

〈原著〉

好中球活性化に対するMPO放出反応について

太田 安彦、徳永 賢治

MPO release reaction against activated neutrophils

Yasuhiko Ohta and Kenji Tokunaga

Summary Against infection, neutrophils form phagosomes in which microorganisms are absorbed by phagocytosis. Then, from the azurophilic granules of neutrophils, Myeloperoxidase (MPO) and granule components are released. In this process, it is suspected that the activation of the NADPH oxidase and de-granulation along with the formation of phagosomes are related to the release of MPO. However, the relationships between the activation of neutrophils and MPO release have not been clarified. Thus, the authors examined the mechanism of the signal transmission at the time of neutrophils activation and MPO release.

Concerning the MPO release, fMLP stimulation did not show significant inhibition up to high concentration level by Genistain and GF109203X. The PMA stimulation showed significant concentration-dependent inhibition reaction by GF109203X. These results indicate that the transmission of PKC stimulation acts on the release of MPO.

Concerning the mechanism of the MPO release, the MPO expression was examined using flow cytometry with the MPO-labeled antibody. The MPO expression significantly increased with the PMO stimulation, while it did not show increase with the fMLP stimulation. The MPO expression with the PMO stimulation was significantly inhibited by GF109203X.

These results indicate that the MPO release occurs in the following order: activation of neutrophils by signal transmission of PKC, de-granulation, release of MPO to phagolysosome, expression in cell membrane and release of MPO outside of the cell.

Key words: Neutrophil, NADPH oxidase, Myeloperoxidase(MPO),
Phorbol myristate acetate (PMA), Flow cytometer

I. 序言

Myeloperoxidase (MPO) は、2 個のサブユニットから成り鉄 2 原子を含む酵素である。分子

量は約140kDa、好中球のアズール顆粒に存在し、殺菌作用に重要な役割を果たしている。感染に対して、感染病巣に到達した好中球は、細菌を貪食し食胞を形成する。次いでアズール顆

香川県立保健医療大学 臨床検査学科
761-0123 香川県高松市牟礼町原281-1

受領日 平成24年12月10日

受理日 平成24年12月17日

Department of Clinical Medical Technology, Kagawa
Prefectural College of Health Science

281-1 Hara, Mure-cho, Takamatu-shi, Kagawa 761-0123,

Japan

粒と融合して生じたファゴリソーム内にMPOを放出する。その際、NADPH oxidaseの活性化に伴うO₂の産生、さらに不均化反応より生成したH₂O₂はMPOの作用でHOClを産生して殺菌作用に利用される。また、種々の炎症時に組織に浸潤し、組織内にMPOが検出されている。

炎症性刺激による好中球活性化について、著者らは、RA患者の関節液中の好中球は末梢血中よりも活性酸素産生能は高値であることを報告した¹⁾。さらに、RA患者の関節液MPO活性は変形関節炎患者よりも有意に高値であった²⁾。この点についてDangら³⁾はRA患者の関節液が好中球を活性化することを報告している。これらの報告から炎症反応による好中球活性化は、MPOを細胞外に放出することを推測させる。

血中に放出されたMPOと病態との関連性について、血管炎患者の血中には高いMPO活性と活性化された好中球が認められている⁴⁾。また、急性冠症候群における胸痛患者の心筋梗塞リスクの因子として血漿MPO測定の有用性を評価する報告がある⁵⁾。これらの報告は、好中球の活性化によるMPO放出、MPOから派生する活性酸素による酸化ストレスが細胞障害に関与することを示している。しかしながらMPO放出の機構は十分に解明されていない。今回、好中球活性化とMPO放出の機構について研究した結果を報告する。

Ⅱ. 方法

1. 好中球活性化に対するMPO放出反応の検討

好中球をfMLP、PMA及びTNF- α により活性化して、その上清中に放出されたMPOを測定した。測定はELISA法を原理とする血清MPO測定キット（日本老化制御研究所）を使用した。

1) 試薬

Ca²⁺-free KRP緩衝液は、0.1 mol/lリン酸緩衝液(pH 7.4) 21容、0.15 mol/l NaCl 100容、0.154 mol/l KCl 4容、0.154 mol/l MgCl₂ 1容の割合で混合し、使用前に調整した。刺激物質はPMA、fMLP共にエタノールで10 mmol/lに溶解し、使用時に0.5%エタノールCa²⁺-free KRP緩衝液を用いて、0.2 mmol/l PMA、0.2 mmol/l fMLPを作製した。

TNF- α はCa²⁺-free KRP緩衝液で5 μ g/mlに溶解し、使用時にCa²⁺-free KRP緩衝液を用いて、10

ng/mlとした。また、グルコースは精製水に溶解し、1 mol/l溶液を作製した。

PKC阻害剤GF109203Xの調整は、0.5%エタノールCa²⁺-free KRP緩衝液で0.25 mmol/lに溶解し、使用時に0.5%エタノールCa²⁺-free KRP緩衝液を用いて、0.5 μ mol/l、2 μ mol/l、5 μ mol/lの溶液を作成した。チロシンキナーゼ阻害剤ゲニステインの調整は、エタノールで5 mmol/lに溶解し、使用時にエタノールを用いて50 μ mol/l、100 μ mol/l、200 μ mol/l溶液とした。

2) 試料

プラスチック試験管にモノポリ分離剤3 mlを分注し、ヘパリン採血管に採血したヒト全血3.5 mlを重層した。次いで400 x g、20分間遠心後、血漿をパスツールピペットで除き、フラクション2（好中球）を別の試験管に移した。試験管にCa²⁺-free KRP緩衝液5 mlを加えて混和し、400 x g、5分間遠心後、上清をアスピレータで除いた。次いでCa²⁺-free KRP緩衝液5 mlを加え、400 x g、5分間遠心した。赤血球が多い場合、次の操作を行った。0.033 mol/l NaCl溶液を5 ml加え混和、30秒後に0.27 mol/l NaCl溶液を5 ml加え混和し、400 x g、5分間遠心する。上清を除きCa²⁺-free KRP緩衝液を2.5 ml加え、150 x g、5分間遠心後、アスピレータで上清を除き、Ca²⁺-free KRP緩衝液を加え、好中球液を作成した。

3) MPO測定方法

試験管にKRP緩衝液260 μ l、5 mol/lグルコース5 μ l、好中球20 μ l (4 x 10⁵)を加え混和後、37°C、5分間インキュベーションし、氷中に5分間静置して反応を停止させた。反応停止後1,500 rpm、5分間遠心、上清を採取し、キット付属のSample Bufferで50倍希釈し、これを試料としてキットの方法に準じてMPO量を測定した。

PMA、fMLP刺激に対するゲニステイン、GF109203Xの影響については、試験管にKRP緩衝液230 μ l、1 mol/lグルコース5 μ l、好中球20 μ l (4 x 10⁵)、ゲニステイン、GF109203X各10 μ l加え、37°C、30分間インキュベーション後、TNF- α 10 μ lを加え、37°C、20分間反応させた。次にfMLP、PMAを10 μ lを加え、37°C、5分間インキュベーション後、氷中に5分間静置して反応を停止させた。MPO測定は同様に測定した。

2. フローサイトメーターによるMPO表出の検討

1) 試薬

細胞洗浄液は1%FCS-PBS-0.1%NaN₃（濾過滅菌）を作製した。MPO抗体としてMyeloperoxidase-PE（ベックマン・コールター株式会社）、ネガティブコントロールとしてMouse-IgG1-PE（ベックマン・コールター株式会社）を使用した。

2) フローサイトメーターを使用したMPO表出の検出方法

試験管2本にKRP緩衝液250 μl、1 mol/lグルコース5 μl、好中球20 μl (1 × 10⁶) を加え混和後、37℃、5分間反応後、氷中に5分間静置し反応を停止させた。次いで、1%FCS-PBS-0.1%NaN₃で3回洗浄（1,500 rpm、5分間）後、ネガティブコントロールMouse-IgG1-PE 1 μlを加えた。MPO検出はMyeloperoxidase-PEを1 μl加え、氷中で20分間反応後、1%FCS-PBS-0.1%NaN₃で3回洗浄（1,500 rpm、5分間）し、フローサイトメーター（EPICS XLTM System II：ベックマン・コールター株式会社）で測定した。

PMA、fMLP刺激については、上述の反応系にそれぞれPMA、fMLPを10 μl加え、37℃、10分間インキュベーション後、氷中に5分間静置して反応を停止させた。TNF-αによるプライミング後のPMA、fMLP刺激については、各反応系にTNF-αを10 μl加え反応を行った。MPOの表出は同様に測定した。

3) MPO表出における阻害剤GF109203Xの影響

上述した反応系にGF109203Xを10 μl加え、37℃、30分間反応後、PMAを10 μl添加して、37℃、5分間反応後、氷中に5分間静置して反応を停止させた。MPO表出は同様に測定した。

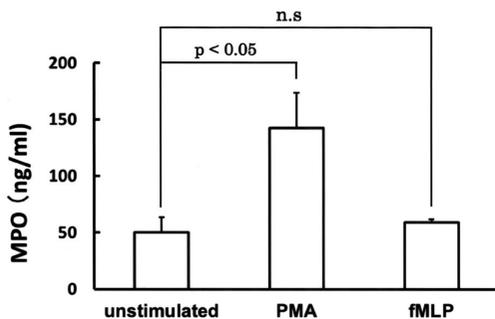


Fig. 1 MPO release reaction by neutrophils activation.

Ⅲ. 結果

1. 好中球活性化に対するMPO放出反応

好中球をPMA、fMLPにより刺激し、MPO放出について検討した。Fig. 1に示すとおり、PMAは有意にMPO放出が認められた。fMLPは増加傾向を示した。

2. fMLP刺激によるMPO放出に対するゲニステインの影響

好中球活性化によりMPO放出を認めたのでそのメカニズムについて検討した。まずfMLP刺激について調べた。チロシンキナーゼの阻害剤であるゲニステインで前処理後、MPOを測定した。Fig. 2に示すとおり、有意な阻害は認められなかった。

3. MPO放出に対するGF109203Xの影響

チロシンキナーゼの阻害剤であるゲニステインにより有意な阻害を認めなかったため、PKC阻害剤であるGF109203Xで前処理後MPO放出量を測定した。Fig. 3に示すとおり、fMLP刺激では高濃度の5 μMのみで有意にMPO放出が阻害された。一方、PMA刺激では濃度依存的、有意にMPO放出が阻害され、GF109203XはfMLP刺激よりも強い阻害を示した (Fig. 4)。

4. フローサイトメーターによるMPO表出の検討

MPO放出はfMLPよりもPMAが強く関与していることが示唆された。そこで、MPO放出のメカニズムを解明するため、可能性の一つとしてMPO表出の検討を行った。Fig. 5に示すとおり、

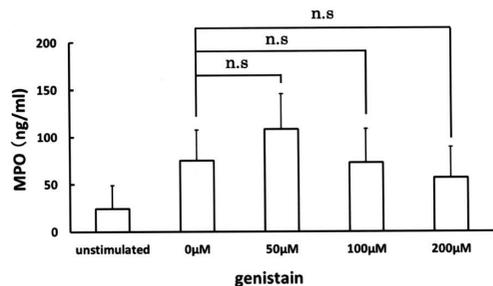


Fig. 2 Impact of Gensstain on MPO release by fMLP stimulation

フローサイトメーターによりMPO表出が確認された。次に、PMA、fMLP刺激およびTNF- α に対する反応性を調べた。結果は、PMA刺激においてMPO陽性率が有意に増加した。一方、fMLP刺激では増加を認めなかった。また、TNF- α の影響もみられなかった (Fig. 6)。

5. MPO表出におけるGF109203Xの影響

PMA刺激でMPO表出が確認されたので、PKC阻害剤であるGF109203Xを作用させてその阻害を調べた。結果はFig. 7に示すとおり、PMA刺激はGF109203XによりMPO陽性率を有意に低下させた。

IV. 考察

感染に際して好中球は、まず細胞表面の受容体によって微生物を認識する。この食作用により、微生物を内部に取り込んだ食胞を形成する。

異物を取り込んでできた食胞は、成熟してリソソームと融合してその内容物が放出される。これは脱顆粒と呼ばれ、効果的に殺菌が行われる。

その際、活性化された好中球では、細胞質内の種々の酵素や蛋白質が細胞膜に移動しNADPH oxidaseを活性化する。また、NADPH oxidaseの構成成分であるシトクロムb-558は細胞膜以外に特殊顆粒などに局在することが認められている。したがって、貪食により形成された食胞の膜においてもNADPH oxidaseが活性化され活性酸素が産生される。次いで活性化された好中球はアズール顆粒から顆粒内成分を放出する。これら好中球の感染に対する食胞形成に伴うNADPH oxidaseの活性化、脱顆粒は、MPO放出に関与す

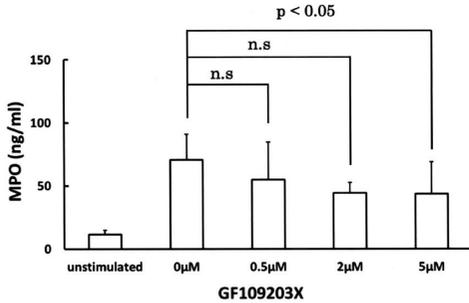


Fig. 3 Impact of GF109203X on MPO release by fMLP stimulation.

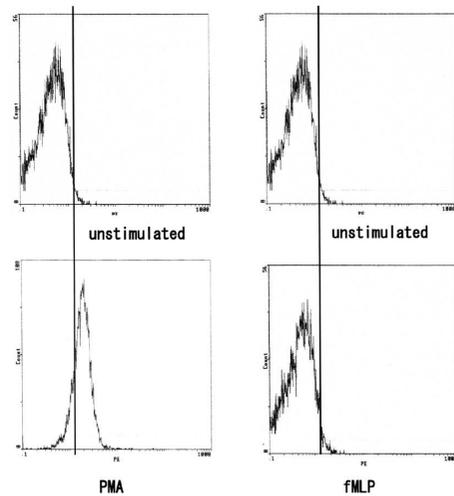


Fig. 5 MPO detection using flow cytometry.

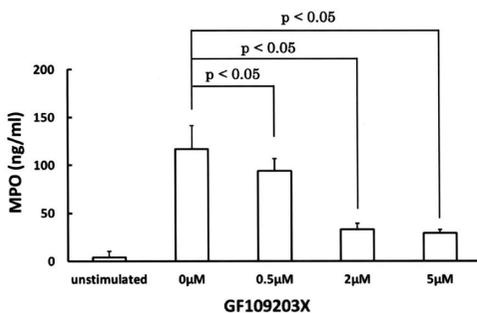


Fig. 4 Impact of GF109203X on MPO release by PMA stimulation.

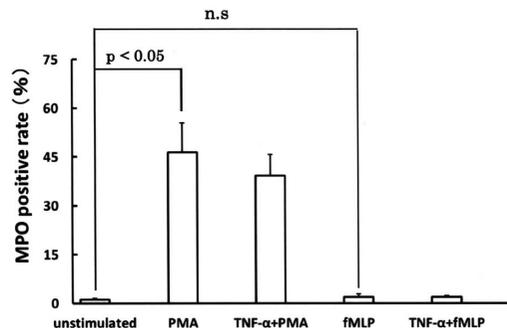


Fig. 6 Impact of stimulus substances on MPO expression.

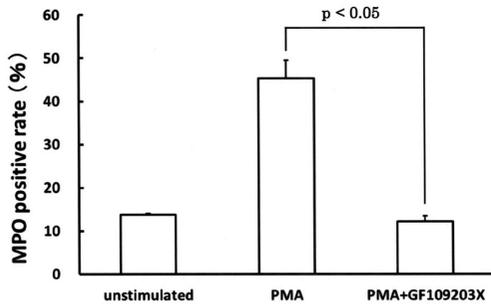


Fig. 7 Impact of GF109203X on MPO expression by PMA stimulation

ることが推測される。

しかしながら、好中球活性化とMPO放出の関連性については不明の点が多い。そこで、今回、好中球活性化のシグナル伝達とMPO放出の機構について研究した。

好中球活性化に伴うMPO放出について、PMA、fMLP刺激による好中球活性化はMPOが放出されることを確認した。そこで、MPO放出と好中球活性化のシグナル伝達の関連性について検討した。TNF- α のプライミング後、fMLP刺激についてチロシンキナーゼの阻害剤であるゲニステインの影響を調べた。結果は、高濃度の200 $\mu\text{mol/l}$ まで有意な阻害を示さなかった。

次に、PKC阻害剤であるGF109203Xの影響を調べた。fMLP刺激に対してGF109203Xは低濃度で阻害を示さず、5 $\mu\text{mol/L}$ で有意な阻害が得られた。これらの結果から、MPO放出はfMLP刺激による好中球活性化のシグナル伝達経路の関与が低いことが示唆された。

そこで、PKC活性化に直接作用するPMA刺激に対する影響について検討した。PMA刺激はGF109203Xにより、濃度依存的に有意にMPO放出を阻害した。これは、MPO放出にPKC刺激伝達が作用していることが推測される。Ambrusoら⁹⁾は、PMA刺激は好中球活性化に伴い、細胞質に特殊顆粒成分が集合することを報告している。

次に、好中球の活性化に伴いMPO放出が確認されたので、MPO放出のメカニズムについて検討した。好中球自己抗体MPO-ANCAは、好中球を活性化し、その状態が持続することで病態の重篤化を招くとされている。また、Reumauxら⁷⁾

はMPO抗体による刺激が、O₂を産生することを報告した。これらの報告は、MPOが細胞表面に表出していることを、示唆する。そこで、好中球活性化に伴うMPO表出について、MPO標識抗体を用いたフローサイトメーターを用いて検討した。PMA、fMLP刺激によるMPO表出はPMA刺激で有意に増加した。一方、fMLP刺激は増加を認めなかった。

次に、MPO表出に対する好中球活性化とシグナル伝達について検討した。上述したようにPMA刺激によるMPO放出は、GF109203Xにより阻害されることが確認されたので、MPO表出についてもGF109203Xの影響を調べた。その結果、GF109003Xにより有意に阻害された。この点について、Kindzelskiiら⁸⁾は妊婦の好中球でMPO表出を検出し、非妊婦では検出されないが、PMA刺激によりMPOが表出することを報告した。また、Sijtsemaら⁹⁾は、Confocal Raman Microspectroscopyを用いてPMAによる好中球活性化について検討し、PMA刺激はMPOを含むアゾ顆粒の放出と密接に関連していることを示している。

これらの結果は、好中球活性化に伴うMPO放出が、PMA刺激による好中球活性化、脱顆粒、アズール顆粒からファゴリソソームへMPOの放出、さらなる刺激により細胞外への放出に至ると推測される。

最近、新しい好中球の抗菌作用が報告されている¹⁰⁾。その作用は、活性化好中球の核膜が消失しクロマチン構造に細胞質、顆粒成分が混在し、次いで細胞膜が破れ網状の構造物Neutrophil extracellular traps (NETs)を細胞外に放出することが示された。この細胞死はapoptosis, necrosisと明らかに異なる。また、MPO-ANCA関連血管炎の患者でNETsの検出が報告されている¹¹⁾。

Fuchsら¹²⁾は、NETsがPMA刺激によるNADPH oxidaseのRSO生成に依存し、CGD患者ではNETs形成ができないことを報告した。さらに、PMAはPKC活性化を通じてNADPH oxidaseの活性化以外に細胞内に多くの影響をおよぼし、核膜の分解、クロマチンの変性、細胞質と核成分の混合など、形態変化しNETsを形成することを報告した。また、MPO完全欠損の好中球ではNETsが形成できない¹³⁾。これはMPOがNETs形成に必要であることを示している。fMLP刺激についてRomijnsenら¹⁴⁾は、fMLPはNETs形成を誘導しな

い。それは、fMLPがPAKT/PI3Kを経てシグナルを伝達し、この系はオートファージを阻害する。ゆえNETs形成を防止するとしている。

さらに、NETs形成はPMAによる好中球処理後、4時間で形成することが報告されている¹⁵⁾。したがって、本研究で示したPMA刺激によるMPOの表出の増加はNETs形成の初期変化を示している可能性が示唆される。

V. 結語

好中球の活性化によるMPO放出、MPOから派生する活性酸素による酸化ストレスが細胞障害に関与することが報告されているが、MPO放出の機構は十分に解明されていない。そこで好中球活性化に伴うMPO放出メカニズムについて調べた。PMA刺激による好中球活性化はMPOの放出および表出が有意に増加した。一方、fMLP刺激はこれらの反応の有意な増加を認めなかった。

これらの結果から、MPO放出はPMA刺激によるPKCを介したシグナル伝達が、好中球の活性化、脱顆粒を引き起こし、アズール顆粒成分の放出、さらに、MPOの細胞表面への表出を経て、細胞外への放出に至ることが示唆された。

文献

- 1) 徳永賢治, 土居 修, 宍野宏治, 村瀬光春, 武内望, 篠原力雄, 石黒伊三雄: 慢性関節リウマチにおける活性酸素産生能の検討. 臨床化学, 18: 196-201, 1989.
- 2) 徳永賢治, 菅野和久, 土居 修, 越智正昭, 宍野宏治, 村瀬光春, 佐伯修一, 武内 望: Rheumatoid arthritis患者における間接液ミエロペルオキシダーゼ, 血漿エラスターゼに関する研究. 臨床化学, 23: 209-213, 1994.
- 3) Dang PM, Stensballe A, Boussetta T, Raad H, Dewas C, Krowiarski Y, Hayem G, Jensen ON, Gougerot-Pocidalo MA and El-Benna J: A specific p47phox-serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. J Clin Invest, 116: 2033-2043, 2006.
- 4) 鈴木和男: 好中球自己抗体MPO-ANCAの病原性と血管炎の病態. J Clin Immunol, 29: 94-101, 2006.
- 5) Brennan ML, Penn MS, Van Lente F, Nambi V, Shishebor MH, Aviles RJ, Goormastic M, Pepoy ML, McErlean ES, Topol EJ, Nissen SE and Hazen SL: Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. N Engl J Med, 349: 1595-1604, 2003.
- 6) Ambruso DR, Bolscher BGJM, Stokmen PM, Verhoeven AJ and Roos D: Assembly and activation of the NADPH: O₂ oxidoreductase in human neutrophils after stimulation with phorbol myristate acetate. J Biol Chem, 265: 924-930, 1990.
- 7) Reumaux D, Hordijk PL, Duthilleul P and Roos D: Priming by tumor necrosis factor- α of human neutrophil NADPH-oxidase activity induced by anti-proteinase-3 or anti-myeloperoxidase antibodies. J Leukoc Biol, 80: 1424-1433, 2006.
- 8) Kindzelskii AL, Clark AJ, Espioza J, Maeda N, Aratani Y, Romero R and Petty HR: Myeloperoxidase accumulates at the neutrophil surface and enhances cell metabolism and oxidant release during pregnancy. Eur J Immunol, 36: 1619-1628, 2006.
- 9) Sijtsma NM, Tibbe AG, Segers-Nolten IGMJ, Verhoeven AJ, Weening RS, Greve J and Otto C: Intracellular reactions in single human granulocytes upon phorbol myristate acetate activation using confocal raman microspectroscopy. Biophys J, 78: 2606-2613, 2000.
- 10) Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y and Zychlinsky A: Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science, 303: 1532-1535, 2004.
- 11) Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, Gröne HJ, Brinkmann V and Jenne DE: Netting neutrophils in antioimmune small-vessel vasculitis. Nat Med, 15: 623-625, 2009.
- 12) Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V and Zychlinsky A: Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. J Cell Biol, 176: 231-241, 2007.
- 13) Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, Reumaux D, Roesler J, Schulze I, Wahn V, Papayannopoulos V and Zychlinsky A: Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. Blood, 117: 953-959, 2011.
- 14) Remijsen Q, Kuijpers TW, Wirawan E, Lippens S, Vandenabeele P and Vanden Berghe T: Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. Cell Death Differ, 18: 581-588, 2011.
- 15) Parker H, Albrett AM, Kettle AJ and Winterbourn CC: Myeloperoxidase associated with neutrophil extracellular traps is active and mediates bacterial killing in the presence of hydrogen peroxide. J Leukoc Biol, 91: 369-376, 2012.