

リンパ球の活性酸素産生

石井俊徳

Reactive Oxygen Species Production by Lymphocytes

Toshinori Ishii

Abstract Productivity and native production of reactive oxygen species (ROS) by peripheral blood lymphocyte subsets in healthy persons were examined with flow cytometry method. All of lymphocyte subsets showed productivity of ROS as they responded to stimulation with phorbol myristate acetate (PMA). When ROS were measured in non-stimulation state to detect native ROS production CD4+ and CD19+ lymphocytes produced relative high levels of ROS, but CD8+ ones produced relative low level of ROS, and CD56+ ones produced lowest level or little of ROS. Antibodies to CD4 and CD19 induced ROS production in lymphocyte subsets of CD4 and CD19 respectively. But neither antibody to CD8 nor to CD56 stimulated each lymphocyte subset. Both interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha enhanced ROS production in lymphocytes, but interferon-gamma hadn't stimulation ability. Stimulation with antibodies through cell adhesion molecules of CD15s, CD49d and CD62L also enhanced ROS production in lymphocytes. These studies demonstrate that state of ROS production is different in each lymphocyte subset and that the difference is due to divergence of response in each subset to stimulation through cell surface antigens such as cell adhesion molecules and cytokine receptors.

The roles of ROS produced in lymphocyte are thought to be related to cell proliferation and control of gene expression. Therefore study of ROS in lymphocyte subsets could be expected to elucidate pathogenesis of autoimmune diseases and lymphoid malignancies.

Key words: Reactive oxygen species (ROS), Lymphocyte subset, Cell adhesion molecule, Cytokine

はじめに

活性酸素 (ROS) とは、大気中の通常の酸素よりも活性な状態にある酸素種のことをいい、一般にスーパーオキシドアニオンラジカル (O_2^-), 過酸化水素 (H_2O_2), ヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$), 一重項酸素 (1O_2), 次亜塩素 OCl^- を指すが、広義には一酸化窒素 NO, 二酸化窒素 NO_2 , 脂質ペルオキシド LOOH なども含まれる。

生体にとって酸素は必要不可欠なものであり、生物の生命維持のためには酸素を利用した基質の酸化反応や酸素添加反応が重要である。しかし、その過程で生じる種々の活性酸素種やラジカル反応は、核酸や蛋白質の修飾、脂質の過酸化などを引き起こし、時には致命的な傷害を生体を与えかねない。そのため生体内には活性酸素の消去系が備えられ、活性酸素が生体に傷害を与えないように制御されている。

他方、好中球、好酸球、マクロファージなどは、

貪食した異物の殺菌のために積極的に活性酸素を産生利用しているし、近年、活性酸素の細胞増殖のセカンドメッセンジャーとしての役割や、遺伝子発現の制御への関与が示唆されている。したがって同じ血球であり、マクロファージや他の血球とも機能的に密接な関係を持つリンパ球について、活性酸素と機能との関係を明らかにすることは、アレルギー、自己免疫疾患、リンパ系悪性腫瘍等の発症機序の解明および治療法の開発のために大変重要なことと考えられる。今回私はリンパ球に活性酸素産生能があるか、実際に活性酸素を産生しているかについてリンパ球のサブセット別に測定し、機能との関連を考察したので、ここに報告する。

材料および方法

1. 採血

健康人17名 (男性2人, 女性15人, 年齢36.1±

14.7才)の肘正中静脈より、3.2%クエン酸ナトリウム入り真空採血管 (Becton-Dickinson, Lincoln Park, NJ, USA) に静脈血を採取した。

2. 血球の分離

a. 白血球分離 (Dextran 法)

リン酸緩衝食塩液 (PBS, pH7.4:CosmoBio, Tokyo, Japan) に DextranT500 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を6%の割合に溶解し (Dextran-PBS), 静脈血5mlと Dextran-PBS 1.5mlをよく混和後, 室温で30分静置し, 上層の白血球層を採取した。少量混入した赤血球は赤血球溶解剤 (NH_4Cl 154.4mM, KHCO_3 10.0mM, EDTANa, 0.08mM) で処理し除去した。すなわち白血球層を遠沈し, 沈渣に赤血球溶解液3mlを加え混和し, 室温で3分反応させた後, 直ちにPBSで洗浄した。

b. 顆粒球分離

Dextran 法で分離した白血球を Lymphocyte Separation Medium (LSM, 比重1.077:Organon, Durham, USA) に重層し, 室温で2,500rpm30分遠沈後, 沈渣を顆粒球として採取した。

c. 単核球分離

静脈血を同量の LSM に重層し, 室温で2,000rpm30分遠沈し, 血漿と LSM の中間層を単核球分画として採取した。

d. リンパ球分離

Carbonyl iron powder (Nakarai, Kyoto, Japan) を PBS に50mg/mlの濃度に懸濁し, 静脈血に1/10量加え, 恒温槽に37°C60分間10分毎に転倒攪拌しながら孵置した。次に同量の LSM に重層し, 室温で2,500rpm30分遠沈後, 中間層をリンパ球分画として採取した。リンパ球分画への単球の混入率は単球特異的な抗 CD14 抗体を用いて Flow cytometry (FCM) 法で測定すると, 1.8~2.6%であった。

e. 単球分離

LSM と PBS を0.783対0.214の割合に混和し, 比重1.063の単球分離液を作成した。LSM 2.5mlに単球分離液2.5mlを重層し, さらに静脈血5mlを重層して4°Cで600rpm30分遠沈した。最上層

の富血小板層を除去後さらに2,200rpmで60分遠沈し表層の単球層を採取した。

単球分画へのリンパ球の混入率は, FCM の Cytogram 上で分画測定すると, 約4%であった。

f. FCM による白血球の分画

FCM (Cytron: Ortho, Raritan, NJ, USA) は細胞にレーザー光を当て, その前方散乱光と側方散乱光の光強度により細胞の二次元散布図 (Cytogram) を描くことが出来る。

この Cytogram は細胞の大きさと内部構造特に核の複雑さ (陥凹, 分節) を反映したものである。したがってほとんどの顆粒球, 単球, リンパ球は, Cytogram 上で別々の細胞集団として識別できるので, その細胞集団領域を囲むことにより各血球を分画した。

3. 細胞数のカウント

分離した白血球の数の算定は, 核の形態が識別しやすいようにチュルク液を用いて染色し, ビュルケル-チュルク血球計算盤に入れ顕微鏡下で算定した。なお細胞の生存率は, トリパンブルーで染色し, dye exclusion 法でみると, ほぼ100%の生存率であった。

4. 細胞刺激剤

活性酸素測定時の細胞刺激剤として, Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA: Sigma, St. Louis, MO, USA) と3種類のサイトカイン Interleukine-1 β (IL-1 β : Endogen, Cambridge, MA, USA), Tumor necrosis factor- α (TNF- α : Genzyme, Cambridge, MA, USA), Interferon- γ (IFN- γ : Genzyme) そしてマイトジェン Phytohemagglutinin (PHA: Difco, Detroit, MI, USA) を用いた。PMA は Dimethyl sulfoxide (DMSO: Wako, Osaka, Japan) に250 μ l/mlの濃度に溶解し, PBS で25 μ l/mlに希釈し, 細胞浮遊液100 μ l当たり10 μ l使用した。

IL-1 β は100ng/mlの濃度で, TNF- α は2 \times 10⁵u/mlの濃度で, IFN- γ は1 \times 10⁵u/mlの濃度でそれぞれ細胞浮遊液100 μ l当たり10 μ l使用した。PHA は PBS で100倍希釈し細胞浮遊液100 μ

1当たり 10μ 1加えた。

5. モノクローナル抗体

リンパ球サブセットを識別する抗体として、抗CD2抗体 (Coulter, Hialeah, FL, USA), 抗CD3抗体 (Ortho), 抗CD4抗体 (Coulter), 抗CD8抗体 (Coulter), 抗CD56抗体 (Pharmingen, San Diego, CA, USA), 抗CD19抗体 (Pharmingen) を用いた。膜接着分子に対する抗体として、抗CD11a抗体 (Pharmingen), 抗CD29抗体 (Pharmingen), 抗CD49d抗体 (Pharmingen), 抗CD62L抗体 (Pharmingen), 抗CD15s抗体 (Pharmingen) を用いた。FCMでサブセットを分画選別する場合は、phycoerythrin (PE) 標識抗体を用いた。各抗体の使用量は製品に添付のマニュアルに従った。

6. 活性酸素の測定

a. FCM法

Bass等の方法¹⁾を修正して行った。細胞浮遊液 100μ 1に刺激剤を加え、恒温槽で 37°C 15分反応させた後、2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, $20\mu\text{M}$: Kodak, Rochester, N.Y., USA) 500μ 1を加えてさらに30分反応させた。試薬を洗浄除去後、細胞内の過酸化水素とエステラーゼの作用でDCFH-DAから変化したDCFの緑色蛍光をFCMで測定し、その平均蛍光強度(MFI)を活性酸素(過酸化水素)の相対的な量とした。リンパ球サブセットの活性酸素を測定する場合は、DCFH-DAと反応後のリンパ球をPE標識抗体と 4°C 30分反応させた後にFCMにかけ、まず赤色蛍光陽性リンパ球を選別後、その緑色蛍光を測定した。

b. Chemiluminescence (CL)法

細胞浮遊液 100μ 1に刺激剤、ペルオキシダーゼ ($0.1\mu\text{g}/\text{ml}$: Wako, Osaka, Japan) 5μ 1, ルミノール試薬 ($2\text{mg}/\text{ml}$, Sigma) 50μ 1を加えて混和し、活性酸素により励起されたルミノールより放出される化学発光(フォトン)をLuminescence Reader (Aloka, Tokyo, Japan)で10分間測定し、1,000細胞当たりのカウントを活性酸素量として表した。

7. 統計解析

実験結果は平均値±標準偏差で示した。2群間の平均値の差の検定は、Student's t-testを用いコンピュータ解析ソフトJMP (SAS, NC, USA)で計算し、 $p<0.05$ を有意と判定した。相関性の検定はピアソンの相関係数を用い、有意差検定では $p<0.05$ を有意と判定した。

結 果

1. リンパ球の活性酸素産生能

リンパ球の活性酸素産生能を確認するため、CL法とFCM法の二つの方法で活性酸素測定を行った。CL法では予めリンパ球、単球、顆粒球を分離してPMAで刺激した後測定を行った。その結果図1のように、各血球とも無刺激に比べて明らかに活性酸素が増加しており、リンパ球には活性酸素の産生能があると考えられる。しかしリンパ球の活性酸素産生量は単球、顆粒球と比較して非常に少ない(単純に比較して細胞1個当たりの量は42分の1から75分の1程度)ことがわかる。

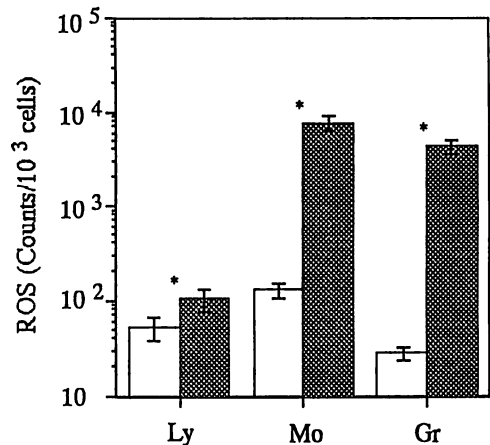


図1 Comparison of Producibility of ROS among lymphocytes (Ly), monocytes (Mo) and granulocytes (Gr). Each leukocyte fraction was incubated with PMA (■) or without stimulant (□) for 15 minutes at 37°C . Then produced ROS were measured by chemiluminescence method. Vertical bars indicate Mean±SD. Asterisks indicate significant differences by Student's t-test ($*p<0.05$).

次に FCM 法で測定を行った。白血球は分画せずに FCM に向け、レーザー光を照射された各白血球の前方散乱光と側方散乱光の二つのパラメーターで構成されるサイトグラム上でゲイティングをかけることによりリンパ球、単球、顆粒球を分画した。その結果図 2 のように、PMA 刺激すると各分画とも有意に活性酸素が増加した。異なる二つの方法でリンパ球が活性酸素を産生しているという結果がでたので、リンパ球に活性酸素産生能があることは間違いない。しかし FCM 法ではリンパ球の活性酸素の産生量は単球や顆粒球の 6 分の 1 から 15 分の 1 程度と CL 法に比較してかなり大きい結果となった。この原因は FCM の蛍光強度のゲインスケールが 1~255 チャンネルと幅が狭いため単球、顆粒球の蛍光強度が 255 で頭打ちとなり実際よりもかなり低く出たためと考えられる。また CL 法の活性酸素が単球>顆粒球であるのに対して、FCM 法では顆粒球>単球となっている。この原因は、両方法の測定する活性酸素種の違い (FCM 法は H_2O_2 だけなのに対して CL 法では O_2 , H_2O_2 , 1O_2 など多種の活性酸素を測定) や測定場所 (FCM 法は細胞質、CL 法は細胞外) が関係しているものと考えられる。今後リンパ球サブセットを測定するとすると、技術的な問題 (分離精度, 分離細胞数等) から FCM 法での測定が望

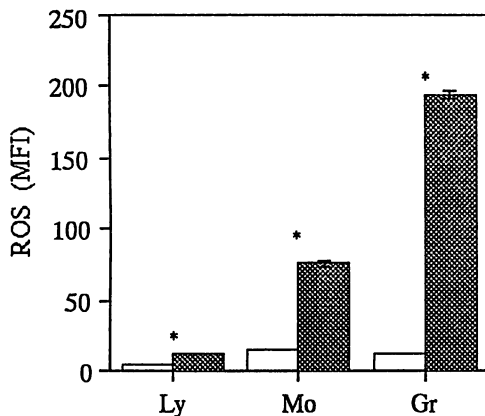


図 2 Comparison of producibility of ROS by FCM method among lymphocytes, monocytes and granulocytes. Each symbol means the same as one in Fig.1.

ましい。測定対象がリンパ球のみの場合、蛍光ゲインの幅の狭さは問題にならない。

FCM 法では単球・顆粒球が産生した活性酸素がリンパ球に侵入してきたのではないかと疑問もある。そこでリンパ球分画のみを分離し、PMA 刺激の他に T 細胞特異的なマイトジェン PHA と抗 CD3 抗体による刺激で活性酸素を測定してみた (図 3)。その結果 PMA および抗 CD3 抗体刺激では有意の増加がみられ、リンパ球自身

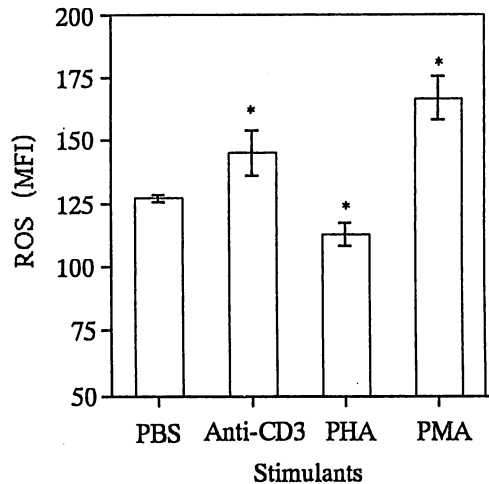


図 3 Influence of various stimulants on ROS production of lymphocytes. Lymphocytes purified by carbonyl iron method were stimulated with anti-CD3 antibody, PHA or PMA. ROS were measured by FCM method.

が活性酸素産生能を有し、FCM 法で測定できることは明らかである。しかし PHA 刺激ではむしろ減少している。Ulmer ら²⁾は、PHA による T 細胞の刺激に単球は必要ないが、残存する単球の数によって反応が亢進したり抑制されたりすると報告しているので、図 3 の結果はわずかに残存する単球によってリンパ球の活性酸素産生が抑制された可能性が強い。

2. リンパ球サブセットの活性酸素産生

リンパ球はそのサブセットにより機能が異なるので、活性酸素の産生能や産生状態もサブセットにより異なることが考えられる。そこでまず生体内に出来るだけ近い状態の活性酸素を測定

してみた。静脈血より単核球を分離し、無刺激の状態ではDCFHDAを標識し、低温下でサブセットを識別するPE標識抗体と反応させた。次にFCMで赤色蛍光による識別でリンパ球サブセットを分離し、その活性酸素を測定した。その結果図4にみられるように、活性酸素はCD4+および

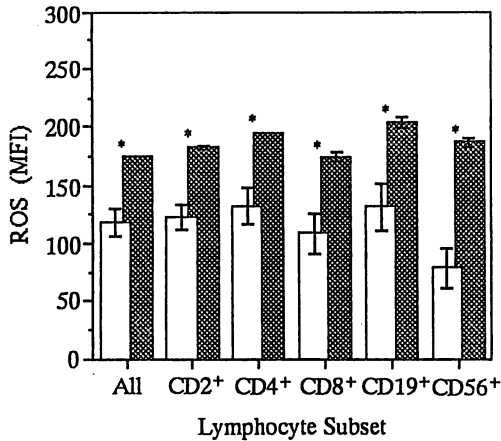


図4 ROS production of lymphocyte subsets. Native lymphocytes (□) or lymphocytes stimulated with PMA (■) were classified into subsets with patterns of phycoerythrin conjugated antibody staining.

びCD19+リンパ球で全リンパ球よりも高く、CD8+リンパ球とCD56+リンパ球で低く、特にCD56+リンパ球のみが他のサブセットに対して有意に低下していた。しかしPMAで刺激したリンパ球を同様の方法でサブセット別に測定してみると、すべてのサブセットで無刺激に比べ活性酸素は明らかに高くなっており、CD56+リンパ球を含め全リンパ球が活性酸素産生能を有していることは間違いない。ただしサブセット間で産生能力に差があり、CD8+リンパ球が相対的に低くなっている。したがってCD56+リンパ球以外のリンパ球では、生体内でその産生能力に応じた活性酸素の産生が行われ、何らかのリンパ球機能に関与していると思われるが、CD56+リンパ球のみは能力と実際の産生に解離がみられ、大変興味深い。

3. 加齢とリンパ球活性酸素

リンパ球は加齢とともにそのサブセット構成が変化すること、また数十年という長命リンパ球が存在することから、年齢とリンパ球活性酸素について検討した。しかし図5にみられるように $r=-0.07$ と加齢に伴う活性酸素の変化はみられなかった。加齢とCD4/CD8比の相関は $r=0.22$ 、活

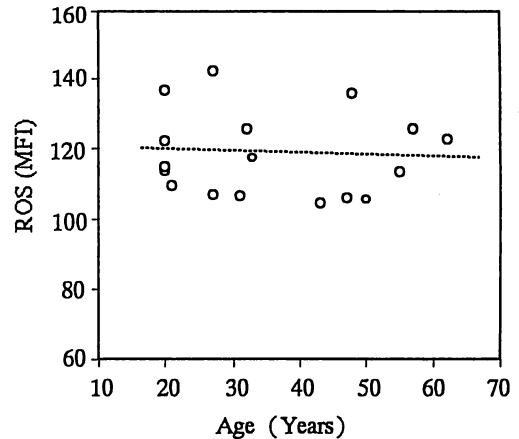


図5 Age related change of ROS in lymphocytes. A broken line indicates correlation line.

性酸素とCD4/CD8は $r=0.19$ とやはり有意の相関はなかった。加齢とともにCD4+リンパ球数とCD56+リンパ球数はやや増加、CD8+リンパ球数とCD19+リンパ球数はやや減少するので、全体的には活性酸素はあまり変化しないものと考えられる。リンパ球サブセット別の加齢と活性酸素との関係を見ると、CD4+リンパ球とCD56+リンパ球が加齢とともに活性酸素はやや増加し、CD8+リンパ球では減少、CD19+リンパ球は変化なしだった。

4. サブセットを識別する抗体によるリンパ球刺激の活性酸素への影響

活性酸素産生能は全てのリンパ球が有しているにも関わらず、非刺激時のリンパ球の活性酸素はサブセットによって異なる。これは個々のサブセットに特異的な刺激によってもたらされているものと考えられる。そこで各サブセットを特徴づけている膜抗原を介した刺激により、そのサブセットの活性酸素がどのように変化するかを、膜抗原に

対する抗体を使って検討した。抗体とリンパ球を37°Cで10分インキュベート後DCFHDAをラベルして、FCMで抗体で標識したリンパ球サブセットを選別して活性酸素を測定した。図6にみられるように、CD4⁺リンパ球とCD19⁺リンパ球では活性酸素の有意の増加がみられたが、CD8⁺リンパ球とCD56⁺リンパ球では増加はみられなかった。またCD2⁺リンパ球やCD3⁺リンパ球を介した刺激も活性酸素を高めている。CD2⁺リンパ球とCD3⁺リンパ球の差はCD56⁺リンパ球が含まれているか否かの差と思われる。CD4⁺リンパ球、CD19⁺リンパ球とCD8⁺リンパ球、CD56⁺リンパ球の違いは、前者がMHC Class IIを介した反応に関与しているのに対して、後者はMHC Class Iが機能に密接に関与している点に関係しているものと推測される。

5. 活性化リンパ球の活性酸素

MHC Class II 抗原は、T細胞の場合活性化細胞に発現するので、リンパ球の活性化と活性酸素との関係について調べてみた。T細胞の活性化のマーカーとしてはCD25 (IL-2R α)を、B細胞の活性化のマーカーとしてはCD80 (B7-1)を用い

た。厳密にはCD25はB細胞の一部にも、またCD80はT細胞の一部にも発現しているの、どちらも活性化リンパ球のマーカーといった方が良いかもしれない。図7はT細胞全体(CD2⁺)と活性化T細胞、B細胞全体(CD19⁺)と活性化B細胞を比較したものであるが、T細胞もB細胞も活性化細胞が有意に活性酸素が高くなっている。細胞の活性化は機能発現に密接に関係しているので、活性酸素はリンパ球機能に関わっているものと推測される。

6. サイトカイン刺激によるリンパ球活性酸素の変化

リンパ球の機能発現には種々のサイトカインが関与しているので、代表的炎症性サイトカインであるIL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ について、リンパ球活性酸素に与える影響について調べてみた。リンパ球をIL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ でそれぞれ10分間刺激し、活性酸素を測定した。コントロールが111.1 \pm 3.3に対して、IL-1 β では130.1 \pm 0.9、TNF- α では136.5 \pm 2.5とどちらも有意に活性酸素が高まったのに対して、IFN- γ では117.3 \pm 1.3とコントロールと有意の差がなかった。この場

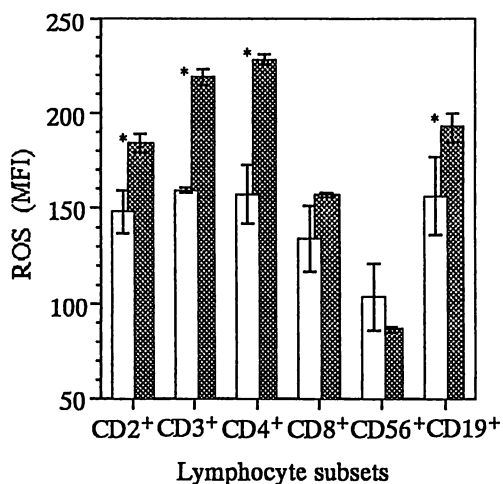


図6 Comparison of ROS production between in lymphocytes stimulated with antibodies against lymphocyte subset antigens (▨) and in native lymphocytes (□).

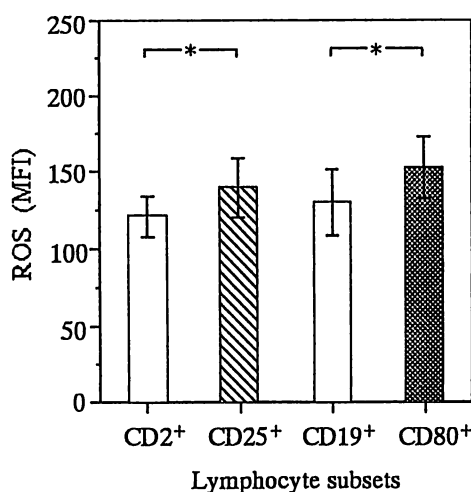


図7 ROS production in activated T cells and activated B cells. CD25⁺ lymphocytes (▨) are regarded as activated T cells. CD80⁺ lymphocytes (▤) are regarded as activated B cells.

合リンパ球サブセットの活性酸素は測定していないが、その理由としてはIL-1 β やTNF- α に対するレセプターはT細胞、B細胞いずれにも存在するとされているので、サブセット間の差はあまりないのではないかと考えたからである。IFN- γ の場合レセプターはB細胞に発現しているが、T細胞には発現していない。測定に用いたリンパ球の分画はT細胞は89%に対してB細胞が7%なので、IFN- γ の値がコントロールよりもわずかながら高いのは、B細胞の活性酸素が高いことが反映されている可能性がある。

7. 細胞接着分子を介した刺激によるリンパ球活性酸素の変化

リンパ球は細胞接着分子CD11a, CD29/CD49d, CD15s, CD62L等を介して血管内皮細胞に接着し活性化され、一部は血管外へ遊走する。そこで内皮細胞への接着の代わりに細胞接着分子に対する抗体を結合させ、その刺激によるリンパ球の活性酸素の変化をみた。方法はサブセット抗体の場合と同じである。その結果、コントロールが143 \pm 2.5に対して、抗CD49d抗体161.7 \pm 2.7、抗CD15s抗体164.1 \pm 7.3、抗CD62L抗体172.2 \pm 4.7と明らかに活性酸素が増加していたが、抗CD11a抗体と抗CD29抗体ではそれぞれ140.6 \pm 4.2、138.8 \pm 0.6と増加はみられなかった。CD15sとCD62Lは接着の初期ローリングに関与する接着分子であり、CD11aとCD29は接着の後期に関与しており、CD29とCD49dは複合体(VLA-4)を形成している。したがってリンパ球の内皮細胞との接着では、初期後期を通して刺激により活性酸素が産生されるものと考えられる。

考 察

リンパ球の活性酸素の産生機構、産生される活性酸素種およびその役割について考察してみた。好中球や好酸球の場合、液性刺激により膜のNADPH-フラビン酵素-チトクローム系でO₂⁻が生成され膜外に放出される。固形異物(細菌など)の場合、食胞内にもO₂⁻が放出される。

ただしO₂⁻そのものは反応性は低いので組織傷害因子とはなりにくく、O₂⁻の不均化反応で生ずるH₂O₂およびH₂O₂と2価鉄イオン間とのフェントン反応で生じる \cdot OHが組織傷害に重要である。好酸球の場合、H₂O₂とCl⁻よりHOClや¹O₂も生じる。赤血球の場合、ヘモグロビンに結合している酸素はO₂⁻に近い状態にあり、そのまま解離するとメトヘモグロビン(metHb)となる。正常の赤血球中のヘモグロビンの約3~4%がmetHbとなっており、これと当モルのO₂⁻が生じている³⁾。ただし、metHbはmetHbレダクターゼの働きで酸化ヘモグロビンに変換され、O₂⁻もスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)や還元型グルタチオンなどの抗酸化防止機構により分解される。

B細胞は細胞表層にチトクロムb₅₅₈をもち、好中球と同様にO₂⁻を産生する能力を持っている。しかしその産生量は好中球より二桁程低いので、B細胞のO₂⁻は好中球とは異なる役割を持っているものと思われる。B細胞におけるチトクロムb₅₅₈の発現様式はプレプレB細胞やプレB細胞には発現せず、成熟B細胞になって初めて発現し、形質細胞になると消失する⁴⁾。成熟B細胞は抗原提示能を持っており、一部はメモリー細胞としての機能もあるので、O₂⁻産生はこれらの機能と関係していることが推察される。

T細胞の場合、チトクロムb₅₅₈等のrespiratory burstに関係した膜蛋白は持っていない⁵⁾。しかし、PMA刺激リンパ球においてelectron paramagnetic resonance(EPR)法およびspin trapping法で \cdot OHが検出され、この \cdot OHは産生されたO₂⁻由来のものである⁶⁾という報告、末梢血T細胞をPHAで刺激すると活性酸素が産生されるという報告⁷⁾、さらにHIV-1とマイコプラズマが感染したヒトT細胞株からH₂O₂が遊離されるという報告⁸⁾があるので、T細胞もB細胞と同様にO₂⁻を産生するものと推測される。

本研究でCD2, CD3, CD4, CD8に対する抗体で刺激すると、その膜抗原を持つリンパ球の活性酸素産生が亢進するという結果を得た。CD4と

CD8はチロシンキナーゼ活性を持つ p56^{lck} と会合しており⁹⁾, T細胞レセプター (TCR)/CD3複合体はsrcファミリーチロシンキナーゼ fyn と会合している¹⁰⁾. またCD2を介する情報はそれ単独あるいはTCR/CD3複合体を介した情報と連動してT細胞を活性化あるいは抑制的に働く¹¹⁾ので, これらチロシンキナーゼの活性化に連動した活性酸素産生機序によりT細胞の活性酸素は産生されているものと推測される. その候補としてあげられるのは, ミトコンドリア・マイクロゾーム電子伝達系, キサンチンオキシダーゼ系, リポオキシゲナーゼ系, サイクロオキシゲナーゼ系である.

Natural killer (NK) 細胞は抗原感作なしに標的細胞を傷害できる CD2+CD3-CD16+CD56+リンパ球であり, 第一線の免疫監視機構として重要な役割を果たしている. NK細胞の標的細胞認識には正の制御機構と負の制御機構があること¹²⁾が, 最近明らかになってきた. 正の制御機構については, 標的細胞上にNK細胞が認識するリガンド (NKTS) が, またNK細胞にはNKTSを認識するレセプター (NKTSR) があると推測されており, それぞれについていくつかの候補分子が提唱されている. またサイトカイン活性化NK (LAK) 細胞については, 最近LAK細胞のLFA-1と標的細胞の凝集ICAM-2との結合が正の制御機構であるという報告¹³⁾が出された. 負の制御機構については, 標的細胞上のMHC class I分子とそれを認識するレセプター (KIR) が想定され, KIRについて解析が進められている. CD56とNK細胞制御機構の関係については明らかでないが, 制御シグナルの伝達に関与していることが示唆されている¹⁴⁾. 今回の抗CD56抗体による刺激でNK細胞の活性酸素が低下するという結果と, Bruneらの単球由来の活性酸素はNK細胞の標的細胞傷害を阻止するという報告¹⁵⁾を考え合わせると, CD56を介した刺激は, 活性酸素産生を抑制することによりNK細胞の正の制御となりうることを, 言葉を換えれば活性酸素は負のシグナルであることを示唆している. CD56とな

らびNK細胞マーカーであるCD16については, CD3とおよびLckチロシンキナーゼと会合して活性化刺激を細胞内に伝達する分子であるとの報告¹⁶⁾があるので, 今後活性酸素との関係を検討する必要がある.

CD25の発現には抗原によるTCRを介する一次刺激と抗原提示細胞から供給される二次刺激が必要である. そのCD25+細胞で活性酸素が高いという結果は, TCRと複合体を形成するCD3に対する抗体および二次刺激に関与するCD2に対する抗体で活性酸素産生が亢進する結果と考え合わせると, 同じシグナルがCD25の発現と活性酸素産生をもたらすことを示している.

CD80 (B7-1)の発現はB細胞抗原レセプター (BCR) やMHC class IIのクロスリンク, CD40とCD40Lの結合によって誘導される¹⁷⁾. BCRを介した刺激はprotein kinase C (PKC) やprotein tyrosine kinase (PTK) を活性化する¹⁸⁾.

またPKCの活性化により活性酸素産生が亢進することはNADPH-チトクローム系でよく知られている. したがってB細胞の場合, 同じ刺激がCD80の発現と活性酸素産生をもたらすという推測が成り立つ.

IL-1 β に対するレセプター (IL-1R) にはtype Iとtype IIの2種類あるが, 細胞内へのシグナル伝達は専らtype Iが担っている. T, Bともに両タイプとも発現しているが, T細胞はtype Iの発現の方が多く, B細胞はtype IIの発現の方が多い. IL-1による活性酸素産生刺激には, シグナル伝達のセカンドメッセンジャーとして関与しているPKCとPKAが関係している¹⁹⁾ものと推測される. TNF- α に対するレセプターもTNF-R55とTNF-R75の2種類あり, R55が広く分布するのに対し, R75は活性化TやB細胞に強く発現している. TNF- α による活性酸素産生刺激は, ミトコンドリア電子伝達系の活性化によるもの²⁰⁾といわれている. IFN- γ レセプター (IFN- γ R) はB細胞に発現しているが, T細胞には発現していない. また好中球の場合, IFN- γ による活性

化には数時間以上の時間が必要とされ²¹⁾、本研究ではリンパ球という違いはあるが10分間という刺激時間は短すぎた可能性がある。

CD49/CD29 (VLA蛋白) はインテグリンファミリーに属し、抗原レセプターやサイトカインと同様に免疫系の活性化に重要であるとされている。T細胞を抗CD49d/CD29抗体で刺激すると105kdのチロシン磷酸化蛋白が生じる²²⁾。CD49/CD29を介してT細胞が活性化される事実はCD49/CD29の発現がmemory CD4細胞で多いことから、in vivoにおいて、同じ抗原量でもmemory CD4細胞がより活性化されやすいことを示唆している。今回の我々の実験では抗CD49d抗体と抗CD29抗体で活性化に相違がみられたのは、CD49d/CD29 (VLA-4) にリガンドが結合した場合、CD49d ($\alpha 4$) を通して活性化シグナルが細胞内に伝えられる可能性を示唆している。

CD11a (LFA-1 α 鎖) 分子それ自身はシグナル伝達に關するキナーゼドメインなどを細胞質部分に持たないが、テーリンなどのアクチン結合蛋白を介して細胞骨格と結合し、シグナル(T細胞活性化のsecond signalなど)を伝達している²³⁾。またLFA-1は通常は細胞接着能を持たず、CD28やPDGFを介したチロシンキナーゼの活性化によって、またケモカインによるG蛋白を介したPI3キナーゼの活性化の結果LFA-1が活性型となり細胞接着が可能となる²⁴⁾。したがって非活性型のLFA-1に抗体(活性型LFA-1には結合しない)を結合させて刺激しても有効な活性化は生じない可能性がある。今回の抗CD11a抗体で活性酸素産生が亢進しないという結果はこれを支持している。ただしLAK細胞(IL-2により活性化されたNK細胞)ではLFA-1 β 鎖にはシグナル伝達物質(PLC- γ , PI3キナーゼ, GAPなど)が会合しているので、PKCの活性化により活性酸素が増加する可能性がある。

CD15sと活性酸素に関しては、活性化血小板膜上のP-セレクトイン(CD62P)と好中球や単球膜上のシアリルルイスX糖鎖(SLe^x;CD15s)との

結合によりO₂⁻産生量が増加する²⁵⁾という報告がある。したがって本研究のように抗体によるCD15sのクロスリンクがリンパ球の活性酸素産生刺激のシグナルとなることは十分考えられる。しかしCD15sがどのような活性経路に繋がっているのかは不明である。

L-selectin (CD62L) については、Brennerら²⁶⁾がJurkat cellや末梢血リンパ球を抗体刺激する実験系でCD62Lを介した刺激はチロシンキナーゼp56^{lck}を活性化し、さらにRas経路を活性化し、O₂⁻の産生に至ることを報告している。測定活性酸素がO₂⁻とH₂O₂の違いはあるものの、この結果は本研究と一致するものである。

以上種々の外的刺激によるリンパ球活性酸素産生機序について考察してみたが、次に産生された活性酸素の機能について考えてみる。

低レベルの活性酸素がDNAの転写制御に関わっていることを示唆する報告がある。DNAからRNAを合成する転写過程には、転写酵素RNAポリメラーゼ以外に転写因子と呼ばれる蛋白質が転写の調節に關与している。免疫グロブリン κ 鎖(Ig κ)遺伝子の転写因子として発見されたNF- κ BはTNF- α により活性化されるが、Schreckら²⁷⁾によれば、活性酸素はTNF- α 刺激後のセカンドメッセンジャー候補の一つとされ、PKCを介さない経路でNF- κ Bの活性化に關与している。またGoldstoneら²⁸⁾は、活性酸素が転写因子NF- κ BとAP-1を標的分子としたcell cycle entryの制御を行っていることを報告している。

チロシンリン酸化、脱リン酸化は細胞の癌化機転やリンパ球系細胞の活性化、増殖、分化において重要な役割を持っている。淀井ら²⁹⁾は酸化ストレスのチロシンリン酸化への影響をH₂O₂と培養ヒト末梢T細胞を使って検討して、H₂O₂は用量依存性にsrcファミリーチロシンキナーゼLckのリン酸化と活性亢進を引き起こすこと、およびこのリン酸化誘導には細胞内蛋白質やグルタチオンなどに含まれるシステイン残基の-SH基の酸化が重要な役割を果たしていることを報告している。

活性酸素は細胞接着分子の発現にも關与してい

る。Yoshidaら³⁰⁾は低酸素-再酸素化による好中球内皮接着反応について検討し、血管内皮より産生されるH₂O₂は直接好中球を活性化する経路および内皮細胞の血小板活性化因子(PAF)産生を介する経路により、好中球上の接着分子CD11b/CD18の発現を増強すると報告している。またはH₂O₂は内皮細胞に作用してP-セレクチンを発現させることも報告³¹⁾されている。

サイトカイン発現と活性酸素の関係では、IL-8が注目されている。IL-8はその強い白血球走化性活性化因子のため、白血球の組織浸潤に中心的役割を果たしている。Horiguchiら³²⁾によると、カドミウムはヒト末梢血単球にIL-8産生と活性酸素産生を引き起こすが、活性酸素消去剤NACによりIL-8産生抑制、活性酸素産生抑制に加えてIL-8 mRNAの発現も抑制される。またヒト全血のLPS刺激によるIL-8産生はDMSO等のヒドロキシルラジカル消去剤により抑制され、IL-8 mRNAの発現も転写レベルで抑制される。そしてその抑制はTNF, IL-6, IL-1 β には観察されず、IL-8 mRNAに選択的である³³⁾。

以上のように活性酸素は多方面にわたって細胞内代謝に係わっていると考えられるが、まだ不明な点も多い。今後活性酸素の産生系、機能およびスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)などの活性酸素制御系を含めた幅広い研究が必要と考えられる。

おわりに

活性酸素が細胞増殖のセカンドメッセンジャーとして作用することや、遺伝子発現の制御に関与することが最近明らかになりつつある。リンパ球はT細胞、B細胞ともに活性酸素を産生しているため、活性酸素の制御機構の異常が自己免疫疾患やリンパ系腫瘍の発生に関係している可能性は十分にある。今後産生系だけでなく、SOD、グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)、カタラーゼなどの抗酸化酵素群も含めた活性酸素の細胞内動態を明らかにすることにより、これらの疾患の発

症機序の解明ならびに治療法の開発につながるものが期待される。

謝 辞

稿を終えるにあたり、活性酸素の測定に協力していただいた板倉あゆみさん、酒匂真紀さん、田口みゆきさん、野村真実さん、ならびに検体を提供していただいた教官、学生の皆さんに深謝致します。

本研究の一部は平成8年度文部省科学研究費補助金(基盤研究C:課題番号08672645)の援助を受けて行われた。

文 献

1. Bass, D.A., et al.: Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils. *J. Immunol.* 130:1910-1917, 1983.
2. Ulmer, A.J., et al.: Response of human T lymphocytes to phytohemagglutinin (PHA) after sequential depletion of monocytes, HLD-DR+, Leu11a+, and Leu7+ cells. *Immunobiol.* 170:419-433, 1985.
3. Eder, H., et al.: Congenital methemoglobinemia. :A clinical and biochemical study of a case. *J. Clin. Invest.*, 28:265-272, 1949.
4. Kobayashi, S., et al.: Occurrence of cytochrome b558 in B-cell lineage of human lymphocytes. *Blood* 75:458-461, 1990.
5. Kobayashi, S., et al.: Characterization of the superoxide-generating system in human peripheral lymphocytes and lymphoid cell lines. *J. Biochem.* 117:758-765, 1995.
6. Zhao, B. L., et al.: Lymphocytes can produce respiratory burst and oxygen radicals as polymorphonuclear leukocytes. *Cell Biophys.* 17:205-211, 1990.
7. Vint, I. A., et al.: The gold anti-rheumatic drug auranofin governs T cell activation by enhancing oxygen free radical production. *Eur. J. Immunol.* 24:1961-1965, 1994.
8. Chochola, J., et al.: Release of hydrogen peroxide from human T cell lines and normal lymphocytes co-infected with HIV-1 and mycoplasma. *Free Radical Research* 23:197-212, 1995.
9. Veillette, A., et al.: The CD4 and CD8 T cell

- surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell* 55:301-308, 1988.
10. Samelson, L. B., et al.: Association of the fyn protein-tyrosine kinase with the T-cell antigen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4358-4362, 1990.
 11. Kabelitz, D.: Do CD2 and CD3-TCR T-cell activation pathways function independently? *Immunol. Today* 11:44-47, 1990.
 12. 佐藤昇志他: MHCクラス I 分子とナチュラルキラー (NK) 細胞感受性の制御機構・*臨床免疫* 28:205-213, 1996
 13. Helander, T. S., et al.: ICAM-2 redistributed by ezrin as a target for killer cells. *Nature* 382:265-268, 1996.
 14. 内田温土他: CD 分子-マーカーから機能への展開、CD56とCD57. *Med. Immunol.* 24:491-495, 1992.
 15. Brune, M., et al.: NK cell-mediated killing of AML blasts: role of histamine, monocytes and reactive oxygen metabolites. *Eur. J. Immunol.* 57:312-319, 1996.
 16. Moretta, L., et al.: Human natural killer cells; Origin, clonality, specificity, and receptors. *Adv. Immunol.* 55:341-380, 1994.
 17. Ranheim, E. A., et al.: Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40- dependent signal. *J. Exp. Med.* 177:925-935, 1993.
 18. 大塚一郎他: 細胞表面分子を介する B 細胞の活性化, *臨床免疫* 26:38-43, 1994.
 19. 白川文彦他: IL-1レセプター. *臨床免疫* 23:1373-1382, 1991.
 20. 山崎正利: サイトカインとそのレセプター; TNF- α . *臨床免疫* 27:259-268, 1995.
 21. Berton, G., Zeni, L., et al.: Gamma interferon is able to enhance the oxidative metabolism of human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138:1276-1282, 1986.
 22. Nojima, Y., et al.: Ligation of VLA-4 on T cells stimulates tyrosine phosphorylation of a 105-KD protein. *J. Exp. Med.* 175:1045-1053, 1992.
 23. Kishimoto, T. K., et al.: The leukocyte integrins. *Adv. Immunol.* 46:149-182, 1989.
 24. Lub, M., et al.: Ins and outs of LFA-1. *Immunol. Today* 16:479-483, 1995.
 25. Nagata, K., et al.: Activated platelets induce superoxide anion release by monocytes and neutrophils through p-selectin (CD62). *J. Immunol.* 151:3267-3273, 1993.
 26. Brenner, B., et al.: L-selectin activates the Ras pathway via the tyrosine kinase p56lck. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:15376-15381, 1996.
 27. Schreck, R., et al.: Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *EMBOJ.* 10:2247-2258, 1991.
 28. Goldstone, S. D., et al.: Redox regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway during lymphocyte activation. *Biochim. Biophys. Acta* 1355:353-360, 1997.
 29. Nakamura, K., et al.: Redox regulation of a src family protein tyrosine kinase P56^{lck} in T cells. *Oncogene* 8:3133-3139, 1993.
 30. Yoshida, N., et al.: Anoxia/reoxygenation-induced neutrophil adherence to cultured endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 262:H1891-H1898, 1992.
 31. Patel, K. D., et al.: Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP-140 and bind neutrophils. *J. Cell Biol.* 112:749-759, 1991.
 32. Horiguchi, H., et al.: Cadmium induces interleukin-8 production in human peripheral blood mononuclear cells with the concomitant generation of superoxide radicals. *Lymphokine and Cytokine Research* 12:421-428, 1993.
 33. deForge, L.E., et al.: Oxygen radical scavengers selectively inhibit interleukin-8 production in human whole blood. *J. Clin. Invest.* 90:2123-2129, 1992.