第17回学術集会シンポジウム
各種病態における血管内皮細胞の応答

NO を介した微小血管内皮—白血球相互反応 の調節と病態

末 松 誠 合 田 亘 人 石 村 巽

NO and Microvascular Function—Roles in Regulation of Oxidative Stress

Makoto SUEMATSU, Nobuhito GODA, Yuzuru ISHIMURA

Key words: NO, oxidative stress, P-selectin, leukocyte adhesion endothelial cell.

はじめに

微小循環系とは内径数 100 μm の細動脈に始まり、真性毛細血管を経て同じく内径数 100 μm の細静脈に至る固有の機能をもつ循環単位である。流血中の白血球、特に急性炎症反応に関わる好中球の組織への集積が起こるのは後毛細血管細静脈が中心である。血管壁内面を構成する内皮細胞と好中球との接着メカニズムとしての接着分子の役割が注目されている。この接着分子の発現調節因子として細胞内で生成する oxidant の役割が注目されてきた。細胞内で生成される過酸化物は、多くの接着分子の発現に関与する転写因子である NF- κ B の活性化を起こすだけでなく、actin などの細胞骨格蛋白を修飾して細胞内分泌顆粒の放出反応にも関与するといわれている。しかしながら、微小循環における酸素ストレスの分布や時間経過を解析する手法が欠如していたため、生体内での酸素ストレスのメカニズムと細胞接着反応の相互関係は未だ十分には解析されていない。本稿では内皮細胞内の過酸化物生成メカニズムを概説し、その調子因子としての NO の役割について議論したい。

1. NO による細静脈における好中球接着反応の調節

O_2^- や H_2O_2 が白血球の内皮細胞への細胞接着に影響する因子であることが示されたのは 1980 年代後半のことである。Suzuki らは生体内に投与した SOD により好中球の rolling 現象が抑制されることを報告した¹⁾。また培養血管内皮細胞に膜透過性の oxidant である H_2O_2 を添加するとセレクトインファミリーの一つである P-selectin (GMP-140) が細胞表面に表出することが明らかにされた²⁾。このころ血管のトーンの調節因子として内皮由来因子である NO が見い出されたこと³⁾、さらに同じラジカル種である O_2^- との相互反応が注目されたこともあり、NO 自身が内皮の細胞接着性の調節を行う可能性が研究されはじめた。

Kubes らは構成型 NO 生成酵素の阻害剤である N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) をネコ腸間膜微小循環に添加した際に細静脈内皮細胞に好中球接着がおこり、これが抗 CD11/CD18 抗体 (IB4) により抑制されることを報告した⁴⁾。しかしその後、同様の実験がウサギ、ハムスター等で追試されたが、ネコと

同程度の細胞接着がおこることは報告されなかった。

ラットでは $100\ \mu\text{M}$ L-NAME を腸間膜微小循環に表面灌流すると約 30 分程度で好中球の rolling 現象の活性化が起こり 60 分程度で膠着現象が増強してくる⁵⁾。著者らは内因性の NO による好中球の接着現象の調節性が当初 Kubes らが考えていたような NO 自身の生理作用ではなく、NO が O_2^- を消去する内因性抗酸化物質として働いており、これが消去されると O_2^- の作用が現れるためと考えた。 O_2^- は生体内での消去酵素である SOD よりも同じラジカル種である NO と互いに速やかに反応し消去し合う。しかし一方では NO と O_2^- の相互反応により生成される ONOO^- は、さらに分解して NO_2 と $\cdot\text{OH}$ を生じることから、Beckman らは NO を介した酸素ストレスの増強メカニズムを提唱したことから⁶⁾、実際に細胞内過酸化物生成動態を解析する手法が必要となった。

2. 生体内酸素ストレスの解析法と内因性 NO 抑制の効果

著者らは細胞内空間に取りこまれ、酸化されて蛍光物質となるプローブである carboxydimethylchlorofluorescein (CDCFH) diacetate bis AM ester を用い微小循環系での酸素ストレスの分布と時間経過を解析した。この物質は非蛍光分子として細胞内に拡散し、水解され CDCFH となり、 H_2O_2 や lipid hydroperoxide により酸化され蛍光性の CDCF (Ex: 480 → Em: 530 nm) となる。ラット腸間膜微小循環に CDCFH diacetate を一定時間表面灌流後、前駆物質を洗浄、除去した後、L-NAME $100\ \mu\text{M}$ を表面灌流した際の CDCF 蛍光像と透過光線を交互に撮像した (図 1)。画像上の蛍光強度は、既知濃度の tert-butyl hydroperoxide (t-BuOOH) を 10 分間表面灌流した際の蛍光前駆物質の負荷部位 (細動脈, 細静脈壁, 肥満細胞) 各々での蛍光上昇度をあらかじめ複数のラットで測定し、画像の gray level と t-BuOOH 濃度

図 1⁵⁾ ラット腸間膜微小循環における L-NAME ($100\ \mu\text{M}$) による内因性 NO の抑制と細静脈内皮-好中球相互反応。下段は CDCF 蛍光の推移。細動・静脈壁 (A, V) の他、間質の肥満細胞 (Ma) にも蛍光の上昇が認められる。Bar = $50\ \mu\text{m}$, A, B, C は L-NAME 投与前, 30 分後, 60 分後を示す。

の関係は plot して calibration を行なった。これによると L-NAME 投与後の CDCF 蛍光の上昇は、好中球の細静脈への集積に先立ち起こること、また好中球が直接の相互反応を起こさない細動脈壁や肥満細胞でも蛍光の上昇が起こることが明らかとなった。一方 100 nM の fMLP を添加した際は細静脈に好中球接着は

おこるが、CDCF 蛍光の上昇は好中球接着部位に一致して上昇し、細動脈壁や肥満細胞には認められなかった (図 2)。

L-NAME により惹起される好中球接着反応は内皮上の ICAM-1, あるいは好中球の CD18 に対する抗体で抑制できる。しかし、ラット腸間膜では ICAM-1 は細静脈内皮で構成型分子

図 2⁵⁾ L-NAME 表面灌流時の好中球接着反応 (上段) と CDCF 蛍光強度 ([OOH]ex) の変動。1A29, WT3, PB1, 3 は各々抗 ICAM-1, CD18, P-selectin 単クローン抗体。MT は methotrexate 前処理による好中球減少群を示す。
*, * $p < 0.01$ † $p < 0.05$

表 1⁵⁾ L-NAME 惹起性の CDCF 蛍光上昇 ([OOH]ex) と鉄キレート剤 (desferioxamine, DFO) の効果。Fe-DFO はあらかじめ鉄を飽和させた control 群を示す。

Groups	L-NAME (n=8)	DFO L-NAME (n=5)	Fe-DFO+ L-NAME (n=5)
Venules			
[OOH]ex, mM	0.88±0.14	0.24±0.09*	0.86±0.22
Adherent leukocytes, n/100 μm segment	22.6±3.8	8.3±2.4*	23.6±4.4
Arterioles			
[OOH]ex, mM	0.60±0.12	0.19±0.08*	0.64±0.18
Mast cells			
[OOH]ex, mM	0.42±0.09	0.36±0.12	0.46±0.16

として表出していること (未発表データ) からこの反応が L-NAME により新たに惹起されたものとは考えにくい。一方この好中球接着反応が内皮上の selectin 分子の一つである P-selectin に対する抗体 (P.B1. 3) で抑制できること, また L-NAME により P-selectin の表出が細静脈で upregulate すること⁷⁾ から, NO の抑制により新たに惹起される接着分子は P-selectin であると思われる。

構成型 NO の抑制により血管内皮細胞で脂質過酸化反応が進むメカニズムは十分には明らかでない。NO と O_2^- が互いにキャンセルし合う量的平衡関係はラット分離灌流肝でわずかに報告されているのみであること⁸⁾, また内皮細胞由来の O_2^- の生成源が十分明らかにされていない点が未知の問題である。著者らが報告したように, L-NAME による内皮細胞における過酸化反応の上昇は, 鉄キレート剤投与により抑制されることから, 細胞内遊離鉄の関与が示唆された⁵⁾ (表 1)。一方, O_2 の生成源として従来注目されていた xanthine oxydase は, その阻害剤を用いた検討によりその関与が否定された (未発表データ)。血管内皮細胞におけるその他の O_2 の生成源として, NADH oxidoreductase が関与すると言われている⁹⁾ が, 詳細は不明である。内皮に存在する非ヘム鉄含有酵素である lipoxxygenase や cyclooxygenase といった脂質過酸化物生成系が NO により調節される可能性も含めさらに詳細を検討する必要がある。

文 献

- 1) Suzuki, M., Inauen, W., Kvietys, P.R., Grisham, M.B., Meininger, C., Schelling, M.E., Granger, H. J., Granger, D.N.: Superoxide mediates reperfusion-induced leukocyte endothelial cell interactions. *Am. J. Physiol.* **257**: H1740-H1745, 1989.
- 2) Lewis, M.S., Whatley, R.E., Cain, P., McIntyne, T.M., Prescott, S.M., Zimmerman, G.A.: Hydrogen peroxide stimulates the synthesis of platelet-activating-factor by endothelium and induces endothelial cell-dependent neutrophil adhesion. *J. Clin. Invest.* **82**: 2045-2055, 1988.
- 3) Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G., Moncada, S.: Nitric oxide accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. *Nature*. London **327**: 524-526, 1987.
- 4) Kubes, P., Suzuki, M., Granger, D.N.: Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 4651-4655, 1991.
- 5) Suematsu, M., Tamatani, T., Dehano, F.A., Miyasaka, M., Forrest, M., Suzuki, H., Schmid-Schönbein, G.W.: Microvascular oxidative stress preceding leukocyte activation elicited by *in vivo* nitric oxide suppression. *Am. J. Physiol.* **266** (Heart & Circ Physiol): H2410-H2415, 1994.
- 6) Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.M., Freeman, B.A.: Apparent hydroxyl radical production from peroxynitrite: implications for endothelial injury by nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 1620-1624, 1990.
- 7) Davenpeck, K.L., Gauthier, T.W., Lefer, A.M.: Inhibition of endothelial-derived nitric oxide promotes P-selection expression and actions in the rat microcirculation. *Gastroenterology* **107**: 1050-1058, 1994.
- 8) Bautista, A.P., Spitzer, J.J.: Inhibition of nitric oxide formation *in vivo* enhances superoxide release by the perfused liver. *Am. J. Physiol.* **266**: G783-G788, 1994.
- 9) Mohazzab, K.M., Kaminski, P.M., Wolin, M.S.: NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am. J. Physiol.* **266** (Heart & Circ. Physiol.): H2568-H2572, 1994.