肺血管内皮細胞における接着分子の発現とその制御

——細胞内レドックス環境および転写因子 NF- κ B の関与——

坂東政司・石井芳樹・北村 諭*

Intracellular redox state regulates activation of nuclear factor κ B and expression of the genes for adhesion molecule in human pulmonary artery endothelial cells

Transcription factor nuclear factor κ B (NF- κ B) controls gene expression of a number of genes including endothelial cell adhesion molecules such as E-selectin and ICAM-1. These cell adhesion molecules are known to play important roles in a critical step of acute lung injury. We tested the hypothesis that TNF α -induced ICAM-1 and E-selectin gene expression requires perturbation of cellular redox equilibrium, and the subsequent activation of redox sensitive transcription factor NF- κ B that binds to its cognate promoter sequences leading to increased transcription of ICAM-1 and E-selectin genes in pulmonary artery endothelial cells. Stimulation of human pulmonary artery endothelial (HPAE) cells with TNF α (100 U/ml) decreased intracellular glutathione (GSH) content (~80%) with a concomitant increase in oxidized GSH (GSSG), activated NF- κ B, and enhanced the transcription of ICAM-1 and E-selectin genes. Pretreatment with N-acetyl-L-cysteine (NAC), an antioxidant and precursor for GSH synthesis, for 0.5 h prevented the decrease in GSH content, inhibited the activation of NF- κ B, and the lack of activated NF- κ B prevented the activation of the ICAM-1 and E-selectin promoters and thereby the transcription of these genes. These results indicate the involvement of oxidant-dependent NF- κ B activation in this pathway and the feasibility of using antioxidant or anti-NF- κ B reagents in preventing acute lung injury associated with TNF α release.

Rec. 4/7/1998, Acc. 4/20/1998, pp 39~46

Masashi Bando・Yoshiki Ishii・Satoshi Kitamura

key words : acute lung injury, adhesion molecule, signal transduction, redox state, antioxidant, NF- κ B

レドックス (oxido-reduction: redox) 反応は、生体高分子の生物学的活性や機能にかかわる酸化還元反応の総称であり、人類を含む好気性生物にとって活性酸素やフリーラジカルによる酸化ストレスは、SOD (superoxide dismutase) やカタラーゼ、グルタチオン系などの保護装置からなるレドックス制御機構により適切なバランスが保たれている^{1,2)}。

近年、このレドックス環境の変化が炎症・免疫

反応に関連する複数の遺伝子の発現調節における重要なシグナルとなることが示唆されている³⁾。なかでも IL-1, 6, 8 などの炎症性サイトカインやいくつかの細胞接着分子遺伝子の転写制御に重要な役割を果たしている転写因子 NF- κ B の活性化には酸化ストレスがセカンドメッセンジャーとして働くものと考えられる^{4,5)}。本稿では、筆者らが行った *in vitro* での実験系の結果を中心に、急性肺損傷 (acute lung injury) の病態で重要なファーストステップと考えられるサイトカイン刺激による肺血管内皮細胞上の接着分子の発現メカニズムにおけるレドックス環境および NF- κ B の関与について述べる。

* Department of Pulmonary Medicine, Jichi Medical School 自治医科大学呼吸器内科学教室
Offprint requests to : Masashi Bando, Department of Pulmonary Medicine, Jichi Medical School, 3311-1, Yakushiji Minamikawachi, Kawachi, Tochigi, 329-0498 Japan

図1 Time-dependent changes in glutathione (GSH) and oxidized GSH (GSSG) contents following $\text{TNF}\alpha$ stimulation of endothelial cells

Confluent human pulmonary artery endothelial cells (HPAEC) were treated without (□) or with (▲) $\text{TNF}\alpha$ (100 U/ml) for the time periods indicated before harvesting the cells. Cell extracts were prepared and the intracellular GSH and GSSG contents were measured as described in Materials and Methods.

方法

(1) 細胞培養

ヒト肺血管内皮細胞 (human pulmonary artery endothelial cell: HPAEC) は、Clonetics 社より購入し、10% fetal bovin serum (Gibco 社) を含む endothelial cell growth medium (EGM, Gibco 社) に浮遊させ、ゼラチン処理したプラスチックプレートに散布し、以後 confluent になるまで 5% CO_2 /air インキュベーター内で 37°C で維持し、細胞培養を行った。

(2) ノーザン分析

後述するそれぞれの条件にて処置した HPAEC からの RNA 抽出は、TRIzol™ (Gibco 社) を用い、添付のマニュアルに従い抽出した。RNA サンプルは、1% アガロース・ホルムアルデヒドゲルにて電気泳動し、その後ニトロセルロース膜に移行させた。ヒト ICAM-1 (0.96 kb Sal I to Pst I fragment), E セレクチン (1.35 kb EcoRI fragment) をプローブとして用意し、 ^{32}P でラベルしたのち、ハイブリダイゼーションを行った。

(3) 還元型グルタチオン (GSH) および酸化型グルタチオン (GSSG) の測定

培養された HPAEC は、それぞれの条件にて処置したのち、回収、遠沈した。その後、細胞内の主たるラジカスカベンジャーである GSH,

GSSG は、Tietze 法⁹⁾に従い測定した。その後、Bradford 法により測定した蛋白量により補正した。

(4) 白血球の肺血管内皮細胞への接着

ファイコール比重遠沈法により分離した健常者白血球を calcein で蛍光染色したあと、96 穴プレートに培養した HPAEC に 5×10^5 個加えた。15 分間の培養後、内皮細胞に接着しているもののみ蛍光光度計で計測し、その後プレートを上下逆転し、遠沈したのち再度、接着した白血球を計測した。

(5) Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

通常、細胞質で不活性型として存在し、活性化されると核内に移動する NF- κ B の核内での存在の有無を知る目的で、まず HPAEC から核内蛋白を抽出したあと、ICAM-1, E セレクチンプロモーター遺伝子領域内の NF- κ B の結合部位を含んだオリゴヌクレオチドをプローブとして、結合アッセイを行い、6% ポリアクリラマイドゲルにて電気泳動を行い、オートラジオグラフィーにてバンド検出を行った。

結果

(1) $\text{TNF}\alpha$ 刺激による肺血管内皮細胞内グルタチオン濃度の経時的変化

図2 Northern blot analyses (20 μ g of total RNA/lane) showing E-selectin and ICAM-1 mRNA expression following $\text{TNF}\alpha$ stimulation of endothelial cells

Confluent HPAC cell were incubated with $\text{TNF}\alpha$ at the concentrations indicated for a period of 2 h. Total RNA was isolated and analyzed by Northern hybridizations with a human E-selectin and ICAM-1 or rat glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) cDNA, which hybridize to 3.9- and 3.3- or 1.3-kb mRNA transcripts, respectively. GAPDH (a constitutively expressed gene not induced by $\text{TNF}\alpha$) was used to normalize the loading of the gel.

$\text{TNF}\alpha$ 刺激約 30 分後より, GSH の減少および GSSG の増加を認め, 1 時間以内に 80% の GSH の減少を認めた. その後 4 時間まで GSH/GSSG 比の減少は持続した (図1).

(2) $\text{TNF}\alpha$ 刺激による肺血管内皮細胞上の接着分子 E セレクチンおよび ICAM-1 mRNA の発現

1~1,000 U/ml の種々の濃度の $\text{TNF}\alpha$ 刺激 2 時間後の E セレクチンおよび ICAM-1 の mRNA は, 濃度依存的な発現亢進を認め (図2), $\text{TNF}\alpha$ 100 U/ml 刺激後のこれらの mRNA の経時的な発現は, 刺激約 30 分後より E セレクチンの発現亢進を, また約 2 時間後より ICAM-1 の発現亢進を認め, 以後両者は 8~24 時間後まで発現亢進の持続を認めた. また, $\text{TNF}\alpha$ 刺激により, HPAC への好中球の接着亢進を認めた (図3).

図3 Effect of N-acetyl-L-cysteine (NAC) on $\text{TNF}\alpha$ -induced PMN adhesion to endothelial cells

Confluent HPAC cells were stimulated with $\text{TNF}\alpha$ (100 U/ml) without or after 0.5 h pretreatment of NAC (30 mM). Five hours later, calcein-labeled PMN were layered on endothelial monolayers and adhesion was determined as described in Materials and Methods.

(3) $\text{TNF}\alpha$ 刺激による接着分子遺伝子発現亢進に対するアンチオキシダントの効果

細胞内 GSH/GSSG レベルを増加させる目的で GSH の前駆物質である N-acetyl-L-cysteine (NAC) を 1 時間前に投与したのちに $\text{TNF}\alpha$ (100 U/ml) 刺激を行い, 刺激 2 時間後の E セレクチン, ICAM-1 mRNA の発現を検討した. 1, 15, 30 mM の NAC の前処置により, これらの mRNA 発現は用量依存的に抑制された (図4). また, 30 mM の NAC の前処置にて, $\text{TNF}\alpha$ (100 U/ml) 刺激後 8 時間までの経時的な mRNA 発現は, すべての測定時間において抑制された. また NAC (30 mM) は, $\text{TNF}\alpha$ 刺激により亢進した HPAC への好中球の接着を抑制した (図3).

(4) $\text{TNF}\alpha$ 刺激により接着分子発現亢進における NF- κ B の関与

酸化ストレスにより活性化されると考えられている NF- κ B の関与について, NF- κ B の活性化を抑える pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) および NF- κ B に対する結合部位を有し, 活性化

図 4 Effect of NAC on TNF α -induced E-selectin and ICAM-1 transcripts

Confluent HPAE monolayers were pretreated for 0.5 h with 5, 15, and 30 mM NAC, followed by stimulation with TNF α (100 U/ml) for a period of 2 h in the continuous presence of NAC. ICAM-1, E-selectin, and GAPDH mRNAs expression was determined by Northern blotting as described in Fig. 2.

図 5A Effect of PDTC on TNF α induction of E-selectin and ICAM-1 mRNAs expression

Confluent HPAE cells were preincubated with the indicated concentrations of PDTC for 0.5 h, followed by stimulation with TNF α (100 U/ml) for 2 h. ICAM-1, E-selectin, and GAPDH mRNA expression was determined as described in Fig. 2.

された NF- κ B の E セレクチン, ICAM-1 プロモーター遺伝子領域への結合を競合的に抑える NF- κ B のアンチセンスオリゴヌクレオチドを前処置したのちに TNF α 刺激を加えた。これらの前処置により E セレクチン, ICAM-1 の mRNA 発現亢進は用量依存的に抑制された(図 5 A, B)。また, EMSA において TNF α 刺激により NF- κ B の活性化を認め, NAC (30 mM) は, この活性化を抑制した(図 6)。

考 案

急性肺損傷の本態は, 肺血管内皮細胞の損傷による透過性亢進型肺水腫である。そのファーストステップとして, エンドトキシンなどにより活性化されたマクロファージ/単球から生産された IL-1 β や TNF α などの炎症性サイトカインが肺血管内皮細胞上のセレクチン, ICAM-1, VCAM-1 などの接着分子の発現亢進をもたらす, 病態の中心と考えられる好中球を流血中から間質へと遊走, 浸潤させ, プロテアーゼや活性酸素を放出し, 組織損傷を惹起させるものと考えられている。

図 5B A double-stranded phosphorothioate κ B oligonucleotide (κ B-PT) inhibits TNF α -induced E-selectin and ICAM-1 transcripts

Confluent HPAE cells were preincubated with the indicated concentrations of κ B-PT for 3 h before the addition of TNF α (100 U/ml). After 2 h, total RNA was isolated and analyzed for ICAM-1, E-selectin, and GAPDH mRNAs expression by Northern blotting as described in Fig. 2.

図6 $\text{TNF}\alpha$ 誘導による NF- κ B 活性と NAC が $\text{TNF}\alpha$ 誘導による NF- κ B の ICAM-1 プロモーターへの結合を抑制する

Gel mobility shift assays were performed as described in Materials and Methods. HPAEC cells were pretreated with NAC (30 mM) for 0.5 h and then challenged with $\text{TNF}\alpha$ (100 U/ml). After 1 h, nuclear extracts were prepared and their DNA binding activities were assessed using radiolabeled wt ICAM-1 NF- κ B probes.

る^{7,8)}。図7に好中球の炎症部位への集積に関与するEセレクトリン、ICAM-1の関与を示す。今回、筆者らは $\text{TNF}\alpha$ 刺激により白血球が肺血管内皮細胞上を転がる、いわゆるローリングに関与するEセレクトリンおよび引き続いて起こる強固な結合(sticking)に重要なICAM-1の発現についての検討を行い、その細胞内シグナル伝達経路にレドックス環境およびNF- κ Bが関与していることを示した。

近年、 $\text{TNF}\alpha$ のシグナル伝達経路については、

$\text{TNF}\alpha$ レセプターに結合する分子の同定を通して急速に解明されつつあるが、まだ不明な点も多い⁹⁾。 $\text{TNF}\alpha$ はTNFR1(分子量55 KDa)とTNFR2(分子量75 KDa)からなる2種類のレセプターが存在するが、その作用の多くはTNFR1を介して起こる¹⁰⁾。1995年にTNFR1のdeathドメインに結合する分子としてTRADDが同定され¹¹⁾、この分子の過剰発現により、リガンド依存的な細胞のNF- κ Bの活性化とアポトーシスが引き起こされると考えられている¹²⁾。筆者らの検討からも $\text{TNF}\alpha$ による血管内皮細胞上の接着分子の発現亢進に、このNF- κ Bが重要であるものと考えられる。

今回筆者らは、 $\text{TNF}\alpha$ 刺激後にGSHの低下およびGSSGの上昇を認め、またアンチオキシダントであるNACやPDTCが $\text{TNF}\alpha$ による接着分子の発現亢進を抑制したことより、ヒト肺血管内皮細胞において、 $\text{TNF}\alpha$ の刺激に反応して活性酸素が産生されたものと考えられる。近年、活性酸素は外界シグナルのセカンドメッセンジャーとして働く可能性が注目されており³⁾、好中球や単球、マクロファージなどの貪食細胞のみならず血管内皮細胞においても活性酸素は産生される¹³⁾。従来この血管内皮細胞における活性酸素産生系にはキサンチンオキシダーゼが重要であると考えられている¹⁴⁾。しかし、筆者らの実験においてはキサンチンオキシダーゼの阻害剤であるオキシプリノールでは $\text{TNF}\alpha$ 刺激による接着分子発現亢進を軽度抑制したのみであり、最近では血管内皮細胞にも貪食細胞などで中心的役割を示すNADPHオキシダーゼを有する可能性も示唆されており¹⁵⁾、この経路へのNADPHオキシダーゼの関与も考慮する必要がある。

生体にはこれらいくつかの活性酸素の産生系により生じた酸化ストレスに対し、細胞内外のレドックス環境を維持するためにさまざまな分子や酵素群が存在している。なかでもグルタチオン系は細胞質に多量(1~15 mM程度)存在する重要なレドックス制御機構であり、NADPH、GSSG還元酵素により還元されたGSHはそのSH基の化学的特性により、抗酸化防御、解毒代謝およびレ

図7 The role of cytokines and adhesion molecules in the development of acute lung injury

Schematic depiction of neutrophil recruitment, summarizing the underlying adhesive interactions. Endothelial stimulation triggers E-selectin expression. The resulting interaction between E-selectins and their ligands causes a rolling adhesion. Neutrophil activation alters the $\beta 2$ -integrins, rendering them capable of binding ICAM-1, facilitating a firm, stationary adhesion.

ドックス制御などの作用を有する^{2,16)}。NACは、古くから去痰剤として用いられてきたが、GSHの前駆物質であり、細胞内GSH増加作用を有するうえに、それ自体にもアンチオキシダント作用を有する薬剤である¹⁷⁾。今回、NACの接着分子発現亢進の抑制作用機序の一つとして、細胞内に生じた酸化ストレスの抑制が重要であると考えられる。

また、今回示したとおり、NACはEMSAによりNF- κ Bの活性化を抑制したことに加え、NF- κ Bの阻害作用を有するPDTC¹⁸⁾やオリゴヌクレオチドがTNF α 刺激後の接着分子の発現亢進に対して抑制作用を示したことより、この細胞内シグナル伝達経路にNF- κ Bが中心的役割を果たしているものと考えられる。NF- κ BはIL-1, 2, 6, 8, GM-CSF, IFN γ などの炎症性サイトカインやEセレクトイン, ICAM-1, VCAM-1などの接着分子, 誘導型nitric oxide合成酵素(iNOS), Fasリガンドなどの遺伝子の転写制御に重要な転写因子であり⁴⁾、休止期の細胞ではI- κ Bとの複合体を形成し細胞質に局在しており、細胞外からのTNF α やIL-1などの炎症性サイトカインや放射線、過酸化水素などのさまざまなシグナルによりI- κ B

と解離し、核内に移行し、その活性を発揮する^{5,19,20)}。NF- κ Bの活性化にはI- κ Bキナーゼ(IKK)などの種々のリン酸化酵素²¹⁾とともに活性酸素によるレドックス環境が重要である。筆者らの実験系においてもTNF α からのシグナルは活性酸素の産生を介して、NF- κ Bの活性化をもたらし、またNACは、これらのシグナル伝達を遮断し、NF- κ Bの活性化を阻止したものと考えられる。これまでにヒトTリンパ球や臍帯静脈血管内皮細胞を用いた実験系においても、アンチオキシダントであるNACやPDTCがNF- κ Bの活性化を阻止しうることが報告されている^{22,23)}。

上述のごとく、接着分子の発現亢進の抑制は、血管内から肺腔内への好中球の遊走、浸潤を抑制することにつながり、ARDSをはじめとする急性肺損傷の発症を抑制する可能性がある²⁴⁾。今回、NACはNF- κ Bを介し、サイトカイン刺激後の接着分子の発現亢進を抑制したが、接着分子以外にもNF- κ B依存性のサイトカインであるIL-1, 2, 6, 8, TNF α , GM-CSF, IFN γ やiNOSなどの分子発現を抑制する可能性も考えられる。臨床においてもNACは近年諸外国において、ARDSや間質性肺炎などの炎症性肺疾患に対し、その有用

図 8 Mechanism of $\text{TNF}\alpha$ -induced adhesion molecules expression in HPAEC

A proposed model for oxygen radicals as second messengers for $\text{TNF}\alpha$ and the regulation of $\text{NF-}\kappa\text{B}$ activation following cell stimulation with $\text{TNF}\alpha$.

性を指摘する報告^{25,26)}もみられ、上述の作用機序を介して効果を発揮している可能性が考えられる。

まとめ

図 8 に $\text{TNF}\alpha$ 刺激による接着分子遺伝子発現における細胞内シグナル伝達系のシエーマを示す。 $\text{TNF}\alpha$ 刺激による E セレクチンおよび ICAM-1 の発現における細胞内シグナル伝達経路にはレドックス環境の変化および $\text{NF-}\kappa\text{B}$ の活性化が関与しているものと考えられる。NAC や PDTC によるこれらの制御は接着分子の発現誘導を制御することから、今後 ARDS をはじめとする種々の肺炎患の新しい治療法となりうる可能性が示唆された。

文 献

- 野瀬 清：遺伝子発現の酸化還元による制御。実験医学 11：1830-1832, 1993.
- Hwang C, Sinsky AJ, Lodish HF：Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. Science 257：1497-1502, 1992.
- Schreck R, Baeuerle PA：A role for oxygen radicals as second messengers. Trends in cell Biol. 1：39-42, 1991.
- Blackwell TS, Christman JW：The role of nuclear factor- κB in cytokine gene regulation. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 17：3-9, 1997.
- Hayashi T, Ueno Y, Okamoto T：Oxidoreductive regulation of nuclear factor- κB . J. Biol. Chem. 268：11380-11388, 1993.
- Tietze F：Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione；application to mammalian blood and other tissues. Anal. Biochem. 27：502-522, 1969.
- 北村 諭 石井芳樹：肺循環障害のトピックス；成人呼吸促迫症候群と接着分子。日内会誌 82：870-873, 1993.
- Malik AB, Bando M：The expression of adhesion molecule and ARDS. Jpn. J. Chest Dis. 34：29-34, 1996.
- 審良静男：サイトカインこの 1 年。免疫 4-12, 1997.
- Rothe M, Wong SC, Henzel WJ, Goeddel DV：A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. Cell 78：681-692, 1994.
- Hsu H, Xiong J, Goeddel DV：The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and $\text{NF-}\kappa\text{B}$ activation. Cell 81：495-504, 1995.
- Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV：TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. Cell 84：299-308, 1996.
- 平田健一, 横山光宏：フリーラジカルと血管内皮細胞。

- 現代医療 28 : 2029-2033, 1996.
- 14) Zweier JL, Broderick R, Kuppusamy P, Thompson-Gorman S, Lutty GA : Determination of the mechanism of free radical generation in human aortic endothelial cells exposed to anoxia and reoxygenation. *J. Biol. Chem.* 269 : 24156-24162, 1994.
- 15) Mohazzab-H KM, Kaminski PM, Wolin MS : NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am. J. Physiol.* 266 : H2568-2572, 1994.
- 16) Meister A : Commentary on the antioxidant effects of ascorbic acid and glutathione. *Biochem. Pharm.* 44 : 1905-1915, 1992.
- 17) Áruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J : The antioxidant action of N-acetylcysteine : its reaction with hydrogen peroxide. *Hydroxyl. Free Radic. Biol. Med.* 6 : 593-597, 1989.
- 18) Schreck R, Meier B, Mannel DN, Droge W, Baeuerle : Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor κ B activation in intact cells. *J. Exp. Med.* 175 : 1181-1194, 1992.
- 19) Barchowsky A, Munro SR, Morana SJ, Vincenti MP, Treadwell M : Oxidant-sensitive and phosphorylation-dependent activation of NF- κ B and AP-1 in endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 269 : L829-836, 1995.
- 20) Brach MA, Hass R, Sherman ML, Gunji H, Weichselbaum R, Kufe D : Ionizing radiation induces expression and binding activity of the nuclear factor κ B. *J. Clin. Invest.* 691-695, 1991.
- 21) Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M : The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation. *Cell* 91 : 243-252, 1997.
- 22) Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA : Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO* 10 : 2247-2258, 1991.
- 23) Tozawa K, Sakurada S, Kohri K, Okamoto T : Effects of anti-nuclear factor κ B reagents in blocking adhesion of human cancer cells to vascular endothelial cells. *Cancer Res.* 55 : 4162-4167, 1995.
- 24) 北村 諭, 石井芳樹 : 接着分子関連物質の治療応用. *医学のあゆみ* 170 : 121-126, 1994.
- 25) Bernard GR, Wheeler AP, Aron MM, Morris PE, Paz HL, Russell JA, Wright PE : A trial of antioxidants N-acetylcysteine and procysteine in ARDS. *Chest* 112 : 164-172, 1997.
- 26) Behr J, Maier K, Degenkolb B, Krombach F, Vogelmeier C : Antioxidative and clinical effects of high-dose N-acetylcysteine in fibrosing alveolitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156 : 1897-1901, 1997.