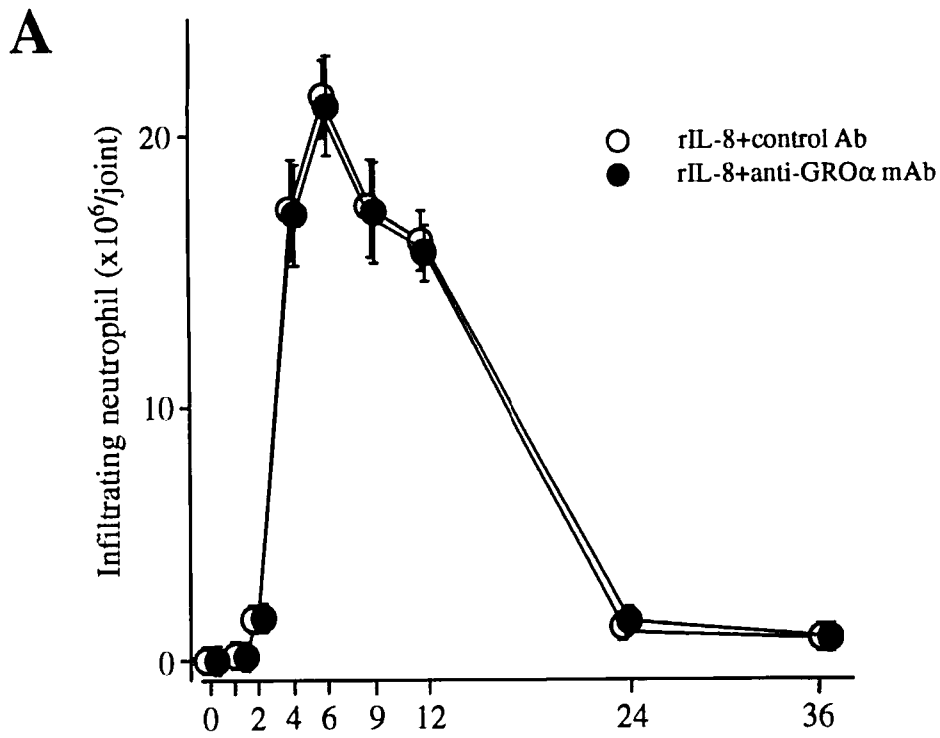


図 10、rIL-8/rGRO $\alpha$  投与後の好中球浸潤における内因性 GRO $\alpha$ /IL-8 のブロック効果。rIL-8(A)+ 抗 GRO $\alpha$  抗体, rGRO $\alpha$ (B)+ 抗 IL-8 抗体投与後、各時間の浸出好中球数を計測。各値は 8~12 膝の平均  $\pm$  SE, #:  $p < 0.05$ , §:  $p < 0.01$  (rGRO $\alpha$  + control と比較)

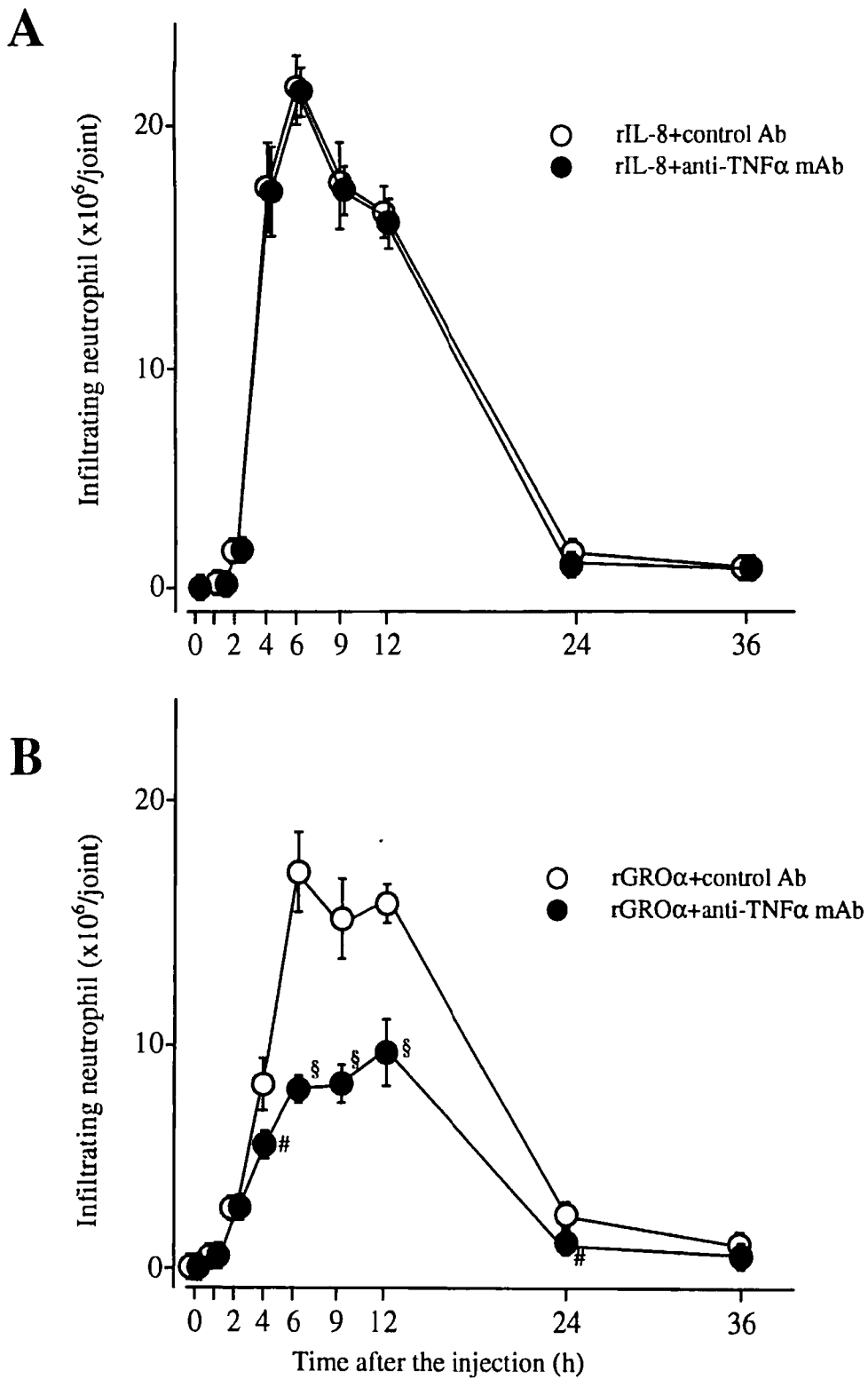


図 11、rIL-8/rGRO $\alpha$  投与後の好中球浸潤における内因性 TNF $\alpha$  のブロック効果。  
 rIL-8(A)+ 抗 TNF $\alpha$  抗体, rGRO $\alpha$ (B)+ 抗 TNF $\alpha$  抗体投与後、各時間の浸出好中球数を計測。  
 各値は 8~12 膝の平均  $\pm$  SE, #:  $p < 0.05$ , §:  $p < 0.01$  (rGRO $\alpha$  + control と比較)

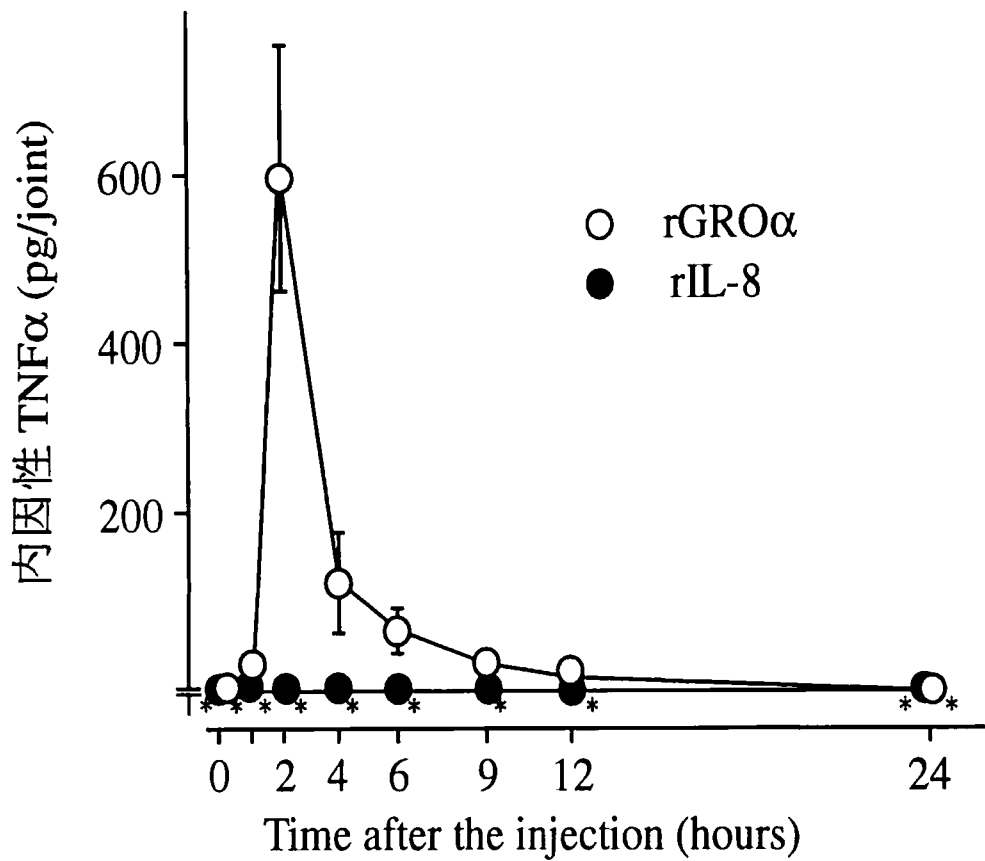


図 12、rIL-8/rGRO $\alpha$  関節内投与後の内因性 TNF $\alpha$  の産生動態。  
 ウサギ膝関節に rIL-8/rGRO $\alpha$ (10  $\mu$ g) 投与後、関節上清中に誘導される内因性 TNF $\alpha$  活性を測定。  
 各値は 8~20 膝の平均  $\pm$  SE \* : 検出限界以下



## VII-12 rGRO $\alpha$ 関節内投与後の内因性 IL-8, 内因性 TNF $\alpha$ の相互作用

### VII-12-1 内因性 IL-8 への抗 TNF $\alpha$ 抗体の影響

rGRO $\alpha$  投与後に誘導される内因性 IL-8 への内因性 TNF $\alpha$  の関与を調べるため、rGRO $\alpha$ (10 $\mu$ g) と抗 TNF $\alpha$  抗体 (10 $\mu$ g) を同時投与し、内因性 IL-8 の産生量をその産生のピークである 2 時間において比較した (図 13 A)。結果、内因性 IL-8 の産生量は、コントロール群と有意差がなかった。

### VII-12-2 内因性 TNF $\alpha$ への抗 IL-8 抗体の影響

逆に rGRO $\alpha$  投与後に誘導される内因性 TNF $\alpha$  への内因性 IL-8 の関与を調べるため、rGRO $\alpha$ (10 $\mu$ g) と抗 IL-8 抗体 (10 $\mu$ g) を同時投与し、内因性 TNF $\alpha$  の産生量をそのピークである 2 時間において比較した (図 13 B)。結果は同じく、内因性 TNF $\alpha$  の産生量は、コントロール群と有意差がなかった。以上により、rGRO $\alpha$  投与後早期に誘導される内因性 IL-8 と内因性 TNF $\alpha$  はお互いに独立して誘導されていることが判明した。

## VII-13 rIL-8/rGRO $\alpha$ 投与後の好中球浸潤における抑制効果の増強

それぞれのケモカインに対する特異抗体に加え抗 TNF $\alpha$  抗体を同時投与し、好中球浸潤への抑制効果の増強を調べた。すると、図 14 に示すように rIL-8 による好中球浸潤は抗 GRO $\alpha$  抗体+抗 TNF $\alpha$  抗体でまったく抑制されなかったものの、rGRO $\alpha$  による好中球浸潤は抗 IL-8 抗体+抗 TNF $\alpha$  抗体で 4 時間以降有意に抑制され、その効果は抗 TNF $\alpha$  抗体単独に比べ増強していた。また 2 つのプロッカーでの抑制効果は、投与後 6 時間では抗 TNF $\alpha$  抗体単独と同等で投与後 12 時間では抗 TNF $\alpha$  抗体単独より有意に増強しており、この効果は相加的であることがわかった。この事実は、rGRO $\alpha$  投与後の早期の内因性 IL-8 産生と内因性 TNF $\alpha$  産生がおのこの独立して誘導されていた結果 (図 13) と整合しており、rGRO $\alpha$  の作用は、その独自の作用に加え内因性 TNF $\alpha$  および内因性 IL-8 の産生誘導を介しても好中球浸潤に寄与していることを示している。

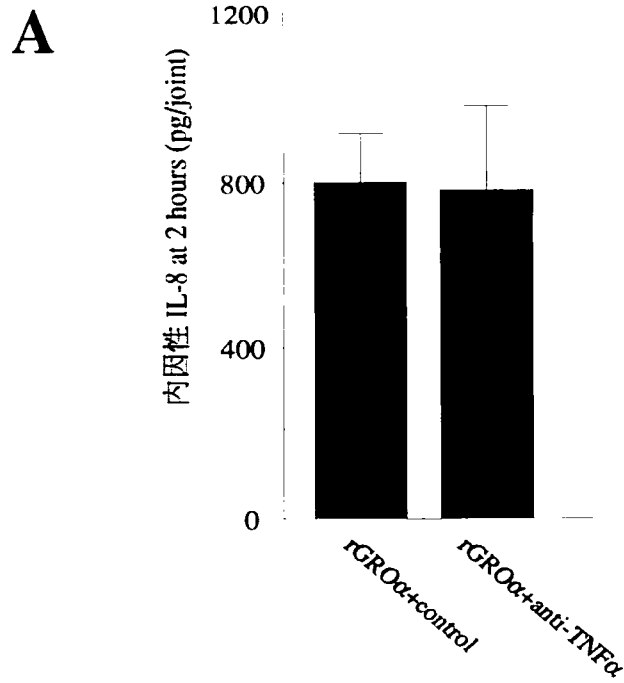


図 13 A、rGROα 投与後に誘導される内因性 IL-8 への抗 TNFα 抗体の影響。  
膝関節に rGROα と抗 TNFα 抗体を同時投与後、関節液中に産生される内因性 IL-8 量を測定。  
各値は 8~20 膝の平均± SE

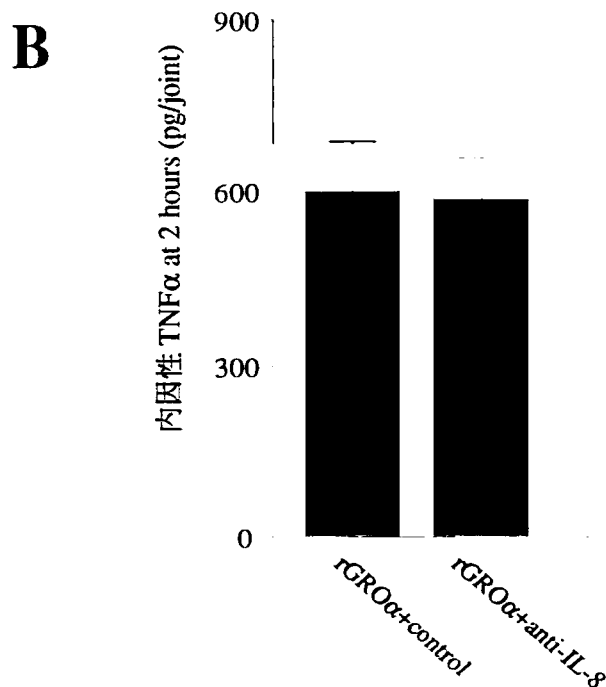


図 13 B、rGROα 投与後に誘導される内因性 TNFα への抗 IL-8 抗体の影響。  
膝関節に rGROα と抗 IL-8 抗体を同時投与後、関節液中に産生される内因性 TNFα 量を測定。  
各値は 8~20 膝の平均± SE

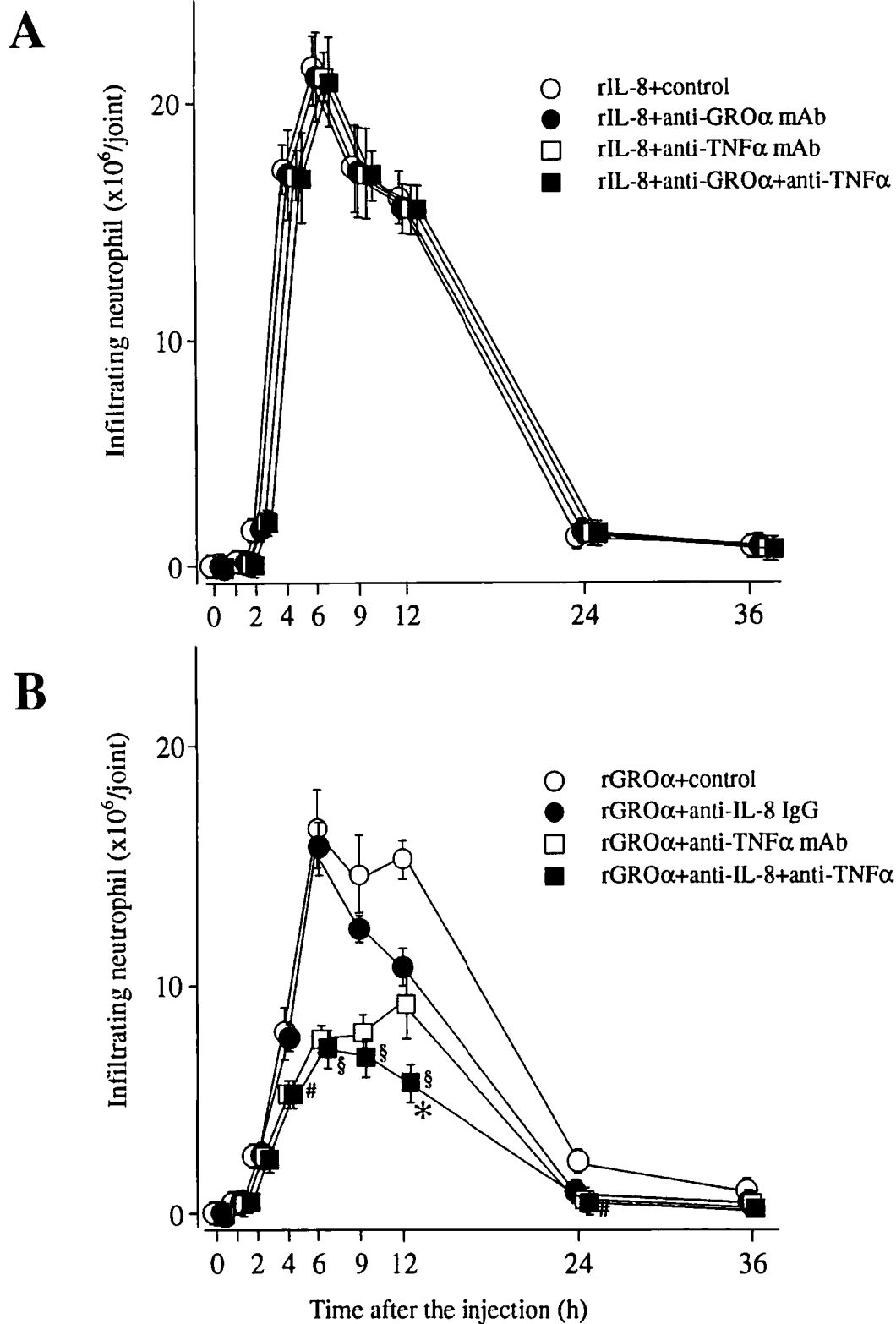


図 14、rIL-8/rGRO $\alpha$  投与後の好中球浸潤における抑制効果の増強。  
 rIL-8(A)+ 抗 GRO $\alpha$  抗体 + 抗 TNF $\alpha$  抗体, rGRO $\alpha$ (B)+ 抗 L-8 抗体 + 抗 TNF $\alpha$  抗体投与後、  
 各時間の浸出好中球数を計測。各値は 8~20 膝の平均  $\pm$  SE  
 #:  $p < 0.05$ , §:  $p < 0.01$  (rGRO $\alpha$  + control と比較)  
 \*:  $p < 0.05$  (rGRO $\alpha$  + 抗 L-8 抗体, rGRO $\alpha$  + 抗 TNF $\alpha$  抗体と比較)

#### VII-14 内因性 TNF $\alpha$ の産生細胞の検討

rGRO $\alpha$  により誘導される内因性 TNF $\alpha$  の産生細胞の同定をおこなうため、好中球枯渇ウサギを用いた実験とウサギ膝滑膜組織の TNF $\alpha$  の免疫染色をおこなった。

##### VII-14-1 好中球枯渇ウサギを用いた検討

正常ウサギ及び好中球枯渇ウサギにおける内因性 TNF $\alpha$  の生物活性をそのピークである 2 時間で比較した。rGRO $\alpha$  投与後 2 時間では正常ウサギと好中球枯渇ウサギで内因性 TNF $\alpha$  の産生量に差は認めなかった (図 15 A)。

##### VII-14-2 免疫染色による検討

rGRO $\alpha$  投与後の滑膜組織の免疫染色では、滑膜組織は関節液中の内因性 TNF $\alpha$  がピーク (2 時間) となる前、つまり関節内投与後 1 時間で採取した組織を用いた。その結果、TNF $\alpha$  は滑膜表層細胞が陽性に染色された (図 15 B)。

以上の結果により rGRO $\alpha$  投与後に産生される内因性 TNF $\alpha$  は浸出好中球ではなく、常在性の滑膜表層細胞などから産生されていると結論された。

#### VII-15 滑膜培養細胞における rIL-8/rGRO $\alpha$ 刺激後の内因性 TNF $\alpha$ 産生

ウサギ膝滑膜初代培養細胞を用いて in vivo での事象を in vitro で検証した。健康なウサギから膝滑膜組織を採取し、コラゲナーゼ処理をしたのち 4~6 日後の均一な付着細胞を用いた。この in vitro の系においても rIL-8 刺激では、用いた 0.03~3  $\mu$ g のいずれの量によっても内因性 TNF $\alpha$  の産生増加がみられないのに対し、rGRO $\alpha$  による刺激では用量依存性に内因性 TNF $\alpha$  の産生量の増加がみられた (図 16)。また GRO $\alpha$  3  $\mu$ g/ml による刺激では、内的コントロールとして用いた LPS 1  $\mu$ g/ml による刺激と同程度の内因性 TNF $\alpha$  (約 1ng/ml) 産生が誘導されていた。

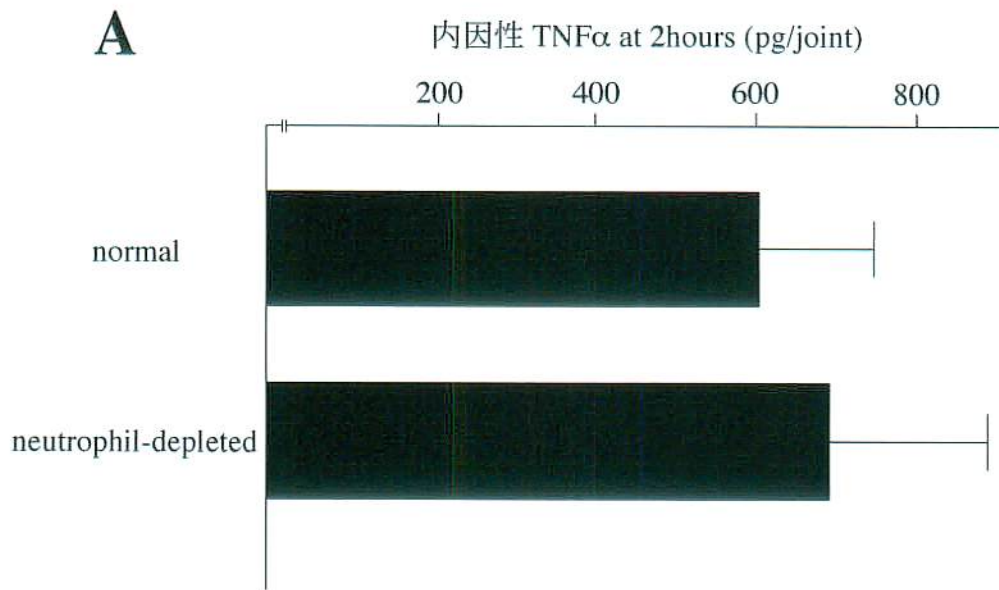


図 15 A、正常ウサギ及び好中球枯渇ウサギにおける rGRO $\alpha$  投与後の内因性 TNF $\alpha$  の産生。rGRO $\alpha$  投与後、内因性 TNF $\alpha$  の産生のピークである 2 時間で比較検討した。好中球枯渇ウサギは nitrogen mustard (1.8mg/Kg) の静脈投与で作成。各値は 8~20 膝の平均 $\pm$  SE

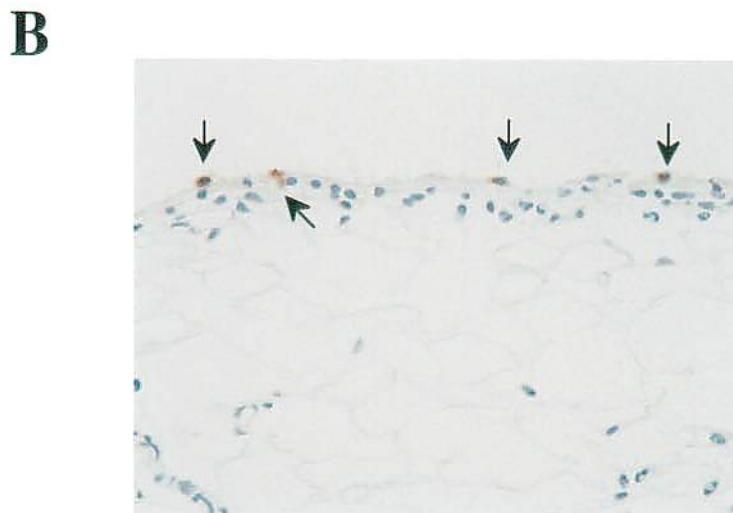


図 15 B、rGRO $\alpha$  投与後のウサギ膝滑膜組織の TNF $\alpha$  の免疫染色。rGRO $\alpha$  投与後、TNF $\alpha$  は 1 時間の時点で滑膜表層細胞が陽性である。

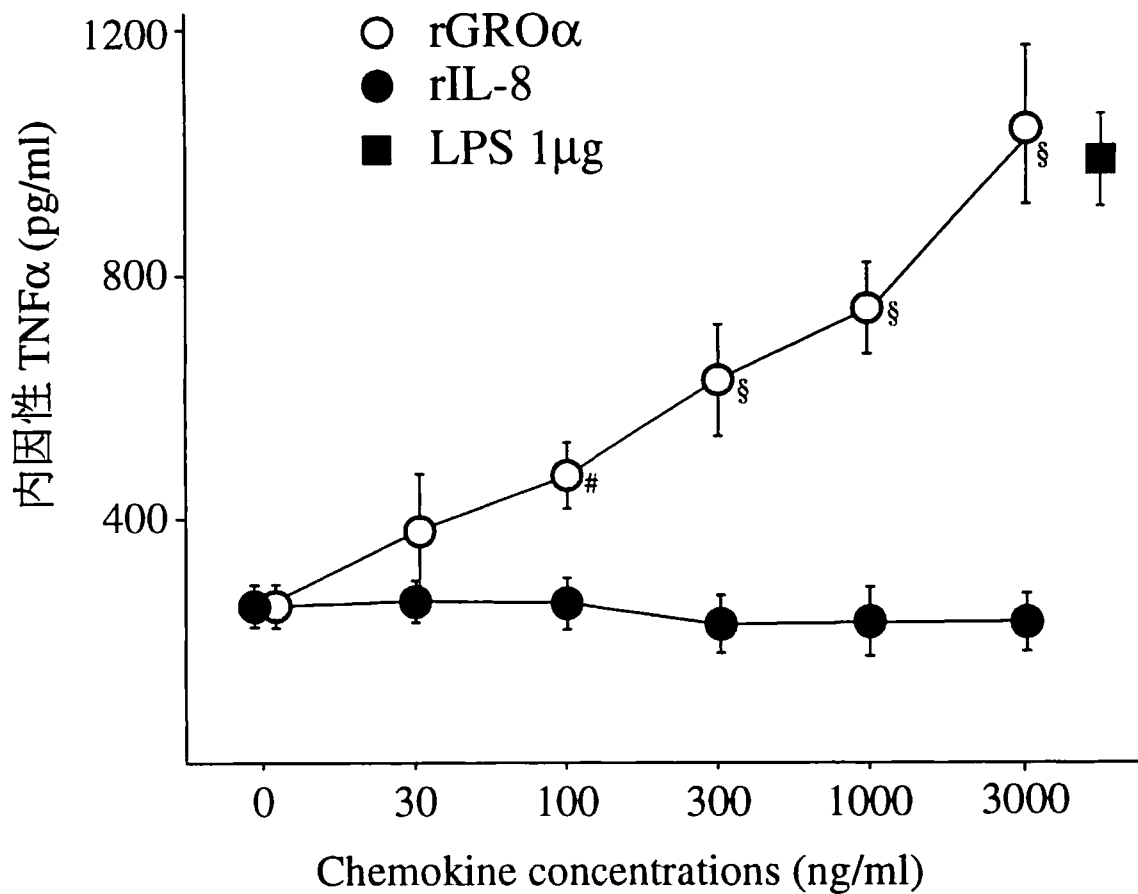


図 16、滑膜培養細胞における rIL-8/rGROα 刺激後の内因性 TNFα の産生。  
 rIL-8 刺激では滑膜培養細胞からの内因性 TNFα の産生増加は認められない。  
 一方、rGROα 刺激では容量依存性に内因性 TNFα の産生増加が認められる。  
 各値は 8~20 well の平均±SE, #: p<0.05, §: p<0.01 (rIL-8 と比較)

## VII-16 rIL-8/rGRO $\alpha$ 刺激後の TNF $\alpha$ の mRNA 発現

rIL-8/rGRO $\alpha$  刺激後の内因性 TNF $\alpha$  の産生誘導における機能差異が、滑膜培養細胞による TNF $\alpha$ mRNA 発現レベルにおいても認められるのか否か調べた。すると、滑膜培養細胞の RT-PCR では、medium 刺激コントロールでは TNF $\alpha$ mRNA の発現が検出されないのに対して、rIL-8/rGRO $\alpha$  刺激後の TNF $\alpha$  の mRNA 発現は同程度であるとみなされた (図 17 A)。さらに、relative intensity ratio の算出による検討でも TNF $\alpha$ mRNA 発現レベルは rIL-8/rGRO $\alpha$  刺激によるいずれの場合も同程度であり、この間に有意差はみとめなかった (図 17 B)。つまり遺伝子発現レベルでは、rIL-8/rGRO $\alpha$  刺激後の内因性 TNF $\alpha$  は同程度誘導されているということが判明した。

## VII-17 セリンプロテアーゼによる TNF $\alpha$ の不活化の検討

前項までに示したように、rIL-8 刺激によっては内因性 TNF $\alpha$  活性の出現は *in vivo*、*in vitro* いずれにおいても認められないのに対し、TNF $\alpha$ mRNA の発現は GRO $\alpha$  刺激の場合と同様に認められるところから、rIL-8 投与後に誘導される内因性 TNF $\alpha$  は不活性化されている可能性があるのではないかと考え、その候補としてプロテアーゼの関与を仮定した。

### VII-17-1 ウサギ rTNF $\alpha$ の関節液における不活化

上記の仮説を検証するため、ウサギ rTNF $\alpha$  と rIL-8 投与後 2 時間の関節液とを *in vitro* でインキュベートさせてみたところ、rTNF $\alpha$  の生物活性が低下した。また、その rTNF $\alpha$  の生物活性の低下はセリンプロテアーゼのインヒビターである PMSF (phenyl methyl sulfonyl fluoride, 0.1mM) をこの系に添加することによって回復した (図 18 A)。

### VII-17-2 *in vivo* における内因性 TNF $\alpha$ の不活化

次に、rIL-8 (10 $\mu$ g) と PMSF (1mM) をウサギ膝関節に同時投与し、関節液中の内因性 TNF $\alpha$  の生物活性を調べた。その結果、rIL-8 (10 $\mu$ g) 単独投与では内因性 TNF $\alpha$  の生物活性は出現しないのに対し、rIL-8 と PMSF の同時投与では 200 pg/joint の内因性 TNF $\alpha$  の生物活性の出現が検出された (図 18 B)。また PMSF を増量 (3, 10, 30mM) しても内因性 TNF $\alpha$  の増加はみとめなかった。以上により、rIL-8 投与では内因性 TNF $\alpha$  の産生は *in vitro*、*in vivo* いずれにおいても誘導されるも、この産生された内因性 TNF $\alpha$  はセリンプロテアーゼによって不活性化されていることが検証された。

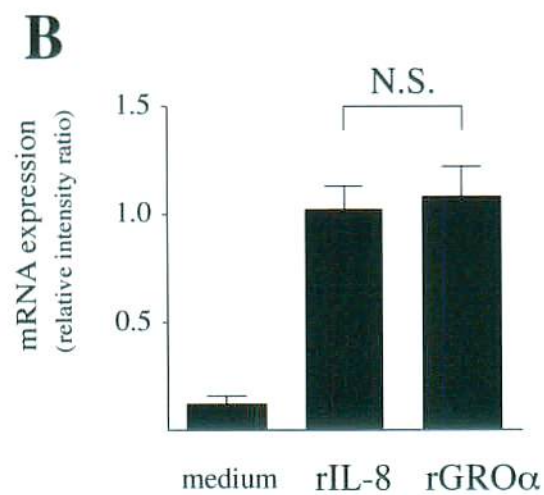
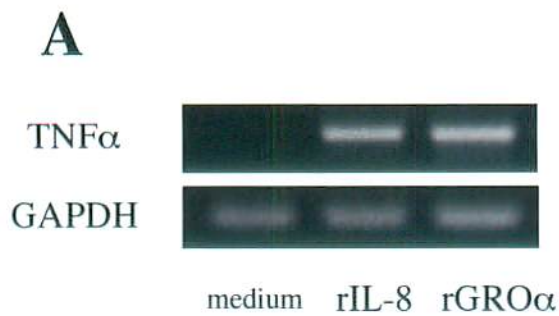


図 17、滑膜培養細胞における medium, rIL-8, rGRO $\alpha$  刺激後の TNF $\alpha$  の mRNA 発現。  
 A: PT-PCR, rIL-8 刺激, rGRO $\alpha$  刺激で TNF $\alpha$  の mRNA 発現が認められた。  
 medium では mRNA 発現は認めない。PT-PCR はいずれも 30 サイクル。  
 B: Relative intensity ratio では rIL-8 刺激と rGRO $\alpha$  刺激で同程度の TNF $\alpha$  の mRNA 発現が認められた。  
 各値は 6 サンプルの平均  $\pm$  SE, N.S.= not significant



**A**

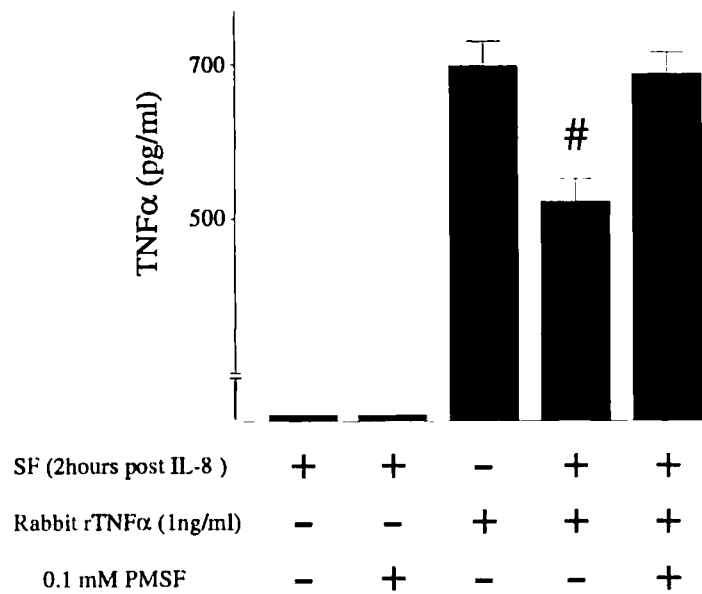


図 18 A、Serine Protease による rTNFα の不活化。

rIL-8 投与後 2 時間の関節液, Rabbit rTNFα, PMSF は 37 度で 1 時間反応させた。

Rabbit rTNFα は関節液で不活化されるものの、Serine Protease のインヒビターである PMSF を加えると rTNFα の不活化は生じなかった。

各値は 8~10 サンプルの平均± SE, #: p<0.05 (関節液 + Rabbit rTNFα + PMSF と比較)

**B**

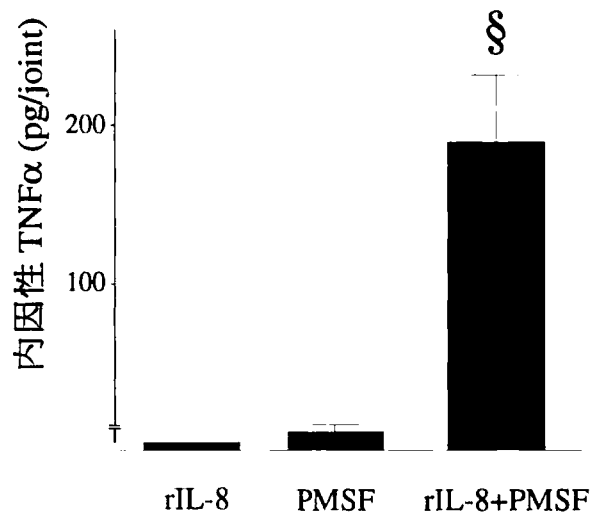


図 18 B、Serine Protease による内因性 TNFα の不活化 in vivo。

ウサギ膝関節に rIL-8 と PMSF 同時投与後 2 時間後の関節液中の内因性 TNFα を測定した。

rIL-8 投与後関節液中の内因性 TNFα は認めないものの、rIL-8 と PMSF の同時投与後では内因性 TNFα の産生が誘導された。

各値は 8~12 膝の平均± SE, §: p<0.001 (rIL-8 投与と比較)

## VIII 考察

我々は急性炎症における IL-8 と GRO $\alpha$  の役割を明らかにするため、ヒトの急性炎症に比較的類似した炎症反応を起すことのできるウサギを用いた。好中球の浸潤に重要な役割を果たしていると考えられている IL-8、GRO $\alpha$  の同種組換体およびその抗体を用いて、LPS で惹起した膝関節炎についての好中球の浸潤動態と、IL-8 と GRO $\alpha$  の産生動態並びにその役割について検索をすすめた。次に、この 2 つの CXC ケモカインの *in vivo* における機能差異が認められるのか否かを知るため、ウサギ膝関節内に IL-8 /GRO $\alpha$  同種組換体をそれぞれ 10 $\mu$ g 投与することで好中球主体の細胞浸潤を再現し、これらの rIL-8/rGRO $\alpha$  により誘導された病態に関して分析、比較検討した。

### VIII-1 ウサギ LPS 膝関節炎の場における白血球の浸潤と IL-8, GRO $\alpha$ 産生との関連

ウサギ膝関節腔内に大腸菌 LPS の 1 ~ 1000 ng を注射した場合には、白血球浸潤を伴う炎症反応を惹起できることを予備実験により確認しており、今回の実験では LPS 10 ng を用いた炎症反応を選んで使用した。この LPS 膝関節炎では、他の急性炎症と類似して 9 時間にピークを示す急速な好中球の浸潤 ( $25.9 \pm 1.4 \times 10^6$ ) と、なだらかな山を描いて増加し 12 時間でピークとなるマクロファージの浸潤 ( $2.7 \pm 0.39 \times 10^6$ ) が認められる (図 1)。この炎症反応は他の炎症刺激による関節炎の白血球浸潤動態とも類似しており、ごく普通の急性炎症に見られる白血球の浸潤動態である。

この LPS 膝関節炎の関節内浸出液中の IL-8, GRO の産生量を測定した結果 (図 2)、IL-8, GRO とともに炎症早期 1 時間後から検出されはじめ 2 時間目をピークとしていた。また IL-8 は 1 相性の産生動態を示すのに対し、GRO は 9 時間にもピークをもつ 2 相性の産生動態を示した。LPS 膝関節炎では好中球遊走能をもつ IL-8, GRO が 2 時間でピークをつくっており、好中球の浸潤のピークが 9 時間であることから、IL-8, GRO の好中球浸潤への関与が示唆された。

また、図 3 に示すように、IL-8, GRO の産生はお互いに独立しており、一方のケモカインの機能を特異抗体によりブロックしてもそれぞれの産生は影響をうけていなかった。これは、IL-8, GRO とともにおのおの独立して好中球の浸潤に対しバックアップ機構として関与していることも示唆している。

## VIII-2 LPS 膝関節炎における抗 IL-8 抗体、抗 GRO $\alpha$ 抗体による

### 白血球の浸潤抑制とその意義

LPS 膝関節炎の惹起時に抗 IL-8 抗体 (10  $\mu$ g) を投与すると炎症 4 時間以後 12 時間まで 35%~50% の好中球浸潤の抑制が認められ、抗 GRO $\alpha$  抗体でも炎症 4 時間以後 12 時間まで 30%~55% の好中球浸潤の抑制が認められた。これら両方のケモカインをブロックすると好中球浸潤の抑制は、60%~65% に達した (図 4)。抗 GRO $\alpha$  抗体と抗 IL-8 抗体の抑制効果はほぼ同等であり、両方の抗体で抑制効果は相加的であった。これは、LPS 膝関節炎での IL-8, GRO の産生量がほぼ同じ程度であること、各々の産生が独立していることと整合している。ヒト GRO 組換え体の好中球浸潤抑制効果は、ヒト IL-8 組換え体の抑制効果とほぼ等しい [67] との報告があり我々の結果とも一致している。

従来の我々の研究室での結果、LPS 膝関節炎において TNF $\alpha$  と IL-1 の両方をブロックすると細胞浸潤の抑制効果は 80%~90% にまで達した [59]。しかし今回、IL-8, GRO 両方のブロックでも抑制効果は 60%~65% であり、投与抗体の量を増やしても、これ以上の高度の抑制は認められなかったことから、TNF $\alpha$  と IL-1 により誘導される何かほかの好中球遊走因子が関与している可能性が残っている。

以上、① IL-8, GRO $\alpha$  の産生は *in vivo* で非常に早期から始まっており、共におのこの独立して産生されている事、② IL-8/GRO $\alpha$  には明らかな好中球に対する *in vitro* 遊走活性をもつこと、③ これらのケモカインの機能を特異的にブロックすることにより、LPS 炎症における好中球浸潤が抑制されることから、IL-8 および GRO $\alpha$  はともに初期の炎症細胞浸潤に深く関与している事を立証した。

## VIII-3 rIL-8/rGRO $\alpha$ 関節内投与後の炎症細胞浸潤と

### 内因性 GRO $\alpha$ /IL-8 の誘導について

IL-8, GRO $\alpha$  は構造的にも好中球遊走作用においても非常に類似した CXC ケモカインであることが知られている。しかし、LPS 炎症におけるこれらの産生動態の違いから、我々はこれらのケモカインの *in vivo* における機能になんらかの違いがあるのではなからうかと考えるにいたった。そこでウサギ膝関節内に同種 rIL-8, rGRO $\alpha$  をそれぞれ 10 $\mu$ g 投与し、その後生じる反応について比較、検討した。

rIL-8 投与後、好中球は 6 時間にピークのある 1 相性の細胞浸潤を認め、また rGRO $\alpha$

では投与後、好中球は6時間と12時間にピークのある2相性の細胞浸潤を認めた。その誘導される細胞数は、rGRO $\alpha$ に比べrIL-8投与後のほうがやや多い程度であった(図6)。また、ウサギ膝関節内に同種rIL-8, rGRO $\alpha$ をそれぞれ投与する場合、お互いに好中球主体の細胞浸潤を再現できるが、in vivoにおける好中球浸潤作用がややrIL-8が高いのに加え、rIL-8による炎症細胞浸潤動態が単相性であるのに、rGRO $\alpha$ によるそれは2相性である点で若干異なっていた。

rIL-8投与後、内因性GRO $\alpha$ は2時間と12時間にピークをもつ2相性の産生動態を認め、rGRO $\alpha$ 投与後、内因性IL-8も2時間と12時間にピークをもつ2相性の産生動態を認めた。この結果によりrIL-8は内因性GRO $\alpha$ の産生を誘導し、逆にrGRO $\alpha$ も内因性IL-8の産生を誘導していることがわかった。また、rIL-8投与後の内因性GRO $\alpha$ の産生量(580 $\pm$ 82 pg/joint n=8)は、rGRO $\alpha$ 投与後の内因性IL-8(797 $\pm$ 175 ng/joint n=8)と比較して有意差がなく同程度と考えられ、これらの点ではrIL-8およびrGRO $\alpha$ の機能に著しい差は認められなかった。

#### VIII-4 内因性GRO $\alpha$ /IL-8の産生誘導とその産生細胞

好中球枯渇ウサギにおいてもrIL-8/rGRO $\alpha$ 投与後2時間の内因性GRO $\alpha$ /IL-8の産生が正常ウサギと同程度誘導されていた(図8)。また免疫染色の結果、早期の内因性GRO $\alpha$ /IL-8の陽性細胞は膝滑膜表層細胞であった(図9)。以上からケモカイン組換え体により誘導される1相目(2h)の内因性GRO $\alpha$ /IL-8の産生細胞は滑膜表層細胞であることが判明した。2相目(12h)の内因性GRO $\alpha$ /IL-8の産生細胞は、浸出好中球が主体で、これに加えて常在性の細胞からも産生されていることもわかった。この事は、rIL-8/rGRO $\alpha$ 投与後の浸出好中球のピークが6時間であり、内因性GRO $\alpha$ /IL-8の2相目のピーク(9h)より少し前の時間にあることと関連していると理解できる。つまりrIL-8/rGRO $\alpha$ 投与後、常在性の滑膜表層細胞が刺激され、内因性GRO $\alpha$ /IL-8およびTNF $\alpha$ 等の他のサイトカインを産生する。また関節内へ浸出してきた好中球からもGRO $\alpha$ /IL-8等のサイトカインが産生されてくる。この様相は図19に模式図で示す。

急性炎症では、炎症の導入及び増幅が起こるなかで、時間の経過と共に、プログラムされた反応経路が順をおって発動、展開していく。数多くのサイトカインがお互いに誘導、制御しながらネットワークを構成している。今回、rIL-8/rGRO $\alpha$ 投与後に内因性GRO $\alpha$ /IL-8が常在性の滑膜表層細胞、および浸出してきた好中球からも産生されてい

たという事実は、このような人工的環境下にあっても容易にサイトカインネットワークの活性化が誘導されうることを示している。

#### VIII-5 抗 IL-8 抗体、抗 GRO $\alpha$ 抗体による好中球の浸潤抑制とその意義

興味あることに、好中球浸潤は rIL-8 投与群では内因性 GRO $\alpha$  をブロックしても変化が認められないのに対し、rGRO $\alpha$  投与群では内因性 IL-8 をブロックすると 9 時間、12 時間、24 時間における浸出好中球の抑制が認められ、浸出好中球のキネテイクスは 6 時間をピークとする 1 相性となった (図 10)。これらの結果から rIL-8 投与群では内因性 GRO $\alpha$  の産生が誘導されるものの好中球浸潤には関与していないが、rGRO $\alpha$  投与群では内因性 IL-8 の産生が誘導され 2 相目の好中球浸潤に関与していることを示す。これは、IL-8 と GRO $\alpha$  の結合するレセプターに違いがあり、IL-8 は CXCR1, CXCR2 の両者に結合できるが、GRO $\alpha$  は CXCR2 のみしか結合できない[68-70]ためと考える。すなわち、rIL-8 投与後には CXCR1, CXCR2 両者が rIL-8 により占拠されるため、誘導された内因性 GRO $\alpha$  はレセプターに結合できないので好中球浸潤へ影響を与えないと推測する。一方、rGRO $\alpha$  投与後には CXCR2 のみが rGRO $\alpha$  により占拠されているものの CXCR1 は空いた状態にある。そこで誘導された内因性 IL-8 は CXCR1 に結合できるためさらに好中球浸潤をもたらしたと考えられる。rGRO $\alpha$  投与後の好中球の浸潤動態は 2 相性であったが、抗 IL-8 抗体の同時投与により 6 時間をピークとする 1 相性となり、rIL-8 投与後の 1 相性のピークと同じ時間、同じ動態となったこともこの考えを支持する。

ここで、rGRO $\alpha$  投与後に内因性 IL-8 の産生のピークは 2 時間にあるのに、なぜ 6 時間の好中球浸潤には影響せず 9 時間以降に影響するのかという疑問が生じる。このことは、おそらく関節内で産生誘導された内因性 IL-8 が、その好中球遊走能を発揮し細静脈から膝関節腔内へ好中球浸潤をもたらすまで数時間の潜伏時間を要するためと考えられる。実際、rIL-8, rGRO $\alpha$  を投与した今回の実験でも膝関節内への好中球浸潤のピークは投与後 6 時間であった。つまり、rGRO $\alpha$  を膝関節腔内へ投与する事により好中球遊走作用が発揮され、膝関節腔内へ好中球浸潤 (ピーク: 6h) がもたらされる。同時に刺激された滑膜表層細胞から内因性 IL-8 (ピーク: 2h) が産生され、この内因性 IL-8 が好中球浸潤をもたらすのが 9 時間以降となったものと考えられる。そのため rGRO $\alpha$  投与では、結果として 6 時間と 12 時間にピークのある 2 相性の好中球浸潤動態が形成

されてきたと思われる。

#### VIII-6 抗 TNF $\alpha$ 抗体による好中球の浸潤抑制と抑制効果の増強

TNF $\alpha$  は代表的な炎症性サイトカインであり、炎症の早期から産生されること、さまざまな刺激で容易にその産生が高まることから、rIL-8, rGRO $\alpha$  投与という人工的条件下でも TNF $\alpha$  の関与を考慮する必要がある。そこで、抗 TNF $\alpha$  抗体を用い、rIL-8, rGRO $\alpha$  投与後の好中球浸潤について調べた。その結果、① rIL-8 投与後の好中球浸潤は抗 TNF $\alpha$  抗体でまったく抑制されなかったものの、rGRO $\alpha$  による好中球浸潤は抗 TNF $\alpha$  抗体で 4 時間以降有意に抑制された (図 11)。② 膝関節液中の内因性 TNF $\alpha$  の産生は、rIL-8 投与では検索した限りのどの時間帯においても TNF $\alpha$  が検出されないのに対して、rGRO $\alpha$  投与では 2 時間をピークとする 1 相性の産生を認めた (図 12)。また周知のごとく TNF $\alpha$  は *in vitro* において好中球遊走能を持たないことから rGRO $\alpha$  が内因性 TNF $\alpha$  の産生を誘導し、その TNF $\alpha$  が好中球遊走能をもつ mediator を介して膝関節腔内へ好中球浸潤をもたらしていることも判明した。

次に抗 IL-8/GRO $\alpha$  抗体に加え抗 TNF $\alpha$  抗体も同時投与し、rIL-8/rGRO $\alpha$  による好中球浸潤への抑制効果の増強を調べた。すると、図 14 に示すように rIL-8 投与による好中球浸潤は抗 GRO $\alpha$  抗体+抗 TNF $\alpha$  抗体でまったく抑制されなかったものの、rGRO $\alpha$  投与による好中球浸潤は抗 IL-8 抗体+抗 TNF $\alpha$  抗体で 4 時間以降有意に抑制され、その効果は抗 TNF $\alpha$  抗体単独に比べ増強していた。また 2 つのブロッカーでの抑制効果は、投与後 6 時間では抗 TNF $\alpha$  抗体単独と同等で、投与後 12 時間では抗 TNF $\alpha$  抗体単独より有意に増強しており、この効果は相加的であることがわかった。rGRO $\alpha$  投与後の早期の内因性 IL-8 産生と内因性 TNF $\alpha$  産生がおのおの独立して誘導されていた結果 (図 13) からも、この抑制効果が相加的であることを理解しやすい。以上により、rGRO $\alpha$  投与後早期に誘導される内因性 IL-8 と内因性 TNF $\alpha$  はお互いに独立して誘導されており、その後の細胞浸潤の展開に大きく関与しているといえる。

#### VIII-7 内因性 TNF $\alpha$ の産生細胞の検索とその意義

正常ウサギ及び好中球枯渇ウサギにおける rGRO $\alpha$  による内因性 TNF $\alpha$  の産生をそのピークである 2 時間で比較すると、rGRO $\alpha$  投与後 2 時間では正常ウサギと好中球枯渇ウサギで内因性 TNF $\alpha$  の産生量に差を認めなかった (図 15 A)。また rGRO $\alpha$  投与後の

滑膜組織の免疫染色では、TNF $\alpha$  は滑膜表層細胞が陽性に染色された (図 15 B)。以上により rGRO $\alpha$  投与後に産生される内因性 TNF $\alpha$  は浸出好中球ではなく、常在性の滑膜表層細胞により主に産生されているといえる。

さらに図 16 に示すように、rIL-8 刺激では内因性 TNF $\alpha$  の産生誘導がみられないのに対し、rGRO $\alpha$  刺激では用量依存性に内因性 TNF $\alpha$  の産生量の増加がみられた。このようにウサギ膝滑膜培養細胞を用いて in vitro で検証した結果からも rGRO $\alpha$  投与後の内因性 TNF $\alpha$  の産生は滑膜表層細胞によることが支持される。また rGRO $\alpha$  3  $\mu$ g/ml 刺激では、LPS 1  $\mu$ g/ml 刺激と同程度の内因性 TNF $\alpha$  (約 1000 pg/ml) 産生が誘導されていた結果から、rGRO $\alpha$  は強く内因性 TNF $\alpha$  の産生誘導をおこなっていることがわかる。

#### VIII-8 滑膜培養細胞における内因性 TNF $\alpha$ 産生, mRNA 発現 とその意義

rIL-8 刺激によっては滑膜培養細胞からの内因性 TNF $\alpha$  産生の誘導は認められなかった。しかし、IL-8 は CXCR1 および CXCR2 の両者を介して細胞に刺激シグナルを与えることができるのに対し、GRO $\alpha$  は CXCR2 のみを介して刺激シグナルを与えるとの知見からは rIL-8 のみが滑膜細胞に対して TNF $\alpha$  産生のシグナルを与えない事実は理解しにくい。そこで、rIL-8 刺激ではどの時点から TNF $\alpha$  産生のシグナルが誘導されていないのか検索する必要がある。まず、rIL-8/rGRO $\alpha$  刺激後の滑膜培養細胞における TNF $\alpha$  mRNA 発現を検索した。すると、滑膜培養細胞の RT-PCR では、medium 刺激コントロールでは TNF $\alpha$  mRNA 発現がみられないのに対して、rIL-8, rGRO $\alpha$  刺激後の TNF $\alpha$  の mRNA 発現は同程度であった (図 17 A)。さらに、relative intensity ratio の測定により mRNA 発現レベルを半定量した場合もこの発現量は同程度であり、有意差はみとめなかった (図 17 B)。つまり転写レベルでは、rIL-8/rGRO $\alpha$  刺激後の内因性 TNF $\alpha$  は同程度に誘導されているということがわかった。

TNF $\alpha$  は trypsin, chymotrypsin, cathepsin G, elastase などのセリンプロテアーゼで不活性化され、その生物活性を消すといういくつかの報告がある [71-73]。またケモカインによるエラスターゼの分泌には CXCR1 が非常に重要であるとの報告もある [74]。以上のことから IL-8 投与後に誘導される内因性 TNF $\alpha$  はセリンプロテアーゼにより不活性化されている可能性があるのではないかと考えた。

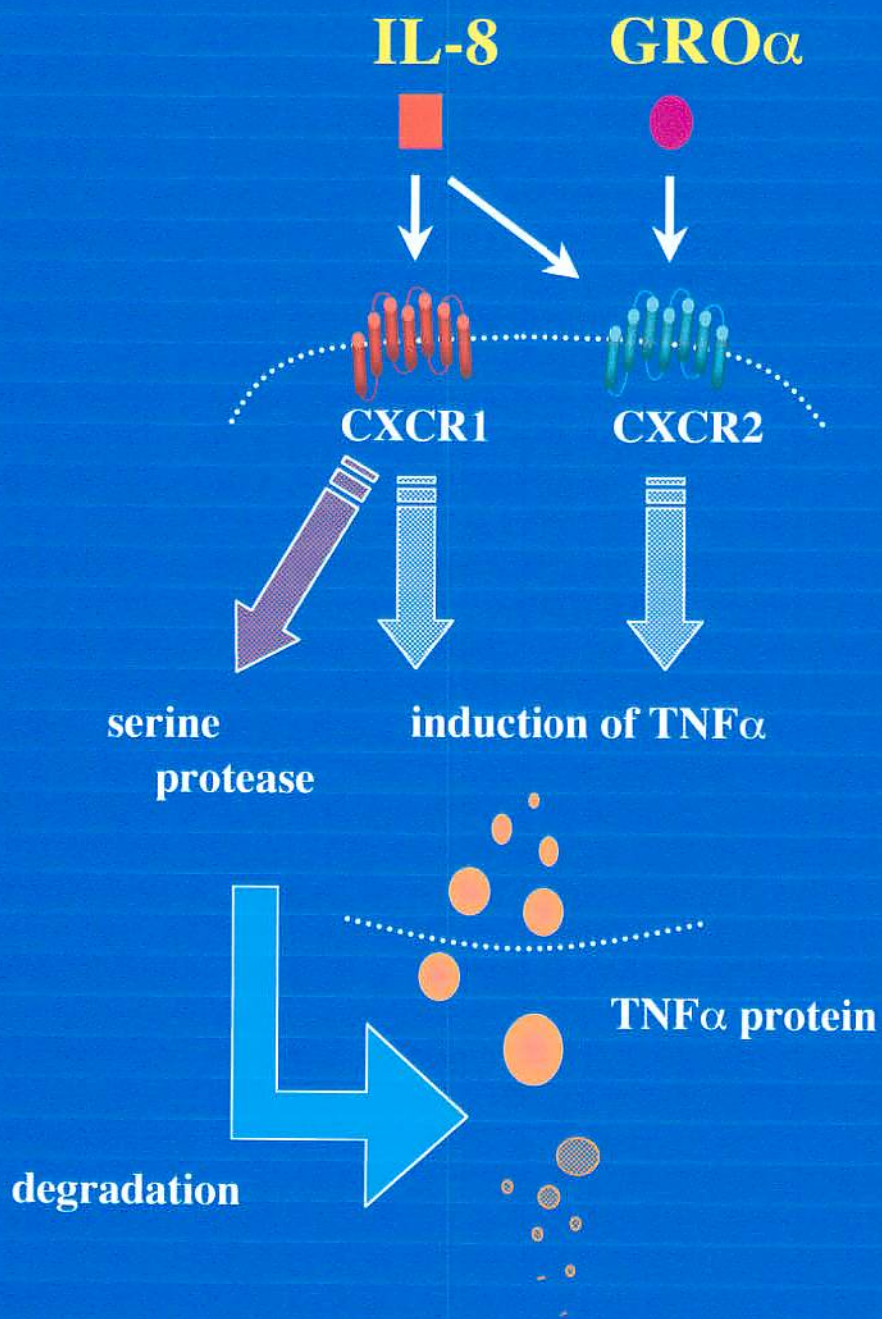
## VIII-9 セリンプロテアーゼによる内因性 TNF $\alpha$ 不活化の意義

rIL-8 投与後に誘導される内因性 TNF $\alpha$  は炎症の間では不活性化されている可能性があり、その候補として rIL-8 によってはその産生が誘導されるが、rGRO $\alpha$  によっては誘導されないセリンプロテアーゼがあると考えた。そこで、ウサギ rTNF $\alpha$  と rIL-8 投与後 2 時間の関節液とを *in vitro* でインキュベートしたところ、rTNF $\alpha$  の生物活性が低下した。また、その rTNF $\alpha$  の生物活性の低下はセリンプロテアーゼのインヒビターである PMSF(0.1mM) によって回復した (図 18 A)。次に、rIL-8 (10 $\mu$ g) と PMSF(1mM) をウサギ膝関節に同時投与し、関節液中の内因性 TNF $\alpha$  の生物活性を調べた。すると rIL-8 (10 $\mu$ g) 単独投与では内因性 TNF $\alpha$  の生物活性は検出されないものの、rIL-8 と PMSF の同時投与では (187 $\pm$ 45 pg/joint n=8) の内因性 TNF $\alpha$  の生物活性が検出された (図 18 B)。また好中球枯渇ウサギに rIL-8 を投与した結果でも、2 時間後の内因性 TNF $\alpha$  の生物活性は検出されなかったことから、セリンプロテアーゼは浸出好中球ではなく滑膜表層細胞より分泌されていると結論した。さらに rGRO(10 $\mu$ g) と PMSF(1mM) を膝関節内に同時投与しても、内因性 TNF $\alpha$  の生物活性は rGRO $\alpha$  単独投与と有意差がなかった。以上により、rIL-8 投与群では内因性 TNF $\alpha$  の産生は誘導され分泌もされているが、滑膜表層細胞より CXCR1 を介して分泌されるセリンプロテアーゼによって不活性化されていることが証明された。また、rGRO $\alpha$  は CXCR2 のみしか結合しないため *in vivo* においてもセリンプロテアーゼの産生を誘導していないと推測された (図 19)。

しかし、rIL-8 と PMSF の同時投与後の内因性 TNF $\alpha$  の生物活性 (187 $\pm$ 45 pg/joint n=8) と rGRO $\alpha$  投与後の内因性 TNF $\alpha$  の生物活性 (597 $\pm$ 125 pg/joint n=12) には明らかな有意差がある。この理由としては、TNF $\alpha$  の転写の段階での差異、または TNF $\alpha$  レセプター-の up-regulation と solubleTNF $\alpha$  レセプター-のシェディングなどによる TNF $\alpha$  活性の抑制等のメカニズムの可能性が今後の問題として残る。今後、CXCR1 に対する antagonist/antibody または特異的な CXCR1 agonist を用いての研究が必要であろう。



# 図19, Possible mechanism



## IX 結語

この Thesis において、第 1 の実験では、LPS 注射による比較的単純な急性炎症モデルを用いて、好中球浸潤における CXC ケモカインの代表的な因子である IL-8, GRO $\alpha$  の役割を観察した。この 2 つの CXC ケモカインは炎症における好中球浸潤を起す重要な因子として注目している。この実験により、LPS 関節炎において IL-8, GRO $\alpha$  は早期から産生され、お互いに独立して好中球浸潤を誘導し、初期の急性炎症に深く関与している事が判明した。これまでに明らかとなっている急性炎症初期におけるサイトカインネットワークに、今回判明した事柄を追加し、急性炎症でみられるネットワークの一端を図示した (図 20)。

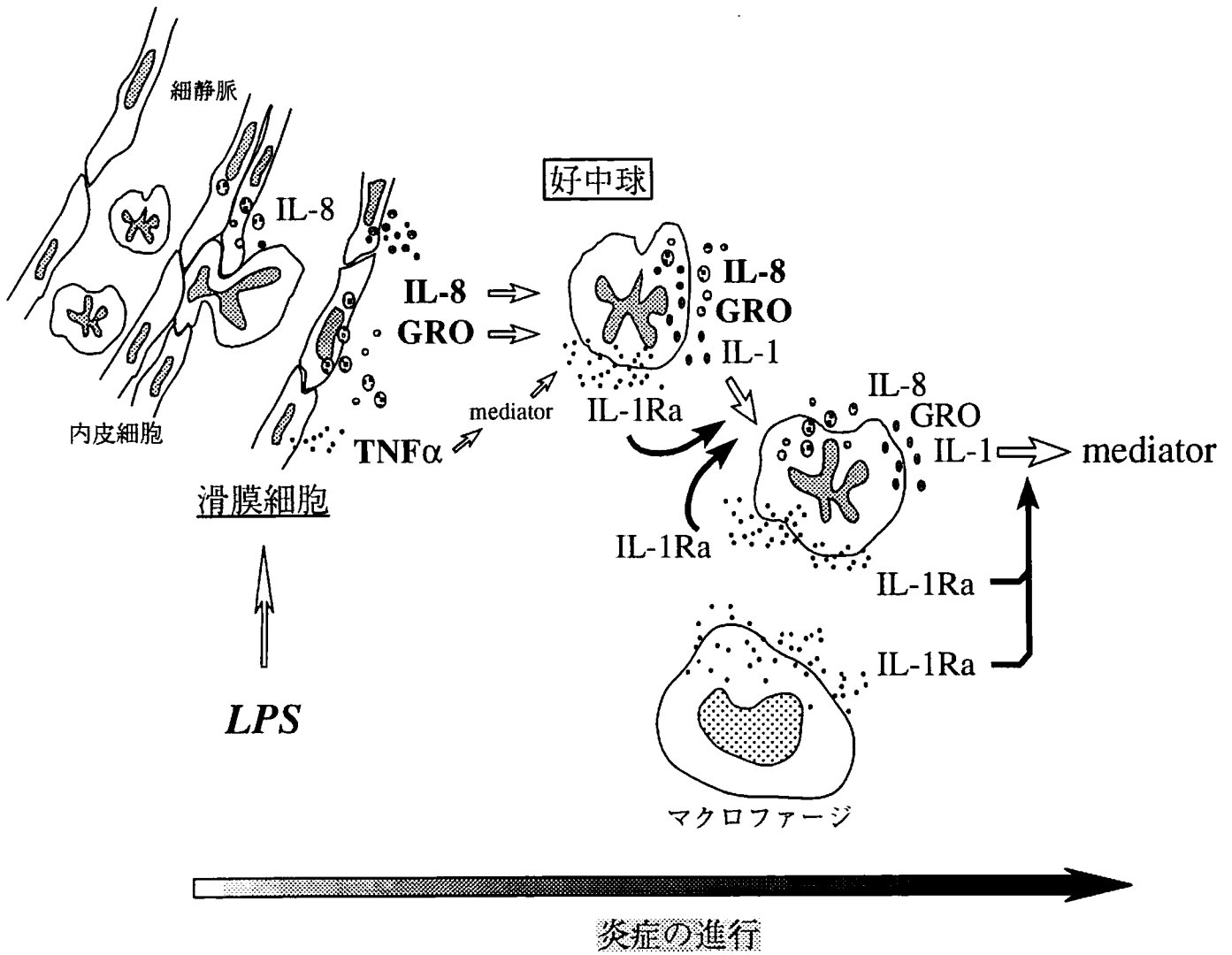
第 2 の実験では、ウサギ膝関節内に同種 IL-8, GRO $\alpha$  組換体をそれぞれ 10 $\mu$ g 投与することで炎症細胞浸潤を再現し、in vivo における IL-8, GRO $\alpha$  の機能を比較した。この結果、① 好中球浸潤を同様に誘導する 2 つの CXC ケモカインであるが、IL-8 は直接好中球の浸潤をおこすのに対して、GRO $\alpha$  は好中球浸潤に直接働く他に TNF $\alpha$ 、IL-8 など他のサイトカインを介して好中球浸潤をおこす経路が存在していること。

② IL-8/GRO $\alpha$  とともに内因性 TNF $\alpha$  の産生を誘導するが、IL-8 により誘導される内因性 TNF $\alpha$  は同様に IL-8 によって誘導されるセリンプロテアーゼによって不活化されていることを明らかにできた。これら IL-8 と GRO $\alpha$  における機能的な差異は、今まで全く明らかにされていなかった事柄である。

多くの ケモカインが次々と発見されその多様な作用が明らかになるなかで、IL-8 と GRO $\alpha$  の in vivo における機能的な差異の判明は、白血球浸潤におけるケモカイン間の調節、制御に多くの示唆を与えるものと考えられる。また CXC R1 と CXC R2 の生体におけるおのおのの役割についても、今後新しい研究の展開への手掛かりとなると考えている。

急性炎症反応の発現の様相は、さまざまな現象が組み合わされた複合現象であるが、プログラムされた反応経路が順を追って発動される仕組みになっている。炎症システムのなかで数多くサイトカインがお互いに誘導、制御しながらネットワークを構成している。今後さらに研究が進み、メディエーターの活性あるいは産生をコントロールすることにより、炎症における白血球浸潤とそれにつづく組織障害を阻止できるようになれば、炎症の治療に新しい方策が生まれると期待している。

図 20. 急性炎症初期におけるサイトカインネットワーク



## X 参考文献

- [1] 吉永 秀 (1994). 炎症、その意義と発現のメカニズム。「薬局」別冊 vol. 45, No.3
- [2] Vaddi K. Keller M. and Newton R.C. IL-8 in: The chemokine, Facts Book, Academic Press. 1997: 23-7.
- [3] Goto K. Nakamura S. and Yoshinaga M. Generation of an interleukin-1-like lymphocyte-stimulating factor at inflammatory sites: Correlation with the infiltration of polymorphonuclear leucocytes. Brit. J. Exp. Pathol. 1984; 65: 521-32.
- [4] Issekutz T B. Issekutz A C. and Movat, H.Z. The in vivo quantitation and kinetics of monocyte migration into acute inflammatory tissue. Am. J. Pathol. 1981; 103: 47-55.
- [5] Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. J. Exp. Med. 1962; 115: 453-66.
- [6] Hayashi H. Yoshinaga M. Nature of a natural mediator for PMN emigration in inflammation. In: Chemotaxis: Its Biology and Biochemistry. E. Sorkin ed. S Karger (Basel); 1974: 296-332.
- [7] Matsushima K. Morishita K. Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. J Exp Med.1988; 167: 1883-93.
- [8] Yoshimura T. Yuhki N. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. FEBS Letters. 1989; 244: 487-93.
- [9] Ohkawara S. Goto F and Yoshinaga M. Interleukin 1 as an inflammatory hormone. Acta Pathol. Jap. 1989; 39: 85-100.
- [10] Zinsser H. Tamiya T. An experimental analysis of bacterial allergy. J. Exp. Med.

1926; 44: 753-76.

[11] 笠倉 新平 編 (1997) サイトカイン 日本医学館

[12] Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 675-705.

[13] Luster AD. Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl. J Med* 1998; 338: 436-45.

[14] Oppenheim JJ, Zachariae CO. Properties of the novel proinflammatory supergene "intecrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol* 9 : 617-648, 1991.

[15] Murphy PM, Tiffany HL. Cloning of complementary DNA encoding a functional human IL-8 receptor. *Science* 253: 1280-1283, 1991.

[16] Loetscher P, Seitz M. Both IL-8 receptors independently mediate chemotaxis. Jurkat cells transfected with IL-8R1 or IL-8R2 migrate in response to IL-8, GRO and NAP-2. *FEBS Lett* 341: 187-192, 1994.

[17] Xu L, Kelvin DJ, Ye GQ, Taub DD. Modulation of IL-8 receptor expression on purified human T lymphocytes is associated with changed chemotactic responses to IL-8. *J Leukoc Biol* 57: 335-342, 1995.

[18] Lee J, Horuk R. Characterization of two high affinity human IL-8 receptors. *J Biol Chem* 267: 16283-16287, 1992

[19] Besemer J, Hujber A. Specific binding, internalization, and degradation of human neutrophil activating factor by human polymorphonuclear leukocytes. *J Bio Chem* 264: 17409-17415, 1989.

[20] Mollereau C, Muscatelli F. The high-affinity IL-8 receptor gene (IL-8RA) maps to the 2q33-q36 region of the human genome: cloning of a pseudogene (IL-8RBP) for the low-affinity receptor. *Genomics* 16: 248-251, 1993.

- [21] Ludwig A, Peterson F. The CXC chemokine neutrophil-activating peptide-2 induces two distinct optima of neutrophil chemotaxis by differential interaction with IL-8 receptors CXCR-1 and CXCR-2. *Blood* 90: 4588-4597, 1997.
- [22] 室田誠逸、柏崎禎夫編. 炎症と抗炎症戦略、245-253. 医薬ジャーナル社
- [23] Skelton NJ, Quan C, Reilly D. Structure of a CXC chemokine receptor fragment in complex with IL-8. *Structure Fold Des* 7: 157-168, 1999
- [24] Cumming et al, Martin TR. Expression and function of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in sepsis. *J Immunol* 162: 2341-2346, 1999
- [25] Cerretti DP, Kozlosky CJ. Molecular characterization of receptors for human IL-8, GRO and NAP-2. *Mol Immunol* 30: 359-367, 1993.
- [26] Bozic CR, Gerard NP. The murine IL-8 type B receptor homologue and its ligands. Expression and biological characterization. *J Biol Chem* 269: 29355-29358, 1994.
- [27] Cerretti DP. The murine homologue of the human IL-8 receptor type B maps near the Ity-Lsh-Bcg disease resistance locus. *Genomics* 18: 410-413, 1993.
- [28] Mueller SG. Melanoma growth stimulatory activity enhances the phosphorylation of the classII IL-8 receptor in non-hematopoietic cells. *J Biol Chem* 269: 1973-1980, 1994.
- [29] Parado GN. Molecular characterization of a novel rabbit IL-8 receptor isotype. *J Biol Chem* 269: 12391-12394, 1994.
- [30] Ludwig A. The CXC-chemokine NAP-2 induces two distinct optima of neutrophil chemotaxis by differential interaction with IL-8 receptors CXCR1 and CXCR2. *Blood* 90, 4588-4597, 1997.
- [31] Dunstan CAN. Identification of two rat genes orthologous to the human IL-8 receptors. *J Biol Chem* 271: 32770-32776, 1996.

- [32] Lemster BH et al . IL-8 / IL-8 receptor expression in psoriasis and the response to systemic tacrolimus (FK506) therapy. *Clin Exp J Immunol* 99: 148-154, 1995
- [33] Nilsson G et al . Mast cell migratory response to IL-8 is mediated through interaction with chemokine receptor CXCR2/IL-8RB. *Blood* 93: 2791-2797,1999
- [34] Cacalano G et al . Neutrophil and B cell expansion in mice that lack the murine IL-8 receptor homologue. *Science* 265: 682-684, 1994
- [35] Yoshimura, T., Matsushima, K. et al. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 9233-9237, 1987
- [36] Matsushima, K. Morishita, K, Yoshimura, T. Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by IL-1 and TNF: *J. Exp. Med.* 167, 1883-1893, 1988
- [37] Krishna V, Margret K, Robert CN. *The Chemokine Facts Book*, 23-37, 1997.
- [38] Matsumoto, T., Ikeda ,K et al. Prevention of cerebral edema and infarct in cerebral reperfusion injury by an antibody to IL-8: *Lab. Invest.* 77,119-125, 1997.
- [39] Yokoi, K., Mukaida, N et al. Prevention of endotoxemia- induced acute respiratory distress syndrome-like lung injury in rabbits by a monoclonal antibody to IL-8: *Lab. Invest.* 76, 375-384, 1997.
- [40] Sekido N et al. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against IL-8. *Nature* 365: 654-657, 1993
- [41] Middleton J. Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell* 91: 385-395, 1997
- [42] Anisowicz A et al. Constitutive overexpression of growth-regulated gene in transformed Chinese hamster and human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7188-7192,1987.



- [43] Richmond A. Molecular characterization and chromosomal mapping of melanoma growth stimulatory activity, a growth factor structurally related to b thromboglobulin. *EMBO J* 7: 2025-2033,1988.
- [44] Baker NE. Nucleotide sequence of the human melanoma growth stimulatory activity (MGSA) gene. *Nucl acids Res* 18: 6453, 1990
- [45] Balentine E. Effects of MGSA/GRO $\alpha$  on melanocyte transformation. *Oncogene* 6: 1115-1124, 1991
- [46] Gold EE. Inflammatory cytokines induce synthesis and secretion of GRO protein and neutrophil chemotactic factor but not b -microglobulin in human synovial cells and fibroblasts. *Biochem J* 259: 585-588, 1989.
- [47] Schroder JM. LPS-stimulated human monocyte secrete, apart from neutrophil-activating peptide 1/IL-8, a second neutrophil-activating protein. NH-terminal amino acid sequence identity with melanoma growth stimulatory activity. *J Exp Med* 171: 1091-1100, 1990.
- [48] Schroder JM. IL-1 $\alpha$  or TNF $\alpha$  stimulate release of three NAP-1/IL-8-related neutrophil chemotactic proteins in human dermal fibroblasts. *J Immunol* 144: 2223-2232, 1990
- [49] Kojima T. GRO $\alpha$  mRNA is selectively overexpressed in psoriatic epidermis and is reduced by cyclosporin A in vivo, but not in cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 101: 767-772, 1993.
- [50] Hosaka S. Expression of the chemokine superfamily in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 97: 451-457, 1994.
- [51] Koch AE. Kunkel SL. A chemotactic cytokine for neutrophil in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 155: 3660-3666,1995
- [52] Fujisawa N. Hayashi S. Inhibition GRO $\alpha$ - induced human endothelial cell



proliferation by the chemokine inhibitor antileukinate. *Cytokine* 11: 231-238, 1999.

[53] Haghnegahdar H. Du J. The tumorigenic and angiogenic effects of MGSA/GRO protein in melanoma. *J Leukoc Biol* 67: 53-62, 2000.

[54] Mo JS. Matsukawa A. CXC chemokine GRO is essential for neutrophil infiltration in LPS-induced uveitis in rabbits. *Exp Eye Res* 70: 221-226, 2000.

[55] Luan J. Shattuck-Brandt R. Mechanism and biological significance of constitutive expression of MGSA/GRO chemokines in malignant melanoma tumor progression. *J Leukoc Biol* 62: 588-597, 1997

[56] Owen JD. Strieter R. Enhanced tumor-forming capacity for immortalized melanocytes expressing melanoma growth stimulatory activity / growth-regulated cytokine  $\beta$  and  $\beta$ . *Int J Cancer* 73: 94-103, 1997.

[57] Luan J. Shattuck-Brandt R. Mechanism and biological significance of constitutive expression of MGSA/GRO chemokines in malignant melanoma tumor progression. *J Leukoc Biol* 62: 588-597, 1997.

[58] Ito H. Yamamoto S. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the cDNA coding for rabbit tumor necrosis factor. *DNA*. 1986; 5: 149-56.

[59] Matsukawa A. Yoshimura T. Analysis of the inflammatory cytokine network among  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1b, IL-1 receptor antagonist, and IL-8 in LPS-induced rabbit arthritis. *Lab Invest* 1997; 76: 629-38.

[60] Matsukawa A. Yoshimura T. Neutrophil accumulation and activation by homologous IL-8 in rabbits. IL-8 induces destruction of cartilage and production of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in vivo. *J Immunol* 1995; 154: 5418-25.

[61] Matsukawa A. Ohkawara S. Production of IL-1 and IL-1 receptor antagonist and the pathological significance in LPS-induced arthritis in rabbits. *Exp Immunol* 1993; 93: 206-11.

[62] Goto F. Goto K. and Yoshinaga M. Biosynthesis of interleukin-1b at inflammatory site in rabbits: kinetics and producing cells. *Br J Exp Path* 1989; 70: 597-606.

[63] Flick DA. Gifford GE. Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J Immunol Methods* 1984; 68: 167-75.

[64] Sheridan BC. McIntyre RC. Neutrophil depletion attenuates endotoxin-induced dysfunction of cGMP-mediated pulmonary vasorelaxation. *Am J Physiol.* 1996; 271: 820-8.

[65] Sakuma T. Takahashi K. Ischemia-reperfusion lung injury in rabbits: mechanisms of injury and protection. *Am J Physiol* 1999; 276: 137-45.

[66] Rosenshein M S. Price T H. Neutropenia, inflammation and the kinetics of transfused neutrophils in rabbits. *J Clin Invest* 1979; 64: 580-5.

[67] Derynck R. Recombinant expression, biochemical characterization, and biological activities of the human MGSA/gro protein. *Biochemistry* 29: 10225-10233, 1990

[68] Hall DA, Beresford IJ, Browning C, and Giles H (1999). Signalling by CXC-chemokine receptors 1 and 2 expressed in CHO cells: a comparison of calcium mobilization, inhibition of adenylyl cyclase and stimulation of GTPgammaS binding induced by IL-8 and GROalpha. *Br J Pharmacol* 126:810-818.

[69] Richardson RM, Pridgen BC, Haribabu B, and Snyderman R (2000). Regulation of the human chemokine receptor CCR1. Cross-regulation by CXCR1 and CXCR2. *J Biol Chem* 275:9201-9208.

[70] Wuyts A, Proost P, Lenaerts JP, Ben-Baruch A, Van Damme J, and Wang JM (1998). Differential usage of the CXC chemokine receptors 1 and 2 by interleukin-8, granulocyte chemotactic protein-2 and epithelial-cell-derived neutrophil attractant-78. *Eur J Biochem* 255:67-73.

[71] Bauvois B, and Sanceau J (1992). Human U937 cell surface peptidase activities: characterization and degradative effect on tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Immunol*

22:923-930.

[72] Scuderi P, Nez PA, Duerr ML, Wong BJ, and Valdez CM (1991). Cathepsin-G and leukocyte elastase inactivate human tumor necrosis factor and lymphotoxin. *Cell Immunol* 135:299-313.

[73] van Kessel KP, and van Strijp JA (1991). Inactivation of recombinant human tumor necrosis factor-alpha by proteolytic enzymes released from stimulated human neutrophils. *J Immunol* 147:3862-3868.

[74] Jones SA, Wolf M, Qin S, Mackay CR, and Baggiolini M (1996). Different functions for the interleukin 8 receptors (IL-8R) of human neutrophil leukocytes: NADPH oxidase and phospholipase D are activated through IL-8R1 but not IL-8R2. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6682-6686.