

原 著

末梢血好酸球の肺血管内皮細胞への接着段階における ロイコトリエン拮抗薬の効果

野木村真奈美 永田 真 須谷 顕尚 齋藤 圭子 坂本 芳雄

要旨：シスチニル・ロイコトリエン拮抗薬は喘息気道での好酸球集積を抑制するが、その機序は不明な点が多い。末梢血中好酸球の血管内皮細胞への接着反応は、好酸球が炎症気道に集積する上での初期段階である。本研究では、ロイコトリエン拮抗薬がこの過程を修飾するかどうかについて検討した。ロイコトリエン D₄ による好酸球接着と遊走を特異的にブロックする実験条件下で、ロイコトリエン拮抗薬ブランルカストは好酸球の resting, あるいは IL-4 + TNF- α 刺激肺血管内皮細胞への接着反応を修飾しなかった。同様に、ブランルカストは無刺激, IL-5 または FMLP 刺激による好酸球接着反応を修飾しなかった。ブランルカストは IL-4 + TNF- α 刺激による肺血管内皮細胞上の接着分子群の発現も修飾しなかった。ロイコトリエン拮抗薬の好酸球浸潤抑制作用は、好酸球の血管内皮細胞への接着段階を介さないと推定された。

キーワード：接着分子, シスチニル・ロイコトリエン, 血管内皮細胞, 好酸球, ロイコトリエン受容体拮抗薬

Adhesion molecule, Cysteinyl leukotriene, Endothelial cells, Eosinophils, Leukotriene receptor antagonist

緒 言

シスチニル・ロイコトリエン (cysteinyl leukotriene, CysLT) 拮抗薬は、喘息気道における好酸球組織浸潤に対して抑制的に作用することが示されている^{1)~3)}。その機序として、これらの化合物が好酸球浸潤成立上の諸段階を修飾することが想定される。末梢血中好酸球の血管内皮細胞上の接着分子群への接着過程は、好酸球が喘息気道に集積する上での初期段階である。筆者らは好酸球の接着能が CysLT により増強されることを見出した⁴⁾。CysLT はまた、血管内皮細胞の接着分子 VCAM-1 の発現を増強することが報告されている⁵⁾。これらのことは、CysLT 拮抗薬の好酸球集積抑制機序のひとつとして、好酸球の血管内皮細胞への接着過程が関与する可能性を示唆すると考えられる。本研究では、好酸球の接着能、また血管内皮細胞の接着分子発現に対する CysLT 拮抗薬の作用について検討したのでその成績を報告する。

方 法

1. 材料

Hanks Balanced Salt Solution (以下 HBSS) は GIBCO

〒350 0495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷 38

埼玉医科大学第 2 内科呼吸器科

(受付日平成 14 年 2 月 13 日)

BRL (Grand Island, NY, USA) から、非働化牛胎児血清 (fetal calf serum, FCS) は ICN Biomedicals Inc. (Aurora, Ohio, USA) から入手した。Recombinant human (rh)IL-5, rh-IL-4, rh-TNF- α は R & D systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA) から、formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (以下 FMLP) は Sigma (St. Louis, MO, USA) から、Percoll および Dextran T 500 は Pharmacia (Uppsala, Sweden) から、CD 16 Microbeads は Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany) から入手した。CysLT 拮抗薬ブランルカスト水和物は小野薬品工業から提供を受けた。人肺微小血管内皮細胞 (Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells, 以下 HPMEC) は倉敷紡績株式会社 (大阪, 日本) から入手した。

2. 好酸球分離法

好酸球は健常成人の末梢血から採取した。既報⁶⁾の如く、Dextran T 500 で血漿成分を分離したのち、血球成分を比重 1.085 の Percoll 液を用い比重遠心分離を行い、リンパ球と低比重の顆粒球を除去した。次いで抗 CD 16 抗体ビーズを使用した negative selection 法で好中球を除去し、分離された好酸球を 5% FCS 含有 HBSS (HBSS/FCS) に浮遊して実験に供した。好酸球の純度は 98% 以上であり、実験後の cell viability は trypan blue 染色上 98% 以上であった。

3. 好酸球遊走反応の測定

好酸球を HBSS/FCS あるいはブランルカスト水和物

と 37 °C, 30 分間前処理したのち, Boyden chamber 法の変法⁶⁾を用いて遊走反応を測定した. すなわち 24 穴組織培養プレート (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) に 3 μM ポアサイズのインサートフィルター (Becton Dickinson) を挿着しその上部に 2.5 × 10⁵ cells/ml の好酸球を 200 μl 注入した後, 下層に 1 μM LTD₄ を 500 μl 注入し 37 °C, 5% CO₂ 下にて 3 時間インキュベーションした. その後, 下層に遊走した好酸球の eosinophil peroxidase (EPO) 活性を OPD substrate (1 mM H₂O₂, 1 mM O-phenylenediamine, 0.1% Triton X-100 in Tris buffer, pH 8.0) を用いて発色させ波長 490 nm で吸光度を測定し, 遊走細胞比率として算出した⁶⁾.

4. 好酸球接着反応の測定

好酸球を遊走実験と同様の条件でプランルカスト水和物と前処理して実験に用いた. 接着反応の測定は我々が用いてきた, 好酸球と血管内皮細胞とのインキュベーションと引き続き洗浄後の残存 EPO 活性を OPD substrate を用いて測定する方法⁷⁾を用いて行った. すなわち, HPMEC を 96 穴組織培養プレート (Becton Dickinson) 上にコートして無刺激あるいは vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 発現誘導目的で IL-4 と TNF-α (共に 100 pM) 刺激下で 24 時間培養⁷⁾した後, HPMEC 由来のメディエーターを除外する目的で, 1% パラホルムアルデヒドで固定し実験に供した. 1.0 × 10⁵ cells/ml の好酸球 100 μl 浮遊液をこのプレート上に分注し, FMLP (1 μM) あるいは IL-5 (100 pM) の存在下・非存在下で好酸球を 37 °C, 5% CO₂ 下にて 30 分間インキュベーションしたのち HBSS で 3 回洗浄し, プレートに残存した EPO 活性を OPD substrate を用い発色し波長 490 nm で吸光度計にて好酸球接着反応として測定し, 接着細胞比率として算出した^{4,6,7)}.

5. 血管内皮細胞接着分子の測定

HPMEC 上の VCAM-1 および Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 の発現量は, 既報⁷⁾の cell-ELISA 法にて測定した. すなわち, 96 ウェル組織培養プレート上にコートした HPMEC をプランルカスト存在下・非存在下で 30 分間前処理したのち IL-4 + TNF-α (各 100 pM) により 24 時間刺激した. 洗浄後, 5% FCS と 3% ドライミルク (森永乳業, 東京, 日本) を含む PBS 緩衝液で 37 °C 30 分間処理し, そののち抗 VCAM-1 抗体 (クローン BBIG-V 1, R & D Systems), 抗 ICAM-1 抗体 (クローン BBIG-I 1, R & D Systems), またはアイソタイプ・マウス IgG 1 と 37 °C 2 時間処理した. 再洗浄ののち, ペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗マウス IgG 1 を加え, 2 時間処理後に洗浄した後で残存したペルオキシダーゼ活性を OPD substrate にて発色し, 490 nm における吸光度を測定し, 細胞表面上の VCAM-1 および ICAM-1 濃

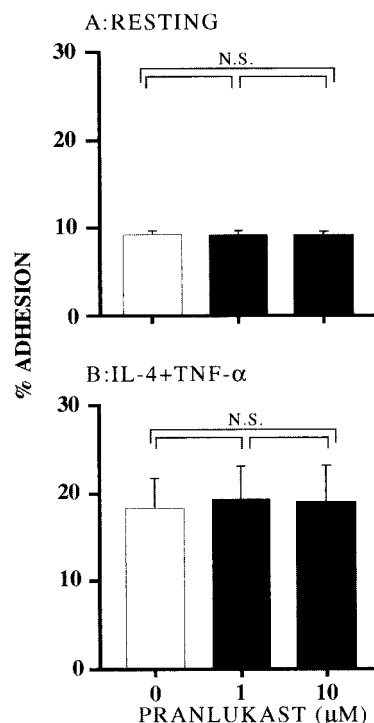


Fig. 1 Effects of pranlukast hydrate on the spontaneous adhesion of eosinophils to (A) resting and (B) IL-4 + TNF-α-stimulated HPMEC. Data are expressed as mean ± SEM from six experiments. N.S.: not significant.

度を IgG 1 アイソタイプの吸光度との差として算出した⁷⁾.

統計処理

統計処理は two-way analysis of variance を用い, Fisher 法 (post hoc 検定) にて危険率が 5% 未満の場合に有意とみなした.

成績

1. CysLT 拮抗薬の至適濃度の決定

はじめに LT 拮抗薬が十分に薬理作用を発現する至適濃度を決定する目的で, 好酸球の LTD₄ による化学遊走反応⁸⁾ならびに接着反応⁴⁾に対するプランルカスト前処理の中和効果を検討した. プランルカストは臨床最高血中濃度⁹⁾にほぼ相当する 1 μM の 37 °C, 30 分間の前処理により, 1 μM LTD₄ による好酸球遊走を平均 94% 抑制した (N=2). 好酸球の HPMEC への接着は 1 μM LTD₄ により自然接着と比して 80% 増強したが, 1 μM プランルカストはこの増強効果を平均 95% 抑制した (N=2). これらのことから, 以降は 1 あるいは 10 μM の本化合物を用い, 37 °C 30 分間の前処理をして検討に用いることとした.

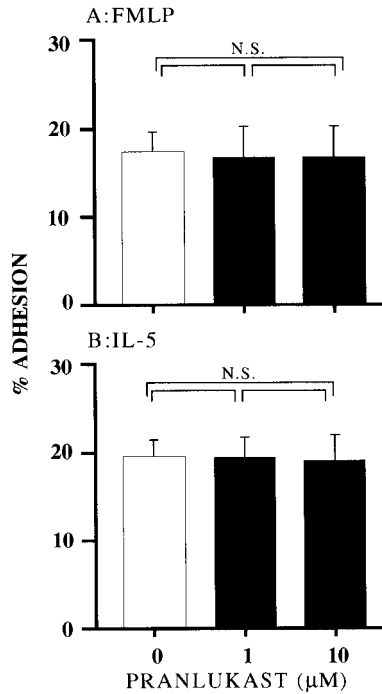


Fig. 2 Effects of pranlukast hydrate on (A) 1 μM FMLP- and (B) 100 pM IL-5-stimulated eosinophil adhesion to resting HPMEC. Data are expressed as mean ± SEM from six experiments. N. S.: not significant.

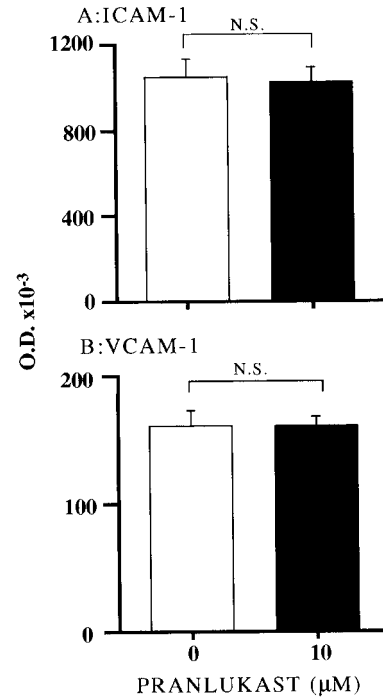


Fig. 3 Effects of pranlukast hydrate on the expression of (A) ICAM-1 and (B) VCAM-1 on HPMEC stimulated with IL-4 + TNF-α (both 100 pM, 24 h). Data are expressed as mean ± SEM from five experiments. N. S.: not significant.

2. 好酸球接着反応におよぼす CysLT 拮抗薬の効果
好酸球の resting の HPMEC への自然接着反応は、1 ~ 10 μM のプラルルカストにより修飾されなかった（接着率：対照 vs. 10 μM; $9.2 \pm 1.1\%$ vs. $9.1 \pm 1.4\%$, $p = \text{N.S.}$, $N = 6$, Fig. 1A). 好酸球の IL-4 + TNF-α 刺激 HPMEC への自然接着もプラルルカストにより修飾されなかった（対照 vs. 10 μM; $18.2 \pm 4.1\%$ vs. $19.1 \pm 4.7\%$, $p > 0.05$, $N = 6$, Fig. 1B).

次に、FMLP (1 μM) あるいは IL-5 (100 pM) により好酸球を刺激した場合の resting HPMEC への接着反応は、10 μM までのプラルルカストにより修飾されなかった (FMLP: 対照 vs. 10 μM; $17.3 \pm 2.9\%$ vs. $16.7 \pm 4.1\%$, $p > 0.05$, Fig. 2A, IL-5: 対照 vs. 10 μM; $19.5 \pm 2.2\%$ vs. $19.1 \pm 3.1\%$, $p > 0.05$, Fig. 2B, 各々 $N = 6$).

一部の試験で HPMEC を 1 ~ 10 μM プラルルカストで 37 ~ 30 分間処理後に実験を試みたが、好酸球の無刺激、FMLP あるいは IL-5 刺激による HPMEC への接着はいずれも修飾されなかった (各々 $N = 2$).

3. 血管内皮細胞接着分子発現におよぼす CysLT 拮抗薬の効果

10 μM のプラルルカスト水和物は IL-4 + TNF-α 刺激による HPMEC 上の VCAM-1 あるいは ICAM-1 の発現

を修飾しなかった (O.D.: 対照 vs. 10 μM; ICAM-1, 1.050 ± 0.109 vs. 1.026 ± 0.096 , $p > 0.05$, Fig. 3A, VCAM-1, 0.161 ± 0.016 vs. 0.161 ± 0.009 , $p > 0.05$, Fig. 3B, 各々 $N = 5$).

考 察

CysLT 拮抗薬が喘息気道における好酸球集積を抑制することは、臨床レベルで再現性を持って観察されている¹⁾⁻³⁾. 喘息気道における好酸球集積には、末梢血中好酸球の血管内皮細胞への接着、血管内皮細胞間隙遊走、また組織での生存延長などの諸段階が関与する. IL-4 と TNF-α は代表的な血管内皮細胞の活性化因子であり、喘息における好酸球接着過程の重要な調節因子と推定されている¹⁰⁾. 筆者らは本血管内皮細胞を IL-4 + TNF-α で刺激しても CysLT を遊離しないことを観察しているが、本稿でも検討対象としたように、VCAM-1, ICAM-1 の発現を誘導することを確認している⁷⁾. 一方、IL-5 は単独での好酸球 CysLT 産生の直接的な誘導能は乏しいもののこれを増強させる能力をもち¹¹⁾, また細菌由来ペプチドである FMLP は好酸球の CysLT 産生を直接的に誘導することから¹²⁾, これらによる好酸球接着には CysLT の寄与や CysLT 拮抗薬による抑制効果が想定し

える。筆者らの以前の検討では $1 \mu\text{M}$ FMLP の刺激による好酸球の LTC_4 産生量は約 $30 \text{ pg}/10^6 \text{ cells}$ 程度であり¹²⁾、好酸球接着を増強するレベルよりも低いと思われたが、好酸球自身が LT を産生すれば autocrine または paracrine な機序により、高濃度の LT への曝露が生じる可能性はあるものと推定される。

本検討において、CysLT 拮抗薬 プランルカストは、臨床的血中濃度に相当する $1 \mu\text{M}$ で、 LTD_4 自体による好酸球の化学遊走と接着をブロックした。この成績は Spada ら⁸⁾の LTD_4 が好酸球遊走を誘導するとして報告、筆者らの LTD_4 が好酸球接着を誘導するとして報告⁴⁾を再現するとともに、本検討の実験条件で試験薬が CysLT 拮抗薬として機能したことを示す。一方、プランルカストは最大 $10 \mu\text{M}$ までの濃度を用いても、resting、あるいは $\text{IL-4} + \text{TNF-}\alpha$ で刺激した HPMEC への好酸球の接着反応、また好酸球側を IL-5 あるいは FMLP で刺激した場合の接着反応のいずれについても、全く抑制効果を示さなかった。さらに、プランルカストは HPMEC 側を処理した場合でも好酸球接着反応を修飾できず、 $\text{IL-4} + \text{TNF-}\alpha$ 刺激による HPMEC 上の接着分子群の発現についても抑制しなかった。これらのことから、末梢血好酸球の血管内皮細胞への接着反応の成立過程においては、CysLT 自体の血中濃度が極端に上昇するなどの特殊な事態が生じない限り、CysLT 拮抗薬がこれを修飾する可能性は低いと推定される。それでは CysLT 拮抗薬の好酸球浸潤抑制作用には如何なる機序が考えられるであろうか？

LTD_4 あるいは LTE_4 の吸入は、喘息気道において好酸球組織集積を惹起する¹³⁾¹⁴⁾。本検討で臨床濃度のプランルカストが LTD_4 誘導好酸球遊走を抑制したことは、CysLT 拮抗薬の好酸球集積抑制作用の一部が、CysLT 自体による好酸球遊走に対する特異的な抑制作用を介することを示唆する。Lee ら¹⁵⁾は、 $\text{LTC}_4 \cdot \text{LTD}_4$ が好酸球生存延長を誘導すること、CysLT 拮抗薬あるいは LT 産生抑制薬が好酸球のアポトーシスを誘導し生存延長を抑制することを示している。また筆者ら⁴⁾は、 LTD_4 が 100 nM 以上の濃度において、好酸球の ICAM-1 への接着を増強することを示した。 LTD_4 の血中濃度がかかる高濃度となることは考え難いものの喀痰での検討から喘息気道内では到達可能と考えられ¹⁶⁾¹⁷⁾、好酸球と気道上皮細胞上の ICAM-1 との相互作用に参与することが考えられる。筆者らの成績ならびに以上の報告を考え合わせると、CysLT 拮抗薬の好酸球集積抑制機序は、末梢血好酸球が血管内皮細胞に接着する段階以降の好酸球遊走、気道組織内での生存延長、あるいは気道上皮細胞の ICAM-1 との接着反応における、CysLT 自体の寄与部分に対する特異的な拮抗作用が主体と推定される。炎症

部位における全ての好酸球遊走・生存延長活性中の CysLT の寄与レベルによって、CysLT 拮抗薬の効果発現水準が規定されると考えられる。なお健常者に LTD_4 を吸入させても好酸球集積は惹起されなかったとの報告もあり¹⁸⁾、CysLT が効果的に好酸球集積を誘導するには IL-4 の血管内皮細胞に対する作用や IL-5 の好酸球に対する作用を含む、炎症性サイトカインの介在が必要である可能性が考えられる。

CysLT 拮抗薬は好酸球の接着・遊走や生存以外の径路を介しても抗炎症作用を発揮する可能性が考えられる。Tohda ら¹⁹⁾は、 $20 \mu\text{M}$ と高濃度ではあるものの、プランルカストが抗原刺激単核球からの IL-3 、 IL-4 、 GM-CSF 産生を抑制することを示した。 IL-4 は VCAM-1 発現誘導因子であり、 IL-3 と GM-CSF は好酸球生存延長因子であることから、これらの産生減少は好酸球組織集積を間接的に抑制すると考えられる。一方、CysLT は血管内皮細胞上の P セレクチン発現を誘導することが知られるが、プランルカストならびにザフィルルカストはこれを修飾しなかったとされる²⁰⁾。この理由として、CysLT による P セレクチン発現は CysLT 1 受容体には非依存性であることが考えられる²⁰⁾が、CysLT 拮抗薬の作用の選択性を示唆する報告として興味深い。いずれにしても、LT 拮抗薬の抗炎症作用のプロファイルが明確化されるには、好酸球への作用のみならず、接着分子やサイトカイン・ケモカインを含むアレルギー性炎症の調節因子に対する作用や、T 細胞、肥満細胞、マクロファージなどの免疫担当細胞、さらに気道上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞などのレジデント細胞に対する作用を含む詳細な検討がなされる必要があると考える。今後はこれらの研究標的についても検討がなされることにより、CysLT 拮抗薬の抗炎症作用については臨床効果の発現機構が明確化されてゆくことが望まれる。

文 献

- 1) Nakamura Y, Hoshino M, Sim JJ, et al : Effect of the leukotriene receptor antagonist pranlukast on cellular infiltration in the bronchial mucosa of patients with asthma. Thorax 1998 ; 53 : 835 - 841.
- 2) Pizzichini E, Leff JA, Reiss TF, et al : Montelukast reduces airway eosinophilic inflammation in asthma : a randomized controlled trial. Eur Respir J 1999 ; 14 : 12 - 18.
- 3) Yoshida S, Ishizaki Y, Shoji T, et al : Effect of pranlukast on bronchial inflammation in patients with asthma. Clin Exp. Allergy 2000 ; 30 : 1008 - 1014.
- 4) Nagata M, Kinoshita K, Tsuchiya K, et al : Leukotriene D 4 augments eosinophil adhesion via the Cys

- LT 1 receptor. *J Allergy Clin Immunol* 2002 ; 109 : 676 680.
- 5) Saito H, Shimizu H, Mita H, et al : Histamine augments VCAM-1 expression on IL-4-and TNF- α -stimulated human umbilical vein endothelial cells. *Int Arch Allergy Immunol* 1996 ; 111 : 126 132.
- 6) Nagata M, Yamamoto H, Tabe K, et al : Eosinophil adhesion-inducing activity produced by antigen-stimulated mono-nuclear cells involves GM-CSF. *Int Arch Allergy Immunol* 2000 ; 122 (s 1) : 15 19.
- 7) Nagata M, Sedgwick JB, Vrtis R, et al : Endothelial cells upregulate eosinophil superoxide generation via VCAM-1 expression. *Clin Exp Allergy* 1999 ; 29 : 550 661.
- 8) Spada CS, Nieves AL, Krauss AH, et al : Comparison of leukotriene B 4 and D 4 effects on human eosinophil and neutrophil motility in vitro. *J Leukocyte Biol* 1994 ; 55 : 183 191.
- 9) 中島光好, 金子光隆, 植松俊彦, 他 : ロイコトリエン (LT) C₄,D₄,E₄ 受容体拮抗剤 ; ONO-1078 の健常成人における第 I 相臨床試験 . *臨床医薬* 1993 ; 9 : S 3 29.
- 10) Bochner BS : Cellular adhesion and its antagonism. *J Allergy Clin Immunol* 1997 ; 100 : 581 585.
- 11) Takafuji S, Bischoff SC, DeWeck AL, et al : IL-3 and IL-5 prime normal human eosinophils to produce leukotriene C 4 in response to soluble agonists. *J Immunol* 1991 ; 147 : 3855 3861.
- 12) Nagata M, Sedgwick JB, Bates ME, et al : Eosinophil adhesion to vascular cell adhesion molecule-1 activates superoxide anion generation. *J Immunol* 1995 ; 155 : 2194 2202.
- 13) Laitinen LA, Laitinen A, Haahtela T, et al : Leukotriene E₄ and granulocytes infiltration into asthmatic airways. *Lancet* 1993 ; 341 : 989 990.
- 14) Diamant Z, Hiltermann JT, Van Rensen EL, et al : The effect of inhaled leukotriene D₄ and methacholine on cell differentials in sputum from patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997 ; 155 : 1247 1253.
- 15) Lee E, Robertson T, Smith J, et al : Leukotriene receptor antagonists and synthesis inhibitors reverse survival in eosinophils of asthmatic individuals. *Am J Respir Crit Care Med* 2000 ; 161 : 1881 1886.
- 16) Pavord ID, Ward R, Woltman G, et al : Induced sputum eicosanoid concentrations in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999 ; 160 : 1905 1909.
- 17) Macfarlane AJ, Dworski R, Sheller JR, et al : Sputum cysteinyl leukotrienes increase 24 hours after allergen inhalation in atopic asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 2000 ; 161 : 1553 1558.
- 18) Smith LJ, Shamsuddin M, Houston M : Effect of leukotriene D 4 and platelet activating factor on human alveolar macrophage eicosanoid and PAF synthesis. *Am Rev Respir Dis* 1993 ; 148 : 682 688.
- 19) Tohda Y, Nakahara H, Kubo H, et al : Effects of ONO-1078 (Pranlukast) on cytokine production in peripheral blood mononuclear cells of patients with bronchial asthma. *Clin Exp Allergy* 1999 ; 29 : 1532 1536.
- 20) Pedersen KE, Bochner BS, Undem BJ : Cysteinyl leukotrienes induce P-selectin expression in human endothelial cells via a non-CysLT 1 receptor-mediated mechanism. *J Pharma Exp Ther* 1997 ; 282 : 655 662.

Abstract

Study on the Effect of Cysteinyl Leukotriene Antagonist, Pranlukast Hydrate, on Adhesive Interaction between Eosinophils and Pulmonary Endothelial Cells

**Manami Nogimura, Makoto Nagata, Akihisa Sutani,
Keiko Saito and Yoshio Sakamoto**

Pulmonary Division, Second Department of Internal Medicine, Saitama Medical School

It has been reported that cysteinyl leukotriene (CysLT) antagonists reduce the accumulation of eosinophils in the asthmatic airway. However, the exact mechanism of this action remains to be established. In the present study, we examined whether a CysLT antagonist modifies the adhesive interaction between blood eosinophils and endothelial cells. Pranlukast hydrate, a CysLT antagonist, blocked the chemotactic response and adhesion of eosinophils induced by LTD₄. On the other hand, pranlukast did not modify the eosinophil spontaneous adhesion to the resting or IL-4 plus TNF- α -stimulated pulmonary endothelial cells. Similarly, pranlukast did not modulate IL-5- or FMLP-activated eosinophil adhesion to the resting endothelial cells. Finally, pranlukast did not modify the expression of adhesion molecules on endothelial cells stimulated with endothelial activating cytokines. These results suggest that the inhibitory action of CysLT antagonist on eosinophil accumulation in the asthmatic airways involves mechanisms other than the adhesive interaction between eosinophils and endothelial cells.