

Mini Review

COX-2 選択的阻害剤による Fas 誘導好中球
アポトーシスの促進効果

岩瀬正泰，南雲正男

昭和大学歯学部第二口腔外科学

Enhancement of Fas-mediated apoptosis in human neutrophils by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor

Previous studies have shown that apoptosis of neutrophils represents a physiologic clearance mechanism in the circulation and in the tissue to create and maintain homeostasis of neutrophil numbers. It is well known that spontaneous and Fas-mediated apoptosis of neutrophils can be regulated by proinflammatory mediators. The effects of a selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor, NS-398, on the Fas-mediated apoptosis in inflammatory stimuli-activated neutrophils were examined. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) and granulocyte-macrophage stimulating factor (GM-CSF) enhanced PGE₂ release through induction of COX-2, but not interleukin-1 (IL-1) and IL-8. TNF- α and GM-CSF-induced PGE₂ release was abolished by the addition of NS-398 (1 μ M), nevertheless NS-398 did not change the TNF- α and GM-CSF-induced expression of COX-2. Although not only GM-CSF but also IL-1 and IL-8 delayed Fas-mediated apoptosis in neutrophils, this effect was suppressed by the addition of NS-398 (100 μ M). On the contrary, TNF- α -treated neutrophils did not change the susceptibility to Fas-mediated apoptosis. These results suggest that selective COX-2 inhibitor not only suppresses PGE₂ release, but also enhances Fas-mediated apoptosis of cytokine activated-neutrophils. Recent studies have provided evidence that COX-2 inhibitor acts through a COX-2-independent mode of various cell functions. Therefore, the proapoptotic activity of selective COX-2 inhibitor may be independent of COX-2 activity. Considering these studies, selective COX-2 inhibitor may contribute to come to an end of acute inflammation via enhanced apoptosis of neutrophils.

Rec.11/7/2002, Acc.2/10/2003, pp175-180

Masayasu Iwase, Masao Nagumo

Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
Showa University School of Dentistry**Key words** neutrophils, cyclooxygenase-2 inhibitor, Fas, apoptosis, cytokines

シクロオキシゲナーゼ (COX) は、アラキドン酸からプロスタグランジン (PGs) やトロンボキサンなどの生理活性物質を合成する酵素である。COX は2つのアイソザイムからなり、恒常的に発現して胃液分泌・利尿・血小板凝集などの生理的な生体維持に作用している COX-1 と、サイトカイン、マイトージェンや LPS などの刺激によって誘導発現され、炎症状態で重要な役割を担っている COX-2 に分けられ、それぞれ生体内での役割が異なることが明らかになっている^{1,2)}。

非ステロイド性抗炎症剤 (NSAIDs) は COX の活性を

阻害し、エイコサノイドの産生を抑制することで抗炎症効果を発揮している。しかし、従来の NSAIDs は COX-1 および-2 の両方の活性阻害を持ち、胃粘膜障害、腎機能障害や血小板機能障害などの副作用を惹起する。近年、COX-2 活性のみを選択的に阻害して抗炎症作用を発揮し、副作用を減弱する COX-2 阻害剤が開発された^{3,4)}。

好中球は炎症性物質によって活性化され、その機能が賦活される。好中球が活性化されると種々の活性酸素種、セリンプロテアーゼの産生が亢進して炎症巣において生体防御に寄与するが、過剰の活性化は組織障害を惹起し

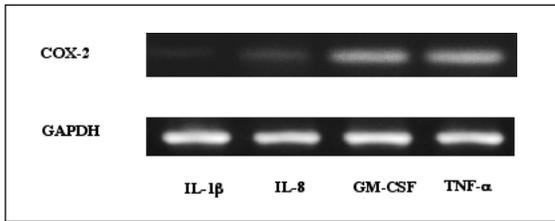


図1 ヒト末梢血好中球の COX-2 mRNA 発現に対する炎症性サイトカインの影響

好中球をIL-1 (100 ng/ml), IL-8 (100 ng/ml), GM-CSF (10 ng/ml), TNF- (10 ng/ml) で60分間処理した際の COX-2 mRNA発現をRT-PCRで検討した。GM-CSFおよびTNF- は、好中球のCOX-2 mRNA発現を誘導した。

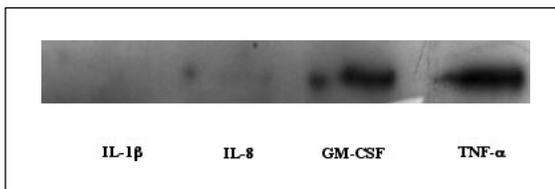


図2 ヒト末梢血好中球の COX-2 タンパク発現に対する炎症性サイトカインの影響

好中球をIL-1 (100 ng/ml), IL-8 (100 ng/ml), GM-CSF (10 ng/ml), TNF- (10 ng/ml) で3時間処理した際の COX-2タンパク発現をウエスタンブロット法で検討した。GM-CSFおよびTNF- は好中球のCOX-2タンパク発現を誘導した。

て生体に不利益をもたらすこともある^{5,6)}。したがって、好中球は血中や組織において急性炎症状態が終息する際、速やかにネクローシスではなくアポトーシスによって排除される必要がある⁷⁾。

固形癌組織に COX-2 が高発現しており、COX-2 選択的阻害剤は癌組織に対してアポトーシスの促進効果や血管新生の阻害作用を持つことが報告された^{8,9)}。最近、COX-2 選択的阻害剤は白血病細胞に対してもアポトーシスを亢進することが報告された^{10,11)}。

炎症性サイトカインによる好中球COX-2発現およびPGE₂放出

好中球はサイトカインやエイコサノイドを合成・放出し、炎症反応を修飾している¹²⁾。好中球はphorbol myristate acetate (PMA), formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP), 血清処理ザイモザン, lipopolysaccharide (LPS), tumor necrosis factor (TNF-), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) などの起炎物質の刺激によって mRNA およびタンパクレベルで COX-2 が発現誘

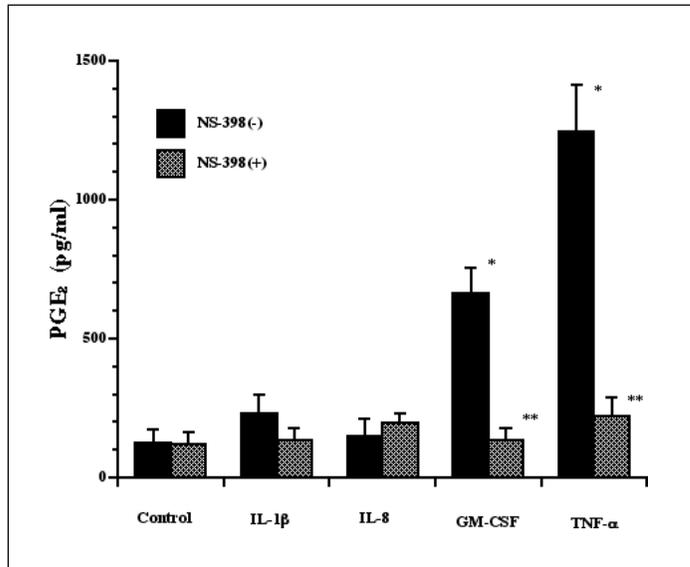


図3 ヒト末梢血好中球の PGE₂ 合成に対する炎症性サイトカインおよび COX-2 選択的阻害剤 NS-398 の影響

好中球をNS-398 (1 μM) の存在下または非存在下でIL-1 (100 ng/ml), IL-8 (100 ng/ml), GM-CSF (10 ng/ml), TNF- (10 ng/ml) で3時間処理した際の培養上清中のPGE₂濃度をELISAで測定した。好中球はGM-CSFおよびTNF- 処理によってPGE₂の合成を有意に亢進したが、NS-398 (1 μM) の存在下で有意に阻害された。サイトカイン未処理対サイトカイン処理; * p < 0.01, NS-398非添加対NS-398添加; ** p < 0.01

導され、その活性が亢進してPGE₂を合成することが知られている¹³⁻¹⁵⁾。われわれも独立してヒト末梢血から分離、精製した好中球を用いてTNF- およびGM-CSFについて同様の知見を得た(図1, 2, 3)。なお、好中球の分離は通法に従って、ヘパリン加末梢血をデキストラン沈降後、Ficoll-Hypaque比重遠沈法で行った。さらに分離した好中球は、エステラー染色で単球の混在がないことを確認した。起炎物質の刺激による好中球COX-2の発現誘導は、アクチノマイシンDやシクロヘキシミドの存在下で阻害される¹³⁻¹⁵⁾。一方、好中球のCOX-2の発現はinterleukin-4 (IL-4) やIL-10などの抗炎症性サイトカインの存在下では抑制されることも知られている^{13,15)}。さらに、IL-8やIL-1は好中球に対してCOX-2を誘導しないが、LPS刺激のCOX-2発現誘導にプライミング作用を持つことが報告されている¹⁴⁾。しかし、起炎物質によるCOX-2の発現誘導は、好中球と単球では異なる動態を示すという報告もある¹⁵⁾。さらに、免疫組織学的検索で炎症巣に浸潤している好中球にCOX-2の発現がみられる^{15,16)}。

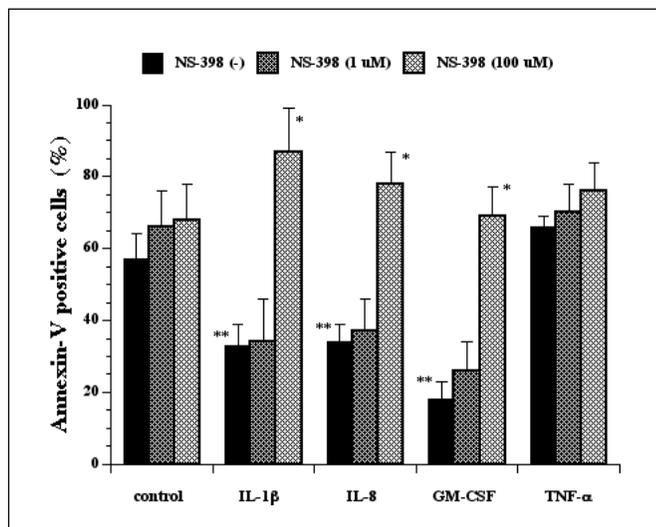


図4 ヒト末梢血好中球の Fas 誘導アポトーシスに対する炎症性サイトカインおよびCOX-2 選択的阻害剤 NS-398 の影響

好中球をIL-1 (100 ng/ml) ,IL-8 (100 ng/ml) ,GM-CSF (10 ng/ml) ,TNF- (10 ng/ml) の存在下で抗Fas抗体(CH-11; 100 ng/ml)で6時間処理した際のアポトーシス(Annexin V陽性細胞) の割合をFACSで解析した 好中球のFas誘導アポトーシスはIL-1 ,IL-8 ,GM-CSFによって有意に抑制された .一方 ,NS-398 (100 μ M) の添加でサイトカインのアポトーシス抑制作用は ,著しく阻害された .

サイトカイン未処理対サイトカイン処理; * $p < 0.01$, NS-398非添加対NS-398添加; ** $p < 0.01$

好中球COX-2発現およびPGE₂放出に対するCOX-2選択的阻害剤 NS-398の影響

好中球はCOX-2阻害剤の存在下でCOX-2の発現誘導は影響を受けないが,COX-2活性が抑制されてPGE₂の産生が減少される¹⁴⁾. COX-2 選択的阻害剤の一つである NS-398は,1 μ Mの濃度でGM-CSFおよびTNF- 刺激による好中球のPGE₂産生をほぼ完全に抑制した(図3). この結果より炎症性刺激による好中球のPGE₂の産生は,COX-2経路に依存していることが示唆される.

Fas誘導好中球アポトーシスに対する炎症性サイトカインの影響

好中球は *in vitro* および *in vivo* において自発的にアポトーシスに陥り 網内系によって組織から排除されることが知られている⁷⁾. さらに,好中球は細胞膜上に Fas 抗原の発現がみられ,抗 Fas 抗体やFas リガンドによってアポトーシスを生じる¹⁷⁻¹⁹⁾. 好中球は自らが Fas リガンドも発現し,自発的にアポトーシスに陥るとの報告もある¹⁸⁾. Fas 誘導アポトーシスの活性化経路の解明は 精力的な研究により明らかにされたことも多い. 詳細は他の総説に譲るが, Fas 発現細胞に抗 Fas 抗体や Fas リガンドが結合すると Fas・FADD・カスパーゼ-8によるDISCが形成され,以後カスパーゼ-8より下流のカスパーゼカスケードの活性化やBidの切断・活性化によるミトコンドリアを介するアポトーシス実行経路に移行する²⁰⁾. 自発的あるいはFas誘導による好中球のアポトーシスは 種々の炎症の修飾因子によって影響を受けることも多くの報告がなされている²¹⁻²³⁾. 例えば, GM-CSF, G-CSF, IL-1 , IL-2, IL-6, IL-8 などの炎症性サイトカインやLPSなどの存在によってアポトーシスの遅延が惹起され 好中球機能が保持されるこ

とが報告されている. われわれも GM-CSF, IL-1 , IL-8 が好中球のFas誘導アポトーシスを遅延することを見出した(図4). また,手術,熱傷,外傷などの急性炎症疾患患者の好中球は,Fas 誘導アポトーシスが遅延することも知られている²⁴⁻²⁶⁾. 急性炎症状態では好中球のアポトーシスが遅延して機能保存されることは有益であるが 組織障害の可能性も高まることが予想される. 一方で, TNF- やPMAは好中球のアポトーシスを亢進することも報告されている²⁷⁾. これらの炎症性刺激による好中球のアポトーシス感受性の変化は,チロシンキナーゼの関与を示唆する報告があるが不明な点も多い¹⁸⁾. COX-2を発現誘導するGM-CSFと誘導しないIL-1 による好中球のFas誘導アポトーシスの抑制は,同様のカスパーゼ活性を示した(図5). これらの結果は,炎症性サイトカインによる好中球のFas 誘導アポトーシスの遅延効果がCOX-2の発現誘導とは無関係であることを示唆している.

Fas誘導好中球アポトーシスに対するCOX-2選択的阻害剤 NS-398の影響

好中球は, PGE₂ 存在下でアポトーシスの遅延が起こるとの報告がある²⁸⁾. COX-2選択的阻害剤は,種々の固形癌細胞や白血病細胞に対して増殖抑制やアポトーシス誘導が報告されている^{9-11, 29-31)}. 最近の知見では, COX-2阻害剤のアポトーシス誘導はCOX-2非依存的に起こることも報告されている³²⁾. 例えば, COX-2阻害剤である celecoxibは,大腸癌細胞のCOX-2の発現にかかわらず細胞周期の停止やアポトーシスの誘導を示した³³⁾. COX-2阻害剤は, COX-2発現大腸癌細胞においてBax依存性,ミトコンドリアを介するアポトーシス経路を活性化することに対し, COX-2非発現 Jurkat 白血病細胞において Fas を介してカスパー

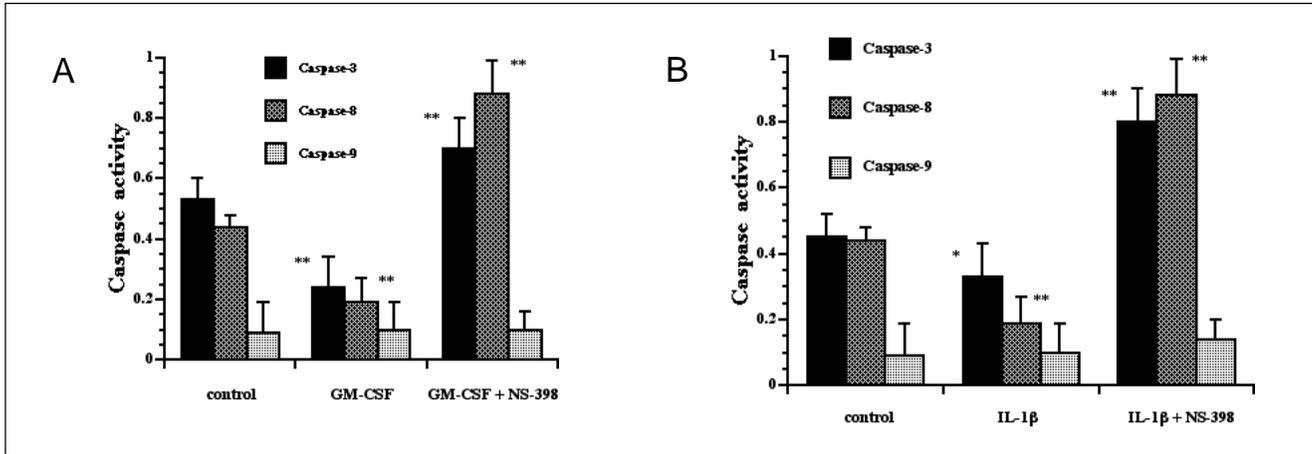


図5 ヒト末梢血好中球の Fas 誘導アポトーシスにおけるカスパーゼ活性に対する IL-1 , GM-CSF および COX-2 選択的阻害剤 NS-398 の影響

好中球をIL-1 (100 ng/ml),GM-CSF(10 ng/ml)の存在下で 抗Fas抗体 (CH-11; 100 ng/ml)で6時間処理した際のカスパーゼ-3 , -8 ,9活性をELISAで測定した 好中球のFas誘導アポトーシスにおけるカスパーゼ活性化はNS-398(100 μ M)の存在にかかわらずIL-1 とGM-CSFの処理において同様の動態を示した .
 コントロール対処理; * $p < 0.05$,** $p < 0.01$

ゼ-8 依存性のアポトーシス経路を活性化することが示された¹¹⁾. また, celecoxib は COX-2 非発現白血病細胞のアポトーシスを誘導する. さらに, celecoxib と rofecoxib の COX-2 阻害作用と抗炎症作用はほぼ同等であるが, celecoxib が顕著に抗腫瘍効果を示した¹⁰⁾. 最近, COX-2 阻害剤は低濃度でマクロファージの COX-2 活性を抑制し, 高濃度でアポトーシスを誘導したとの報告もある³⁴⁾.

サイトカインによる好中球のFas誘導アポトーシスの遅延は, COX-2の発現の有無にかかわらず生じた(図4). NS-398 はいずれの Fas 依存性アポトーシスの遅延を抑制したが, その濃度は 100 μ M であった. 一方, NS-398 は 1 μ M で COX-2 活性を抑制し, PGE₂ の産生を阻害した. さらに, NS-398 はサイトカインによる好中球の Fas 誘導アポトーシス抑制作用を阻害したが, これは COX-2 活性の誘導に関係なく同様のカスパーゼ経路を介したものであることが示唆された(図5). 以上の結果は, COX-2 選択的阻害剤 NS-398 が, COX-2 非依存性にサイトカインによる好中球のFas誘導アポトーシス遅延作用を阻害したことを示唆している.

おわりに

炎症反応の目的は組織を傷害する異物を破壊・除去し, 損傷した組織を修復することである. 一方, アポトーシスは不要になった自己細胞や異物化された細胞を排除する機構である. このように炎症とアポトーシスの目的は一部重複しており, 密接な関係を持つことが予想される. 本研究

で示した COX-2 選択的阻害剤による好中球の Fas 誘導アポトーシス促進作用は, その抗炎症作用機序の一つに挙げられる可能性を示唆している.

文 献

- 1) Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P: Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase-2 in inflammation and pain. Proc Natl Acad Sci USA, 91: 12013-12017, 1994.
- 2) Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE: Cyclooxygenase in biology and disease. FASEB J, 12: 1063-1073, 1998.
- 3) Hawkey CJ: COX-2 inhibitors. Lancet, 353: 307-314, 1999.
- 4) van Ryn J, Trummelitz G, Pairet M: COX-2 selectivity and inflammatory processes. Curr Med Chem, 7: 1145-1161, 2000.
- 5) Weiss SJ: Tissue destruction by neutrophils. N Engl J Med, 320: 365-375, 1989.
- 6) Smith JA: Neutrophils, host defense and inflammation. J Leukoc Biol, 56: 672-686, 1994.
- 7) Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C: Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation: programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. J Clin Invest, 83: 865-875, 1989.
- 8) Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL,

- Woerner BM, Edwards DA, Flickinger AG, Moore RJ, Seibert K: Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res*, 60: 1306-1311, 2000.
- 9) Li M, Wu X, Xu XC: Induction of apoptosis by cyclo-oxygenase-2 inhibitor NS398 through a cytochrome C-dependent pathway in esophageal cancer cells. *Int J Cancer*, 93: 218-223, 2001.
 - 10) Waskewich C, Blumenthal RD, Li H, Stein R, Goldenberg DM, Burton J: Celecoxib exhibits the greatest potency amongst cyclooxygenase (COX) inhibitors for growth inhibition of COX-2-negative hematopoietic and epithelial cell lines. *Cancer Res*, 62: 2029-2033, 2002.
 - 11) Han Z, Pantazis P, Wyche JH, Kouttab N, Kidd VJ, Hendrickson EA: A Fas-associated death domain protein-dependent mechanism mediates the apoptotic action of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the human leukemic Jurkat cell line. *J Biol Chem*, 276: 38748-38754, 2001.
 - 12) Cassatella MA: The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today*, 16: 21-26, 1995.
 - 13) Niuro H, Otsuka T, Izuhara K, Yamaoka K, Ohshima K, Tanabe T, Hara S, Nemoto Y, Tanaka Y, Nakashima H, Niho Y: Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils. *Blood*, 89: 1621-1628, 1997.
 - 14) Pouliot M, Gilbert C, Borgeat P, Poubelle PE, Bourgoin S, Creminon C, Maclouf J, McColl SR, Naccache PH: Expression and activity of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in agonist-activated human neutrophils. *FASEB J*, 12: 1109-1123, 1998.
 - 15) Maloney CG, Kutchera WA, Albertine KH, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA: Inflammatory agonists induce cyclooxygenase type 2 expression by human neutrophils. *J Immunol*, 160: 1402-1410, 1998.
 - 16) Tomlinson A, Appleton I, Moore AR, Gilroy DW, Willis D, Mitchell JA, Willoughby DA: Cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase isoforms in rat carrageenin-induced pleurisy. *Br J Pharmacol*, 113: 693-698, 1994.
 - 17) Iwai K, Miyawaki T, Takizawa K, Konno A, Ohta K, Yachie A, Seki H, Taniguchi N: Differential expression of bcl-2 and susceptibility to anti-Fas-mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes and neutrophils. *Blood*, 84: 1201-1208, 1994.
 - 18) Lies WC, Kiener PA, Ledbetter JA, Aruffo A, Klebanoff SJ: Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. *J Exp Med*, 184: 429-436, 1996.
 - 19) Ohashi M, Iwase M, Nagumo M: Changes in susceptibility to Fas-mediated apoptosis during differentiation of HL-60 cells. *J Leukoc Biol*, 67: 374-380, 2000.
 - 20) Nagata S: Apoptosis by death factor. *Cell*, 88: 355-365, 1998.
 - 21) Colotta F, Polentarutti FRN, Sozzani S, Mantovani A: Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood*, 80: 2012-2020, 1992.
 - 22) Watson RW, Rotstein OD, Jimenez M, Parodo J, Marshall JC: Augmented intracellular glutathione inhibits Fas-triggered apoptosis of activated human neutrophils. *Blood*, 89: 4175-4181, 1997.
 - 23) Renshaw SA, Timmons SJ, Eaton V, Usher LR, Akil M, Bingle CD, Whyte MK: Inflammatory neutrophils retain susceptibility to apoptosis mediated via the Fas death receptor. *J Leukoc Biol*, 67: 662-668, 2000.
 - 24) Chitnis D, Dickerson C, Munster AM, Winchurch RA: Inhibition of apoptosis in polymorphonuclear neutrophils from burn patients. *J Leukoc Biol*, 59: 835-839, 1996.
 - 25) Fanning NF, Porter J, Shorten GD, Kirwan WO, Bouchier-Hayes D, Cotter TG, Redmond HP: Inhibition of neutrophil apoptosis after elective surgery. *Surgery*, 126: 527-534, 1999.
 - 26) O'Neill S, O'Neill AJ, Conroy E, Brady HR, Fitzpatrick JM, Watson RW: Altered caspase expression results in delayed neutrophil apoptosis in acute pancreatitis. *J Leukoc Biol*, 68: 15-20, 2000.
 - 27) Takeda Y, Watanabe H, Yonehara S, Yamashita T, Sendo S, Sendo F: Rapid acceleration of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha. *Int Immunol*, 5: 691-694, 1993.
 - 28) Ottonello L, Gonella R, Dapino P, Saccheutti C, Dallegri F: Prostaglandin E₂ inhibits apoptosis in human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes: role of intracellular cyclic AMP levels. *Exp Hematol*, 26: 895-902, 1998.
 - 29) Sumitani K, Kamijo R, Toyoshima T, Nakanishi Y, Takizawa K, Hatori M, Nagumo M: Specific inhibition of cyclooxygenase-2 results in inhibition of proliferation of oral cancer cell lines via suppression of prostaglandin E₂ production. *J Oral Pathol Med*, 30: 41-47, 2001.
 - 30) Nakanishi Y, Kamijo R, Takizawa K, Hatori M, Nagumo M: Inhibitors of cyclooxygenase-2 (COX-2) suppressed the proliferation and differentiation of human leukemia cell

- lines. *Eur J Cancer*, 37: 1570-1578, 2001.
- 31) Toyoshima T, Kamijo R, Takizawa K, Sumitani K, Ito D, Nagumo M: Inhibitor of cyclooxygenase-2 induces cell-cycle arrest in the epithelial cancer cell line via up-regulation of cyclin dependent kinase inhibitor p21. *Br J Cancer*, 86: 1150-1156, 2002.
- 32) Elder DJ, Halton DE, Hague A, Paraskeva C: Induction of apoptotic cell death in human colorectal carcinoma cell lines by a cyclooxygenase-2 (COX-2)-selective nonsteroidal anti-inflammatory drug; independence from COX-2 protein expression. *Clin Cancer Res*, 3: 1679-1683, 1997.
- 33) Grosch S, Tegeder I, Niederberger E, Brautigam L, Geisslinger G: COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by selective COX-2 inhibitor celecoxib. *FASEB J*, 15: 2742-2744, 2001.
- 34) Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR: Selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 11693-11697, 1993.