エラスターゼによる血管内皮細胞障害の機序

藤田 浩*1,2), 森田育男*1), 石川恭三*2), 室田誠逸*1)

Synergistic effect of elastase and hydrogen peroxide on vascular endothelial cell injury

We examined the mechanism of the synergistic action of elastase and hydrogen peroxide on vascular endothelial cell injury, using cultured endothelial cells prelabeled with ^{51}Cr . Co-existence with elastase ($10\text{ }\mu\text{g/ml}$) and hydrogen peroxide ($50\text{ }\mu\text{M}$) induced severe endothelial cell injury, although each one of them alone had no such cytotoxicity at all. This synergistic effect was not based on the suppressed activities of the protective enzymes against oxidative stress, such as catalase and glutathione peroxidase, but related to hydroxyl radicals, because this injury was inhibited by deferoxamine mesylate. Moreover, α -1 antitrypsin and α -2 macroglobulin, which are physiologically present in the serum as protease inhibitors, showed protective action on the synergistic effect.

Therefore, some protease inhibitors may be beneficial to the diseases related to activated leukocytes, because they will suppress the endothelial cell injury elicited by active oxygen species released from leukocytes by inhibiting protease activity of leukocytes.

Hiroshi Fujita*1,2), Ikuro Morita*1),

Kyozo Ishikawa*2), Sei-itsu Murota*1)

key words: elastase, hydrogen peroxide, vascular endothelial cell injury

白血球は生体防御に重要な役割を果たしている一方、成人型呼吸窮迫症候群(adult respiratory distress syndrome, ARDS)のような病態では増悪因子の一つとして作用していることが知られている¹⁾。その病態では、活性化された白血球が産生する活性酸素、プロテアーゼ、アラキドン酸代謝産物、サイトカインなどが血管内皮細胞障害を惹起していると考えられている。白血球による血管内皮細胞障害は、これらのなかでも活性酸素によるものが主であるといわれていた。

筆者らは、活性化白血球による血管内皮細胞障害に対するプロテアーゼインヒビターの予防効果

を調べ、アプロチニンやウリナスタチンのようなプロテアーゼ活性の抑制効果が知られているプロテアーゼインヒビターは、白血球の活性酸素産生を抑制することなしにその血管内皮細胞障害を抑制することを報告した²⁾。このことは、白血球由来のプロテアーゼも血管内皮細胞障害に深く関与していることを示唆している。

そこで、白血球による血管内皮細胞障害におけるプロテアーゼの役割を解明する目的の一環として、過酸化水素とエラスターゼによる血管内皮細胞障害を例にとり、その機序について検討した。

方 法

(1) 試 薬

ブタ臍エラスターゼ、 α -1 antitrypsin, α -2 macroglobulin, SOD, Deferoxamine mesylate, catalase(Sigma 社), 白血球エラスターゼ(コスモバイオ社), NaN_3 , 過酸化水素(和光純薬), Cumene hydroperoxide(CHP, Nacalai tesque), NADPH, glutathione reductase(Boehringer Mannheim GmbH)

(2) 血管内皮細胞培養法

既報に準じ³⁾、ウシ頸動脈由来血管内皮細胞を単離し、10% fetal calf serum(FCS, Whittacker)含有 Eagle's minimum essential medium(MEM, Gibco)にて継代培養した。実験には20代までの細胞を用いた。同様にウシ冠動脈由来血管内皮細胞を単離し、20% FCS 含有 MEM で継代した。また、ヒト臍帯静脈内皮細胞は、既報の方法⁴⁾で単離し、20% FCS 含有 RPMI で継代した。

(3) 血管内皮細胞障害評価法

培養ウシ頸動脈由来血管内皮細胞を24穴ディッシュに播種し、subconfluent の状態で ^{51}Cr sodium chloride(Amersham 社) $2\text{ }\mu\text{Ci/ml}$ で18時間プレラベルする。その後、Hank's balanced salt solution(HBSS)で洗浄したのち、HBSS に溶かした過酸化水素やエラスターゼを添加し、5時間反応する。血管内皮細胞から遊離する ^{51}Cr 放出量を γ

*1) Section of Physiological Chemistry, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University 東京医科歯科大学 歯学部 顎口腔研究施設 顎口腔機能学教室

*2) The Second Department of Internal Medicine, School of Medicine, Kyorin University 杏林大学 医学部第二内科学教室

図1 血管内皮細胞のグルタチオンペルオキシダーゼおよびカタラーゼ活性の測定

シンチレーションカウンター(Packard 社)にて計測し、それを血管内皮細胞障害の指標とした。

$$\% \text{ specific } ^{51}\text{Cr release} (\% \text{ SR と略す}) = \frac{\text{experimental count} - \text{spontaneous count}}{\text{total count} - \text{spontaneous count}} \times 100$$

total count は、0.2% triton X, 0.1 NNaOH で血管内皮細胞を溶かしたものを計測したもので、ラベルされた全量をあらわす。spontaneous count は、HBSS 溶液のみを反応させたときの放出量をあらわす。

(4) 血管内皮細胞のグルタチオンペルオキシダーゼ、カタラーゼ活性測定(図1)

90 mm ディッシュで confluent になった血管内皮細胞をエラスターゼ 10 $\mu\text{g/ml}$ (HBSS 溶液) 5 時間反応させたあと、細胞をかきとった。その細胞が入った試験管を氷冷しながら、超音波破砕機(大岳製作所)を用いて細胞を出力 100 watts で、1 秒おきに30秒間、破砕した。その後、分光光度計(島津, UV-160)により、過酸化水素の紫外線吸光量減衰でカタラーゼ活性($\Delta 240 \text{ nm}$)、NADPH 吸光量の減衰にてグルタチオンペルオキシダーゼ活性($\Delta 340 \text{ nm}$)を測定した。蛋白定量は、Bradford(Bio-Rad protein assay)法を用いた。

(5) 統計学的処理

データはすべて平均値 $\pm$ SEM で示した。有意差検定は Student's t 検定を行った。

結果

まず、ブタ臍エラスターゼおよび過酸化水素それぞれ単独によるウシ頸動脈由来血管内皮細胞障害活性出現濃度を検討した(図2)。エラスターゼ単独添加では 30 $\mu\text{g/ml}$ まで障害活性は認められ

図2 エラスターゼおよび過酸化水素をそれぞれ単独に添加したときの血管内皮細胞障害

図3 エラスターゼと過酸化水素の共存による血管内皮細胞障害の相乗効果

上記の時間は過酸化水素を添加してからエラスターゼを加えるまでの間隔(分)であり、過酸化水素とエラスターゼとの共存反応時間は5時間である。エラスターゼ(EL)、過酸化水素(H₂O₂)の濃度はそれぞれ 10 $\mu\text{g/ml}$, 50 μM である。

なかったが、過酸化水素単独添加では 100 μM より有意な障害活性が認められた。

しかし、エラスターゼ 10 $\mu\text{g/ml}$ と過酸化水素 50 μM を同時添加すると、有意に障害活性が認められた($\% \text{ SR} = 28.0 \pm 1.3$, 図3)。そこで、以下の実験は、エラスターゼ 10 $\mu\text{g/ml}$, 過酸化水素 50 μM の濃度を用いた。この相乗効果は、過酸化水素の前処理の時間に依存的であり、エラスターゼを加えるまでの時間をあけると、40分より有意に増強効果が減少し、60分でその増強効果はほぼなくなった(図3)。このような増強効果は、ブタ冠動脈由来血管内皮細胞やヒト臍帯静脈内皮

表1 エラスターゼと過酸化水素によってもたらされる血管内皮細胞障害相乗効果における動物種差および血管部位差

% specific ^{51}Cr release		
BCAEC	H_2O_2	0.53 ± 0.09
	EL	0.10 ± 0.10
	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{EL}$	42.87 ± 3.33
BCOEC	H_2O_2	20.03 ± 1.10
	EL	3.67 ± 0.38
	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{EL}$	57.37 ± 2.40
HUVEC	H_2O_2	30.33 ± 2.23
	EL	1.22 ± 0.30
	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{EL}$	68.83 ± 0.22

BCAEC: bovine carotid artery endothelial cell
BCOEC: bovine coronary artery endothelial cell
HUVEC: human umbilical vein endothelial cell
エラスターゼ(EL), 過酸化水素(H_2O_2)の濃度は、それぞれ $10 \mu\text{g/ml}$, $50 \mu\text{M}$ である。

図4 白血球由来エラスターゼと過酸化水素によるヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞障害
エラスターゼ(EL), 過酸化水素(H_2O_2)の濃度は、それぞれ $10 \mu\text{g/ml}$, $50 \mu\text{M}$ である。

細胞においてもほぼ同様に認められ、種差、部位差はなかった(表1)。

また、ヒト白血球由来エラスターゼをブタ臍エラスターゼのかわりにヒト臍帯静脈内皮細胞に作用させても、その増強効果は同様に認められた(図4)。

つぎに、上記の血管内皮細胞障害に関して、血管内皮細胞の過酸化水素の主な消去系であるグルタチオンペルオキシダーゼ(GSH-Px)とカタラーゼの関与について検討した。カタラーゼ阻害剤である NaN_3 (0.5 mM) をエラスターゼと過酸化水

図5 血管内皮細胞の防御酵素に対するエラスターゼの影響

- a: 血管内皮細胞のカタラーゼ活性に対するエラスターゼの影響
b: 血管内皮細胞のグルタチオンペルオキシダーゼ活性に対するエラスターゼの影響

素とともに血管内皮細胞に添加すると、その障害活性は増強された。一方、カタラーゼ(700 U/ml)を同時添加すると、障害活性は打ち消された。SOD ($1,000 \text{ U/ml}$) には、抑制効果が認められなかったが、鉄キレート剤である deferoxamine mesylate 添加によって顕著な抑制が認められた。

つぎに、エラスターゼ添加の上記2種の消去酵素に及ぼす影響を検討した(図5)。エラスターゼ $10 \mu\text{g/ml}$ によりカタラーゼ活性は若干低下するものの有意でなく(図5a), GSH-Px 活性はむしろ上昇する傾向であった(図5b)。また、過酸化水素 $50 \mu\text{M}$ のみを5時間作用させても、血管内皮細胞のこれら防御因子には影響はなかった(カタラーゼ活性: コントロール群 8.8 ± 1.0 , 過酸化水素処理群 $10.6 \pm 0.8 \mu\text{mol/min/mg}$, NS. グルタチオンペルオキシダーゼ活性: コントロール群

図6 エラスターゼと過酸化水素の共存によってもたらされる血管内皮細胞障害相乗効果に対する α -1 antitrypsinの効果

エラスターゼ(EL), 過酸化水素(H₂O₂)の濃度はそれぞれ 10 μ g/ml, 50 μ M である。

7.7 $\pm$ 1.0, 過酸化水素群 5.7 $\pm$ 0.2 nmol/min/mg, NS.)

つぎにエラスターゼと過酸化水素の共存による血管内皮細胞障害相乗作用に対するプロテアーゼインヒビターの効果を検討した。 α -1 antitrypsinを同時添加すると、その相乗効果は有意に抑制された(図6)。次いで α -2 macroglobulinの効果を検討したところ、同様に用量依存性に抑制した(図7)。

考 察

白血球プロテアーゼ単独では血管内皮細胞障害を起こすことはないが、プロテアーゼ活性によって細胞形態は変化し、血管透過性の亢進が起こることは知られている。また、プロテアーゼは白血球の活性酸素産生を増加させるプライミング効果を持つことが知られている⁵⁾。また、活性酸素と協調して組織障害を助長することが知られている⁶⁾。

一方、プロテアーゼインヒビターによる白血球障害の抑制機序に関し、内因性プロテアーゼインヒビターである α -1 antitrypsinが白血球で産生される次亜塩素酸により失活されるという報告⁶⁾や、添加したプロテアーゼインヒビターにより、白血球のスーパーオキシドアニオン産生が抑制されたという報告⁷⁾がなされている。

図7 エラスターゼと過酸化水素の共存によってもたらされる血管内皮細胞障害相乗効果に対する α -2 macroglobulinの効果

エラスターゼ(EL), 過酸化水素(H₂O₂)の濃度はそれぞれ 10 μ g/ml, 50 μ M である。

筆者も、すでにプロテアーゼインヒビターであるアプロチニンやウリナスタチンが白血球惹起血管内皮細胞障害を抑制することを報告している²⁾。これらのプロテアーゼインヒビターは、その構造から考えてラジカルスカベンジャー作用を持っていることは考えづらい。一方、白血球の活性酸素産生に対してもこれらプロテアーゼインヒビターは、なんら影響を与えなかった。このことは、白血球のプロテアーゼは血管内皮細胞に働き、白血球惹起障害を助長している可能性を示している。

今回、エラスターゼ、過酸化水素それぞれ単独では障害を起こせない濃度を用いた場合、両者を共存させると著明な障害が発現した。この相乗効果は過酸化水素が血管内皮細胞で十分消去できる条件下においてはその効果がなくなったことから、エラスターゼの作用は、①血管内皮細胞の活性酸素種消去系の抑制、②フェントン反応のようなより毒性を持った物質への転換の促進、③過酸化水素による血管内皮細胞膜の過酸化反応に対する感受性の亢進、などの可能性が考えられた。③の可能性に関しては、今後検討が必要であるが、エラスターゼが、グルタチオンペルオキシダーゼやカタラーゼの酵素活性を低下することはなかった(図5)ことから、①の可能性は低いことが示唆された。

また、鉄キレート剤である deferoxamine mesy-

late でこの相乗効果は抑制されたことから、この反応にヒドロキシルラジカルの関与が示唆された。ヒドロキシルラジカルは、血管内皮細胞内で2価の鉄イオンの介在によりフェントン反応で生成される。その際、3価鉄イオンを2価イオンにするものとして、スーパーオキシドアニオンが知られている。エラスターゼは、キサンチンオキシダーゼを活性化するという報告⁸⁾があることより、エラスターゼは血管内皮細胞のキサンチンオキシダーゼを活性化させ、その結果生ずるスーパーオキシドアニオンが3価を2価の鉄に変え、結果的に過剰な過酸化水素と反応してヒドロキシルラジカルをより産生している可能性は興味ある機序であると思われる。

また、その効果を発揮するには、その酵素活性自体が必要であることが明らかとなった(図6, 7)。しかし、その酵素活性が細胞膜の過酸化反応やキサンチンオキシダーゼの活性化にどのように結びついているのか不明である。

今後、エラスターゼのようなプロテアーゼが過酸化水素の障害を増悪している機序に関し、さらに検討する必要があるが、プロテアーゼ活性を抑制すれば、白血球の産生する活性酸素による血管内皮細胞障害を予防しうることから、白血球が主体となっている病態、ARDSなどにはプロテアーゼインヒビターが一つの有効な治療法になる可能

性があり、臨床的研究の発展が望まれるところである。

文 献

- 1) Weiland, J.E., Davis, W.B., Holter, J.F., Mohammed, J.R., Dorinsky, P.M., Gadek, J.E.: Lung neutrophils in the adult respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.* 133: 218-225, 1986.
- 2) 藤田 浩, 森田育男, 室田誠逸: 白血球による血管内皮細胞障害に対する各種プロテアーゼインヒビターの効果. *炎症* 11: 501-502, 1991.
- 3) Abe, M., Morita, I., Murota, S.: A new *in vitro* method using Fura-2 for the quantification of endothelial cell injury. *Prostaglandins Leucotriens and Fatty Acids* 34: 69-74, 1988.
- 4) 中浜健一, 室田誠逸: ヒト臍帯静脈内皮細胞の培養法. *血管と内皮* 1: 81-83, 1991.
- 5) Kusner, D.J., King, C.H.: Protease-modulation of neutrophil superoxide response. *J. Immunology* 143: 1696-1702, 1989.
- 6) Weiss, S.J.: Tissue destruction by neutrophils. *New Engl. J. Med.* 320: 365-376, 1989.
- 7) 古田憲正, 吉川敏一, 近藤元治: ヒト多核白血球のウミホタルルシフェイン誘導体依存性化学発光に対するプロテアーゼインヒビターの影響. *医学のあゆみ* 140: 765-766, 1987.
- 8) Rodell, T.C., Cheronis, J.C., Ohnemus, C.L., Piermattei, D.J., Repine, J.E.: Xanthine oxidase mediates elastase induced injury to isolated lungs and endothelium. *J. Appl. Physiol.* 63: 2159-2163, 1987.