白血球由来エラスターゼの血管内皮細胞障害機序

藤田 浩*

Role of leukocyte derived elastase in vascular endothelial cell injury

The author studied a role of leukocyte-elastase in vascular endothelial cell injury induced by activated leukocytes. Using an interactive laser cytometer with ACAS 570, the intracellular peroxide level was determined in dichlorofluorescein-diacetate (DCFDA) pre-labeled vascular endothelial cells. Addition of elastase (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) to the monolayer of the prelabeled endothelial cells induced an increase in fluorescence intensity in cells. The increase in fluorescence was inhibited by such protease inhibitors as α -1 antitrypsin and α -2 macroglobulin. Moreover, pretreatment of the endothelial cells with allopurinol, xanthine oxidase inhibitor, abolished the increase in the fluorescence of the DCFDA prelabeled endothelial cells exposed to elastase.

These data suggest that the activity of leukocyte elastase is related to the production of peroxide in endothelial cells. Elastase may activate xanthine oxidase or increase the conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase, and it may be deeply involved in vascular endothelial cell injury elicited by activated leukocytes.

Hiroshi Fujita*

key words : leukocyte elastase, vascular endothelial cell injury, xanthine oxidase

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として作用していることは知られている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、そのなかでも主に活性酸素によるものと考えられていた。

われわれは、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報告した²⁾。アプロチニンやウリナスタチン

図1 白血球エラスターゼによる培養血管内皮細胞内ペルオキシド産生の促進効果(経時変化)

個々の細胞の蛍光量の変化率をグラフに示す。データは方法で述べたように平均値 $\pm$ SEで表示している。(** : $P < 0.01$, エラスターゼ添加前の蛍光量に対して)

のような比較的白血球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抑制なしにその血管内皮細胞障害を抑制したことを示した。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。

さらに、われわれはプロテアーゼのなかのエラスターゼに注目し、エラスターゼには過酸化水素の血管内皮細胞障害に対し相乗効果があることを報告した³⁾。その血管内皮細胞障害相乗効果は生理的に血中に存在しているインヒビターである α -1 アンチトリプシン、 α -2 マクログロブリンの共存下では抑制された。また、その相乗効果は鉄キレート剤であるデフェロキサミンにより完全に抑制された。以上のことから、エラスターゼの血管内皮細胞障害相乗効果の機序として、エラスターゼによる過酸化水素からのヒドロキシルラジカル産生亢進効果があることが示唆された。

今回、エラスターゼが過酸化水素との相乗効果の発現に血管内皮細胞内で活性酸素を産生させている可能性を検討するために、細胞内ペルオキシドに反応し蛍光を発する2,7-ジクロロフロセ

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

図2 白血球エラスターゼによる培養血管内皮細胞内ペルオキシド産生の促進効果(ACAS 570 による画像)
(A) エラスターゼ添加前, (B) 添加5分後, (C) 添加10分後, (D) 添加15分後

ン・ジアセテートを血管内皮細胞にプレラベルすることにより, エラスターゼによる血管内皮細胞内ペルオキシド産生量を定量し, その影響について検討した。

方 法

(1) 試 薬

α -1 antitrypsin, α -2 macroglobulin, allopurinol (Sigma 社), 白血球エラスターゼ, カテブシンG (コスモバイオ), 2,7-ジクロロフルオレセイン・ジアセテート(和光純薬)

(2) 血管内皮細胞培養法

既報に準じ⁴⁾, 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。

(3) 血管内皮細胞内ペルオキシド測定

24穴ディッシュ(コニング社)に培養血管内皮細胞を播種し, コンフルエントになった時点で $5 \mu\text{M}$ ジクロロフルオレセイン・ジアセテート, DCFDA(Hanks' balance salt solution, HBSS)にて30分間プレラベルする。細胞内に取り込まれたDCFDA は, 細胞質に存在するエステラーゼによってアセチル基がとれ, DCF となる。細胞内にDCF 分子からプロトンをとるペルオキシド(過酸化水素など)が存在すると, DCF は蛍光を発する⁵⁾。HBSS にて5回洗浄したあと, その蛍光量を5 W アルゴンレーザー励起の蛍光顕微鏡(ACAS 570, Meridian社)にて測定する。白血球由来エラスターゼを添加する前の血管内皮細胞内ペルオキシド量を, 下記の条件で測定する。

レーザー出力: 100~150 mW(レーザー 励起波長: 488 nm), フォトマルチプライアーチューブ:

図3 白血球エラスターゼによる培養血管内皮細胞内ペルオキシ酸産生の促進効果（用量反応性）

25～30%。1画面に約10細胞を設定し、白血球由来エラスターゼを添加したあと、同一の画面で個々の細胞の蛍光量の変化を測定する。

蛍光変化量＝添加後の蛍光量÷添加前の蛍光量
(4) 統計処理

データは平均値±SEで示してある。有意差検定は、Studentのt検定で行った。

結果

DCFDAでプレラベルした血管内皮細胞にエラスターゼ5μgを添加すると、血管内皮細胞内の蛍光量が増加した(図1)。その増加は添加後5分で有意に上昇し($P < 0.01$)、15～30分でピークに達し、以後減光した。図2は、実際にACAS 570で得られた画像を示す。添加前は血管内皮細胞は、低蛍光量を示す紫色～青色を呈している。そこにエラスターゼを添加すると、個々の細胞間では程度の差はあるが、時間依存性に高蛍光量を示す黄緑～赤色を呈するようになった。

つぎに、エラスターゼ1, 5, 10μgを添加したところ、図3のように用量依存性を示した。図3にエラスターゼ添加後5分の蛍光量を示しているが、1μgより有意に増加した($P < 0.01$)。10μgを添加したときは10分以後は細胞の形態変化がいちじるしいため、以下の実験は1あるいは5μgを使用した。

つぎにエラスターゼによる細胞内ペルオキシ酸産生機序について検討した。エラスターゼに対する生理的に存在するインヒビターであるα-1アンチトリプシン、α-2マクログロブリンによる効果を検討した。エラスターゼ5μgを添加すると、

図4 白血球エラスターゼによる培養血管内皮細胞内ペルオキシ酸産生増強に対するα-1アンチトリプシンの効果

** : $P < 0.01$, エラスターゼ単独添加群（コントロール）の蛍光量に対して

図5 白血球エラスターゼによる培養血管内皮細胞内ペルオキシ酸産生増強に対するα-2マクログロブリンの効果

** : $P < 0.01$, エラスターゼ単独添加群（コントロール）の蛍光量に対して

図4に示すように細胞内蛍光量が時間依存性に増加した。一方、α-1アンチトリプシン50μgを共存させておくと、その蛍光量の上昇が抑制された。同様に、α-2マクログロブリン50μgを共存させておくと、エラスターゼ5μgによる血管内皮細胞の蛍光量増加を抑制した(図5)。エラスターゼによる血管内皮細胞内のペルオキシ酸産生には、この酵素活性の関与が示唆された。

つぎに、血管内皮細胞の代表的な活性酸素産生系の一つであるキサンチンオキシダーゼの阻害剤であるアロプリノールの効果を検討した。血管内皮細胞にアロプリノール(1mM)を18時間前処理したあとに、培養上清中に残存したアロプリノールを取り除くために十分洗浄し、エラスターゼ5μgを添加すると、無処理群にくらべると有意に蛍光量の増加が抑制された(図6)。同様にカタレプシンG10μgを血管内皮細胞に添加すると、時

図6 白血球エラスターゼによる培養血管内皮細胞内ペルオキシド産生増強に対するアロプリノールの効果

** : $P < 0.01$, エラスターゼ単独添加群(コントロール)の蛍光量に対して

図7 白血球カテプシンGによる培養血管内皮細胞内ペルオキシド産生増強に対するアロプリノールの効果

** : $P < 0.01$, カテプシン G 単独添加群(コントロール)の蛍光量に対して

間依存性に細胞内蛍光量の増加がみられる(図7)が、血管内皮細胞を18時間アロプリノール(1 mM)前処置しておくと、その蛍光量の増加が抑制された(図7)。

考 察

白血球は、炎症や低酸素-再灌流時に血管内皮細胞間を通して組織に浸潤することが知られている。白血球はプロテアーゼ、特にエラスターゼ、カテプシンG、コラゲナーゼ、ゲラチナーゼを分泌し細胞外基質を溶かし、血管外に浸出し組織に到達する。一方、プロテアーゼは血管内皮細胞に対してさまざまな作用を持っている。白血球プロテアーゼのなかでエラスターゼは分泌量が多く、しかも疾患との関連も知られ、その研究報告は多い。エラスターゼは血管内皮細胞の細胞内Ca濃

図8 白血球エラスターゼによる血管内皮細胞障害の機序仮説

XD: xanthine dehydrogenase

XO: xanthine oxidase

Ca: calcium

SOD: superoxide dismutase

H₂O₂: hydrogen peroxide

度を上昇させ、細胞収縮反応を起こし、形態変化をもたらす。その結果、血管透過性が昂進する。

また、エラスターゼは血管内皮細胞のプロスタサイクリン産生能を抑制し⁶⁾、血小板活性化因子産生を高める⁷⁾。その結果として、血小板凝集促進、白血球の血管内皮細胞への粘着を促進することが予想される。敗血症、成人型呼吸窮迫症候群、急性心筋梗塞のような病態では血中白血球由来エラスターゼ値が上昇していることから⁸⁾、上述したように白血球エラスターゼが血管内皮細胞に作用し、病態の発症、進展に深く関与していると思われる。白血球の分泌しうるエラスターゼ量だけでは血管内皮細胞死を引き起こすことはできない³⁾。

しかし、活性化白血球による血管内皮細胞障害をプロテアーゼインヒビターが抑制することから、プロテアーゼがその細胞障害に関与していることがわかった²⁾。また、エラスターゼは過酸化水素による血管内皮細胞障害を増強する作用があることを報告した³⁾。その相乗効果の機序は、デフェロキサミンにより抑制されることからヒドロキシルラジカル産生促進効果と考えられた。

そこで、図8に示すようにエラスターゼの血管内皮細胞障害機序は、血管内皮細胞の貯蔵鉄である3価鉄を2価鉄に還元することにあるという仮説をたてた。つまり、その2価鉄は外から入って

きた過酸化水素をヒドロキシルラジカルに変換する(フェントン反応)。そのヒドロキシルラジカルが著明な細胞障害活性を示す。その3価鉄を2価鉄に還元するものの一つとして、スーパーオキシドアニオンが考えられる。

Sundqvist は、血管内皮細胞が無刺激な状態においても常時過酸化水素を産生していることを報告している⁹⁾。Zweiser らは、血管内皮細胞を低酸素-再灌流状態にすると、ヒドロキシルラジカル産生が起これ、その産生をキサンチンオキシダーゼインヒビターであるアロプリノールやオキシプリノールで抑制されることを報告している¹⁰⁾。

in vivo の熱傷実験モデルにおいても、アロプリノールを使用することによって、熱傷による血管透過性昂進を抑制することから、キサンチンオキシダーゼは熱傷時浮腫の原因である血管内皮細胞障害を引き起こすことが知られている¹¹⁾。

血管内皮細胞は常に酸化ストレスにさらされており、通常ではキサンチンデヒドロゲナーゼ(XD)の形で優位に存在しており、酸素が存在してもスーパーオキシドアニオン産生が少ないようになっている。ところが、低酸素や熱傷などの病態では、キサンチンデヒドロゲナーゼからキサンチンオキシダーゼ(XO)への変換が起これ、血管内皮細胞内では少量といわれているキサンチン(培養血管内皮細胞を継代していくと少なくなる)を基質にして、キサンチンオキシダーゼによってスーパーオキシドアニオンが産生されるようになる。それは即スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)によって過酸化水素になる。

そこで、血管内皮細胞内に過酸化水素のようなペルオキシドが存在すると蛍光を発する試薬、DCFDA を前処置しておく。そこにエラスターゼを添加すると、血管内皮細胞の蛍光量を増加させた(図1, 2)。しかも、それはエラスターゼ用量依存性で、時間依存性であった(図1, 3)。このことはエラスターゼは血管内皮細胞内にペルオキシドを産生させる作用があることを示している。

このエラスターゼの細胞内ペルオキシド産生効果は、その酵素活性を抑制することによって抑制される(図4, 5)。つまり、その酵素活性が細胞内ペルオキシドを増加させている。このことは、エラスターゼと過酸化水素との血管内皮細胞

障害の相乗効果が、そのプロテアーゼインヒビターによって抑制されることと関連がある⁹⁾。そのエラスターゼによって血管内皮細胞内に産生されたペルオキシドが、過酸化水素による細胞障害活性を高めていると考えられる。

図8の仮説に示すように、ペルオキシド、過酸化水素が細胞内に増加して細胞障害を引き起こすのではなく、その前駆物質であるスーパーオキシドアニオンが多量に発生し、鉄の還元を介して細胞障害を惹起している(ハーバー・ワイス反応)と考えられる。

つぎに血管内皮細胞の主なスーパーオキシドアニオン産生系であるキサンチンオキシダーゼ系の関与を検討した。その阻害剤であるアロプリノールを前処置した血管内皮細胞では、エラスターゼによるペルオキシド産生は抑制された(図6)。エラスターゼによる血管内皮細胞内ペルオキシド産生は、キサンチンオキシダーゼを介して行われることを示している。

図8に示すようにエラスターゼは、キサンチンオキシダーゼの活性化あるいはキサンチンデヒドロゲナーゼからキサンチンオキシダーゼへの変換促進をもたらし、スーパーオキシドアニオンを生成することが予想される。これが鉄の還元を引き起こし、過酸化水素による血管内皮細胞障害を増強させる。エラスターゼによる血管内皮細胞内ペルオキシド産生はデフェロキサミンでは抑制されないことから、そのペルオキシドはヒドロキシルラジカルによって蛍光を発していないことがいえる(データ未発表)。

アロプリノールはヒドロキシルラジカルスカベンジャーとして知られているが、この蛍光色素は過酸化水素のようなペルオキシドによって蛍光を発するが⁵⁾、ヒドロキシルラジカルと反応しないことから、アロプリノールの抑制効果はそのラジカルスカベンジャー作用でないと考えている。図8の仮説はエラスターゼと過酸化水素とがもたらす血管内皮細胞障害の相乗効果をうまく説明することができるのと同時に、活性化白血球による血管内皮細胞障害がアロプリノール前処置によって約50%抑制される事実をもうまく説明することができる。

また、その系で、XO 活性が消失している血管内皮細胞(継代培養を繰り返すと XO 活性が消失

する)を用いると、アロプリノールの抑制効果が消失することから、前処置したアロプリノールはXO活性を抑制することで効果を発揮し、ラジカルスカベンジャーとして働いていないといえる(データ未発表)。

エラスターゼによって産生増強されたスーパーオキシドはSODによって過酸化水素になり、ペルオキシドとして検出される。この反応は白血球由来カタペシンGによっても認められ(図7)、活性化白血球はこれらプロテアーゼを分泌することによって、血管内皮細胞のキサンチンオキシダーゼを活性化あるいはキサンチンデヒドロゲナーゼからの変換を促進し、白血球から産生された過酸化水素と相乗的に作用しあって、血管内皮細胞障害を引き起こすものと考えられる。

白血球による血管内皮細胞障害が病態の基礎になっている成人型呼吸窮迫症候群や急性心筋梗塞再灌流障害において血中白血球エラスターゼの上昇がみられることから、種々のプロテアーゼインヒビターがこれらの疾患の治療・予防に臨床面で大いに期待がもてるものと思われる。

エラスターゼがどのような機序で血管内皮細胞のキサンチンオキシダーゼ活性化を引き起こすかを現在検討中である。

この稿を終えるにあたり、血管内皮細胞培養法をはじめとする実験、研究をご指導、ご校閲してくださいました東京医科歯科大学大学院細胞機能制御学講座、室田誠逸教授、森田育男助教授に深甚の謝意を表します。若林良之君をはじめ細胞制御学講座教室員の先生方に感謝いたします。また、研究に臨的なご助言やご校閲してくださいました杏林大学第二内科石川恭三教授、柳沢講師に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Weiland, J.E., Davis, W.B., Holter, J.F., Mohamed, 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) 藤田 浩, 森田育男, 石川恭三, 室田誠逸: エラスターゼによる血管内皮細胞障害の機序. *炎症* 12: 155-159, 1992.
- 4) 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.
- 5) Bass, D.A., Parce, W., Dechatelet, L.R., Szejda, P., Seeds, M.C., Thomas, M.: Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils. *J. Immunol.* 130: 1910-1917, 1983.
- 6) Weksler, B.B., Jaffe, E.A., Brower, M.S., Cole, O.F.: Human leukocyte cathepsin G and elastase specifically suppress thrombin-induced prostacyclin production in human endothelial cells. *Blood* 74: 1627-1634, 1989.
- 7) Camussi, G., Tetta, C., Bussolino, F., Baglioni, C.: Synthesis and release of platelet activating factor is inhibited by plasma α -1 proteinase inhibitor or α -1 antichymotrypsin and is stimulated by proteinases. *J. Exp. Med.* 168: 1293-1306, 1988.
- 8) 小川道雄・編: 好中球エラスターゼ. ヘス出版, 1992, p 126-192.
- 9) Sundqvist, T.: Bovine aortic endothelial cells release hydrogen peroxide. *J. Cell. Physiol.* 148: 152-156, 1991.
- 10) Zweiser, J.L., Kuppusamy, P., Lutty, G.A.: Measurement of endothelial cell free radical. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4046-4050, 1988.
- 11) Till, G.O., Guilds, L.S., Mahrougui, M., Friedl, H.P., Trentz, O., Ward, P.A.: Role of xanthine oxidase in thermal injury of skin. *Am. J. Pathol.* 135: 195-202, 1989.

*

*

*