

インターロイキン8 (IL-8) と炎症性疾患

向田 直史・松島 綱治

Jpn. J. Clin. Immun., 15 (6) : 522~528, 1992.

I. はじめに

リポ多糖類 (lipopolysaccharide : LPS) 刺激ヒト末梢血単核球培養上清に、好中球に対して走化活性を示す、ポリペプチド性の因子が存在することが1980年に報告された¹⁾。当初、この活性はインターロイキン1 (interleukin 1 : IL-1) あるいは腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor : TNF α) によって担われていると考えられていた。しかし、リコンビナント IL-1 \cdot TNF α ともに好中球の走化活性を *in vitro* では示さず、しかも、LPS 刺激単核球培養上清をクロマトグラフィーにかけると、IL-1 \cdot TNF α 活性を示さない分画に好中球走化活性が認められることが明かとなった²⁾。

LPS 刺激ヒト末梢血単核球培養上清よりこの因子を精製し、N末端のアミノ酸を決定し³⁾、これを基に合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして cDNA クローニングし⁴⁾、これを monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) と命名した。その後、この因子が表1に示すような多彩な作用を好中球のみならず、T細胞・好塩基球に対しても示す上に、表2に示すような単球以外の種々の細胞が産生することが明かとなった。1989年の第1回国際白血球走化因子のシンポジウムにて IL-8 と呼ぶことが提唱され、現在ではこの名称が一般的に用いられている。

IL-8 は4つのシステイン残基を有し、その間で S-S 結合が生じ3本の β シーツ構造を取るとともに、C末端部分が α ヘリックス構造をとる⁵⁾。IL-8 と同様の位置にシステイン残基を有し、IL-8 と同じく炎症性の刺激で種々の細胞が大量に産生・分泌するサイトカインが、現在10種類以上報告されている (表3)。こ

れらのサイトカインは、染色体遺伝子の構造も類似し、最初のシステイン残基が1個のアミノ酸で隔てられているものの遺伝子は4q12-21に、隣り合っているものの遺伝子は17q11-12にクラスターとして存在していることから、スーパーゼン・ファミリーであると考えられている⁶⁾。さらにこれらのサイトカインの多くが、白血球に対して走化活性を示すことから、1992年の国際白血球走化因子シンポジウムで、chemokine と呼ぶこと、さらに遺伝子が4q12-21に存在するものを C-X-C、遺伝子が17q11-12に存在するものを C-Cファミリーと呼ぶことが合わせて提唱された。本稿ではセプター・産生調節機構についての現時点での知見を述べた後に、IL-8の種々の病態での動態について解説を加えることにし、生物活性・構造および chemokine の他の分子種などについては他の総説⁶⁻⁹⁾に譲ることにする。

II. IL-8 レセプター

¹²⁵I 標識 IL-8 を用いた結合実験で、ヒト好中球は結合定数 8×10^{-10} M の高親和性のレセプターを、細胞あたり20,000個を有していた⁸⁾。白血球走化活性を示す C5a \cdot FMLP \cdot ロイコトリエン B₄ \cdot 血小板活性化因子 (platelet activating factor : PAF) は、IL-8 の好中球への結合を阻害しない⁹⁾。chemokine のうちでは、好中球走化活性を示す gro のみが、IL-8 の好中球への結合を IL-8 とほぼ同程度に阻害する。gro は、IL-8 と全体的なアミノ酸レベルでの相性は高くないが、3次構造の解析から IL-8 のレセプター結合部位であると想定されている Glu 4 から Cys 4 および Gly 31 から Ala 35 にかけてのアミノ酸配列は IL-8 と完全に一致している⁹⁾。このために、gro が IL-8 の好中球への結合を阻害すると考えられる。

好中球以外にも、IL-8 の標的細胞である T細胞にも、細胞当たり300個のレセプターが存在する⁹⁾。こ

表 1 Biological Functions of IL-8

Cell target	Effects
<i>In vitro</i>	
Neutrophils	Chemotaxis, Shape change Induction of degranulation Induction of respiratory burst Induction of lysosomal enzymes Induction of adherence to unstimulated endothelial cells Inhibition of adherence of cytokine-activated endothelial cells Induction of transendothelial migration Induction of binding of C3b and LPS Induction of expression of complement receptor type 1 Induction of expression of adhesion molecules (CD 11a, b, c, and 18) and Mac1 Enhancement of growth inhibition of <i>Candida albicans</i> Activation of 5-lipoxygenase Induction of release of leukotriene B ₄ and 5-HETE
T lymphocytes	Chemotaxis
Basophils	Chemotaxis Induction of release of histamine and leukotriene
<i>In vivo</i>	
	Induction of neutrophil infiltration (human, rat, mouse, rabbit, dog) Induction of lymphocyte infiltration (rat, rabbit) Induction of neutrophilia (mouse, rabbit) Induction of vascular permeability (rabbit) Neutrophil-dependent destruction of synovium (rabbit)

表 2 Producing Cells, Inducers, and Suppressors of IL-8

Cell	Inducers	Suppressors
Monocytes/macrophages	LPS, Concanavalin A (Con A), IL-1, TNF α , phorbol ester, uric acid crystals, plant polysaccharide	Glucocorticoids, IL-4, TGF β , Lipoxygenase Inhibitor, Vitamin D ₃ , IL-10
Natural killer cells	IL-2+anti-CD 16	
T lymphocytes	phorbol ester+calcium ionophore, staphylococcus enterotoxin A	FK 506
Neutrophils	zymosan, phorbol ester	
Fibroblasts	IL-1, TNF α , phorbol ester, viruses (measles, rubella), X protein of hepatitis B virus	Glucocorticoid, IFN β , IFN γ , Vitamin D ₃
Keratinocytes	LPS, IL-1, TNF α +IFN γ	Vitamin D ₃
Endothelial cells	LPS, phorbol ester, IL-1, TNF α	
Hepatoma cells	IL-1, TNF α	
Astrocytoma cells	LPS, IL-1, TNF α	
Glioblastoma cells	IL-1, TNF α	
Lung epithelial cells	IL-1, TNF α	
Synovial cells	IL-1, TNF α	
Melanocytes	IL-1, TNF α , phorbol ester	
Melanoma cells	IL-1, TNF α , phorbol ester	
Gastric cancer cells	IL-1, TNF α +IFN γ	

表 3 RELATIONSHIPS OF MEMBERS OF CHEMOKINE FAMILY

Species	Human	Murine	Major functions
Chemokine C-X-C subfamily			
Chromosome	4(q 12-21)	?	
Structure	C-X-C	C-X-C	
Cytokines	IL-8	?	neutrophil, T lymphocyte, basophil chemotaxis
	gro α	MIP-2/KC	neutrophil chemotaxis
	gro β	gro β	neutrophil chemotaxis
	gro γ	gro γ	neutrophil chemotaxis
	PF ^{a)}	?	neutrophil chemotaxis
	β TG ^{b)}	?	?
	IP-10	CRG-2	T lymphocyte chemotaxis
Chemokine C-C subfamily			
Chromosome	17(q 11-12)	11	
Structure	C-C	C-C	
Cytokines	MCAF/MCP-1	JE	monocyte chemotaxis
	LD 78	MIP-1 α	stem cell growth inhibition
	ACT 2	MIP-1 β	?
	RANTES	?	monocyte and T cell chemotaxis
	I-309	TCA-3	neutrophil chemotaxis (?)

a) Platelete factor 4 b) β -thromboglobulin

のことが、特定のサブセットのT細胞のみがレセプターを有しIL-8に反応するか、あるいはIL-8の信号伝達にはごく少数のレセプターの存在で充分であることを意味しているかについては今後の検討が必要である。

レクチンがIL-8の好中球への結合を阻害することから、IL-8レセプターは糖を含有していると考えられている。crosslinkingの結果から、IL-8レセプターは分子量67および59 kDaの2種類の分子種が存在している⁹⁾。この分子量のmicroheterogeneityが、Basemerらが報告している親和性の異なる2種類のレセプターの存在¹⁰⁾を反映しているかについては、不明である。

IL-8レセプターは、IL-8と結合すると37°Cでは10分以内というきわめて短時間で、細胞内にinternalizeされ、リソゾームに移行し、リガンド・レセプター・コンプレックスからリガンドが遊離し、レセプターが再び10分以内に細胞表面に出現する¹¹⁾。蛋白合成阻害剤であるサイクロヘキシミドが、このようなinternalization・再発現を阻害しないことから、レセプターの再発現は蛋白の新たな合成を必要としない、再循環であると考えられる。リソゾーム阻害剤であるクロロキン・塩化アンモニウム等は、IL-8のレセプタ

ーへの結合・internalizationは阻害せずに、レセプターの再循環のみを選択的に阻害した。さらに塩化アンモニウムによるレセプターの再循環の阻害と走化活性の阻害の程度とは相関が認められることから、レセプターの再循環はIL-8の細胞内信号伝達に重要な役割を果たしていると考えられる。

近年、発現ベクターを用いて、2種類のヒトIL-8レセプター^{12,13)}と1種類のウサギIL-8レセプター¹⁴⁾のcDNAがクローニングされた。これらのレセプターは、シグナル・ペプチド部分を含めて、350個のアミノ酸からなり、これらのレセプター間でのアミノ酸レベルでの相同性は約70%と高い。さらにアミノ酸配列の疎水性の検討から、これらのレセプターは、アドレナリン・レセプターなどのG蛋白と会合することが知られている7回細胞膜を貫通する構造を取ると推定されており(図1)、WS-X-WSモチーフを取るいわゆるサイトカイン・レセプター・ファミリーとは異なる構造を取ると考えられている。FMLP・C5a・PAFのレセプターも同様の7回細胞膜貫通構造を取ることも報告されており、このような構造は白血球走化因子レセプターに共通して認められる構造の可能性がある。

ヒトIL-8レセプターの第1・第3細胞外領域には、

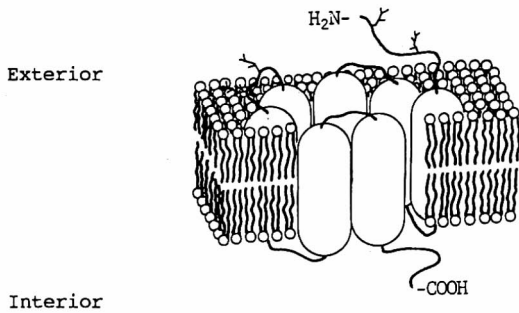


図1 Schematic structure of IL-8 receptor
Potential N-glycosylation sites are indicated with (X).

N-グリコシル糖鎖付加可能な部分が存在し、これが先に述べた micro-heterogeneity の原因である可能性もある。アドレナリン・レセプター等では、第3細胞内領域がG蛋白との会合部位であることが知られているが、IL-8レセプターの第3細胞内領域は短く、G蛋白がこの部位を通してIL-8レセプターと会合しているか否かについては今後の検討が必要である。

ヒトIL-8レセプターのうち、HolmesらがクローニングしたものをI型、MurphyらがクローニングしたものはII型と呼ばれている。種々の抗体・ペプチドでの結合競合実験から、N末端部分がIL-8との結合能を有しており、しかも、I型がIL-8とのみ結合するのに対して、II型がIL-8・groの両者と結合することが報告された。I型・II型のアミノ酸レベルでの相同性は、全体的には約70%と高いにもかかわらず、N末端部分での相同性が低いことが、このように結合するリガンドの相違を生じたと考えられる。今後、リガンド・レセプター間での結合様式が解明されることによって、IL-8のアンタゴニストなどの開発が進むことが期待される。

III. IL-8の産生調節機構

表2に示すように、単球/マクロファージ以外にも非常に多彩な種類の細胞が、IL-8を産生することが報告されている。これらの細胞の多くは、極く微量のIL-8しか恒常的には産生していないが、表2に示すようなLPS・IL-1・TNF α のような炎症惹起的に作用する因子の刺激によって、未刺激に比べて100倍を超える大量のIL-8を産生することが知られている⁸⁾。このような刺激によるIL-8産生誘導は、nuclear run-off アッセイの結果から、多くの細胞ではmRNAの

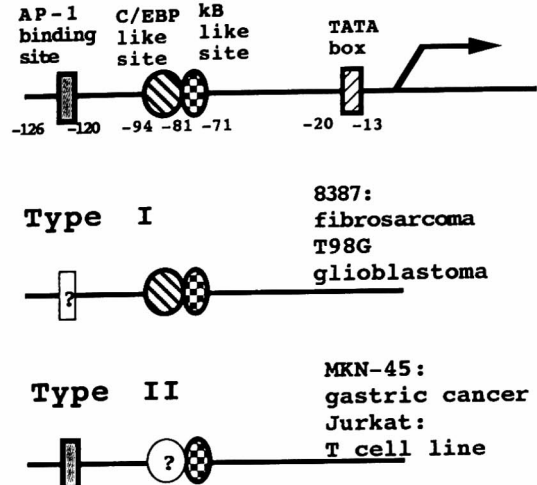


図2 Cell Type Specific Usage of Cis-Elements of the IL-8 Promoter

安定性の亢進と、転写の活性化によって考えられている。

IL-8遺伝子の転写調節機構を解明するために、我々はIL-8染色体遺伝子のクローニングとその全塩基配列の決定を行なった¹⁵⁾。IL-8染色体遺伝子は4つのエクソンと3つのイントロンからなり、5'上流領域の塩基配列は、IL-1やTNF α で転写が活性化されることが知られている他の遺伝子とは全体的な相同性は認めなかった。しかし、5'上流エンハンサー領域は、既知の幾つかの転写因子の結合可能なシス領域を認めた。

これらのシス領域の機能を検討するために、chloramphenicol acetyl transferase (CAT) ベクターに種々の5'上流領域の欠失あるいは点突然変異遺伝子を連結した。これらをIL-8遺伝子の発現が見られる種々の細胞に遺伝子導入後、適当な刺激で細胞を刺激し、CAT活性の誘導を指標として解析を行なった。

現在までに解析を行なった細胞においては、必要とされるシス領域の組み合わせの違いから、2つのタイプが存在した(図2)。線維肉種細胞¹⁶⁾・グリオブラストーマ細胞ではNF- κ B/C/EBP結合部位との組み合わせが、胃癌細胞¹⁷⁾・T細胞株では、NF- κ B・AP-1結合部位との組み合わせが必要なシス領域であった。しかし、いずれの場合でもNF- κ B結合部位が必要である。したがって、このシス領域に結合する転写因子の物理化学的性状の解析によって、IL-8遺伝子転写調節機構についてさらに解明されると思われる。

表2にIL-8産生を抑制することが知られている因子を列記した。これらの因子のすべてが、IL-8蛋白そのものの産生を阻害するのみならず、Northern blottingでもmRNAの誘導を阻害することが報告されている。さらに、グルココーチコイド¹⁸⁾・IFN¹⁹⁾については、nuclear run-offアッセイの結果からIL-8遺伝子転写も抑制することも報告されている。これらの因子によるIL-8遺伝子転写抑制の機構の解明によって、新たなIL-8産生調節方法が開発されることが望まれる。

IV. IL-8の種々の炎症性疾患での役割

感染症、特に細菌性感染症のさいに、病巣局所での好中球を主体とする白血球浸潤や、同じく好中球を主体とする白血球増多が認められることは旧くから知られている。グラム陰性菌菌体成分であるLPSは、*in vitro*で種々の細菌のIL-8産生を誘導するのみならず、ヒトに静脈投与後に、血中IL-8濃度がIL-6・TNF α 濃度とともに上昇することが報告されている²⁰⁾。グラム陽性球菌である連鎖球菌由来の免疫賦活剤であるOK-432を癌性胸膜炎患者胸腔に投与すると、胸水的好中球の増加に先立って、胸水IL-8濃度が上昇することを我々は認めている。また、尿路感染症では、起因菌がグラム陽性・陰性にかかわらず、全例において尿中IL-8濃度の上昇を認め、しかも尿中IL-8濃度と尿中の白血球数には正の相関を我々は認めている。したがって、各種の細菌感染症では、菌体そのものあるいは菌体成分であるLPSなどが、IL-8産生を誘導し、その結果病巣局所などで好中球を主体とする白血球浸潤が起こっている可能性が高いと考えられる。

感染症以外に、好中球浸潤あるいは好中球増多症が認められる疾患を表4に列記した。これらの疾患のうち、慢性関節リウマチ(RA)においては、関節液中でのIL-8濃度が、変形性関節症に比べ有意に高いのみならず²¹⁾、ウサギ膝関節にIL-8を投与すると白血球浸潤を伴い関節滑膜の破壊が起こること、さらにIL-8の投与が持続的に行なわれた場合には不可逆的な変化が生じることが認められている²²⁾。したがって、RAの病態の成立にIL-8が何らかの形で関与している可能性が高いと考えられる。

近年、心筋梗塞を始めとする虚血性疾患において、血流が再灌流するさいに、過剰に供給された酸素が活性酸素となり組織に障害を与えるとともに、好中球を

表4 Non-infectious Diseases characterized by Neutrophil Infiltration or Neutrophilia

	Increased IL-8 Level in Body Fluids
Rheumatoid Arthritis	+
Gout	+
Psoriasis	+
Glomerulonephritis	?
Adult Respiratory Distress Syndrome	+
Immune Vasculitis	?
Inflammatory Bowel Diseases	+
Ischemia-reperfusion Syndrome	+
Chorioretinitis	?
Mediterranean Fever	?

主体とする白血球が局所に浸潤し、これらの浸潤してきた白血球が活性酸素をさらに生成し、組織に一層の障害を与えることが報告されている。このような病態は虚血・再灌流障害(ischemia-reperfusion syndrome)と総称される。

このような虚血・再灌流障害の代表的病態である心筋梗塞の発症初期において、血中IL-8濃度が上昇することを我々は見いだしている。しかし、この血中IL-8濃度と心筋障害の大きさとの間では、明かな相関は認められない。したがって、心筋梗塞時に血中で増加しているIL-8が、心筋梗塞の発症に如何に関与しているかについては、今後さらに検討する必要がある。

最近、我々はカドミウムを始めとする重金属やパラコートが、ヒト末梢血単核球のIL-8産生を誘導し、しかもこのさいこれらの重金属・薬剤によって生成が誘導された活性酸素が、IL-8産生誘導に関与していることも認めた。このことは、虚血・再灌流障害における組織障害の引き金である活性酸素が、IL-8産生を誘導し、これが白血球浸潤を引き起こすという機構の存在を示唆していると言える。今後、これら虚血・再灌流障害時における、活性酸素・白血球の相互関係にIL-8がどのような役割を果たしているかについて、検討することが必要であろう。

V. おわりに

IL-8のレセプターおよび産生調節機構について概略を述べた後、幾つかの病態における想定されるIL-8の役割について述べた。今後、種々の疾患においてIL-8の動態の研究が進むとともに、IL-8の病態の成

立への関与がどのようなものかが明かになることが期待される。また、レセプターあるいは産生調節機構の研究の進展によって、IL-8の作用あるいは産生を抑

える、新たな抗炎症療法が開発されることも期待される。

文 献

- 1) Tonooka, T., Nakayama, M., Matsumoto, S.: Human monocytederived chemotactic factor for granulocytes. *Immunology*, 39 : 607~613, 1980.
- 2) Yoshimura, T., Matsushima, K., Oppenheim, J.J., Leonard, E.J.: Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL 1). *J. Immunol.*, 139 : 788~793, 1987.
- 3) Yoshimura, T., Matsushima, K., Tanaka, S., Robinsons, E.A., Appella, E., Oppenheim, J.J., Leonard, E.J.: Purification of a human monocyte derived neutrophil chemotactic factor that shares sequence homology with other host defense cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84 : 9233~9237, 1987.
- 4) Matsushima, K., Morishita, K., Yoshimura, T., Lavu, S., Kobayashi, Y., Lew, W., Appella, E., Kung, H.F., Leonard, E.J., Oppenheim, J. J.: 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.*, 167 : 1883~1893, 1988.
- 5) Baldwin, E.T., Weber, I.T., St. Charles, R., Xuan, J.-C., Appella, E., Yamada, M., Matsushima, K., Edwards, B.F.P., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Wlodawere, A.: Crystal structure of interleukin 8: symbiosis of NMR and crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* 88 : 502~506, 1991.
- 6) Oppenheim, J.J., Zachariae, C.O.C., Mukaida, N., Matsushima, K.: Properties of the novel inflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu. Rev. Immunol.*, 9 : 617~648, 1991.
- 7) Wolpe, S.D., Cerami, A.: Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: members of a novel superfamily of cytokines. *FASEB J.*, 3 : 2565~2573, 1989.
- 8) Mukaida, N., Harada, A., Yasumoto, K., Matsushima, K.: Properties of proinflammatory cell typespecific leukocyte chemotactic cytokines, interleukin 8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF). *Microbiol. Immunol.*, 36 : 773~789, 1992.
- 9) Samanta, A.K., Oppenheim, J.J., Matsushima, K.: Identification of a specific receptor for monocytederived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) on human neutrophils. *J. Exp. Med.*, 169 : 1185~1189, 1989.
- 10) Basemer, J., Humber, A., Kuhn, B.: Specific binding, internalization, and degradation of human neutrophil activating factor by human polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.*, 264 : 17409~17415, 1989.
- 11) Samanta, A.K., Oppenheim, J.J., Matsushima, K.: Interleukin 8 (MDNCF) dynamically regulates its own receptor expression on human neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 265 : 8311~8316, 1989.
- 12) Holmes, W.E., Lee, J., Kuang, W.-J., Rice, G. C., Wood, W.I.: Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science*, 253 : 1278~1280, 1991.
- 13) Murphy, P.H., Tiffany, H.E.: Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science*, 253 : 1280~1283, 1991.
- 14) Lee, J., Kuang, W.-J., Rice, G.C., Wood, W. I.: Characterization of complementary DNA encoding the rabbit IL-8 receptor. *J. Immunol.*, 148 : 1261~1264.
- 15) Mukaida, N., Shiroo, M., Matsushima, K.:

- Genomic structure of the human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF)/interleukin 8. *J. Immunol.*, 143 : 1366~1371, 1989.
- 16) Mukaida, N., Mahe, Y., Matsushima, K. : Cooperative interaction of nuclear factor $\kappa\beta$ -and cisregulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by proinflammatory cytokines. *J. Biol. Chem.*, 265 : 21128~21133, 1990.
- 17) Yasumoto, K., Okamoto, S.-i., Mukaida, N., Murakami, S., Mai, M., Matsushima, K. : Tumor necrosis factor α and interferon γ synergistically induce interleukin 8 production in a human gastric cancer cell line through acting concurrently acting on AP-1 and NF- κ B like binding sites of the interleukin 8 gene. *J. Biol. Chem.*, 267 : 22506~22511, 1992.
- 18) Mukaida, N., Gusella, G.L., Kasahara, T., Ko, Y.-C., Zachariae, C.O.C., Kawai, T., Matsushima, K. : Molecular analysis of the inhibition of interleukin-8 production by dexamethasone in a human fibrosarcoma cell line. *Immunology*, 75 : 674~679, 1992.
- 19) Oliviera, I.C., Sciavolino, P.J., Lee, T.H., Vilcek, J. : Downregulation of interleukin 8 gene expression in human fibroblasts : unique mechanism of transcriptional inhibition by interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, (in press)
- 20) Martich, G.D., Danner, R.L., Ceska, M., Sufredini, A.F. : Detection of interleukin 8 and tumor necrosis factor in normal humans after intravenous endotoxin : the effects of antiinflammatory agents. *J. Exp. Med.*, 173 : 1021~1024, 1991.
- 21) Brennan, F.M., Zacharia, C.O.C., Chantry, D., Larsen, C.G., Turner, M., Maini, R.N., Matsushima, K., Feldman, M. : Detection of interleukin 8 biological activity in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and production of interleukin 8 mRNA by isolated synovial cells. *Eur. J. Immunol.*, 20 : 2141~2144, 1990.
- 22) Endo, H., Akahoshi, T., Takagishi, K., Kashiwazaki, S., Matsushima, K. : Elevation of interleukin-8 (IL-8) levels in joint fluids of patients with rheumatoid arthritis and the induction by IL-8 of leukocyte infiltration and synovitis in rabbit joints. *Lymphokine Cytokine Res.*, 10 : 245~252, 1991.
-