

Mini Review

無酸素／再酸素化により誘導される白血球と 血管内皮細胞の相互作用

古倉 聡, 吉田憲正, 吉川敏一

京都府立医科大学第一内科

Anoxia/reoxygenation-induced leukocyte-endothelial cell interactions

It has long been recognized that the microvasculature is exquisitely sensitive to ischemia/reperfusion (I/R) and that hyperadhesiveness of leukocytes to endothelial cells contributes to I/R-induced tissue injury. The phenomenon of I/R has been implicated in the microvascular and parenchymal cell injury associated with several pathological conditions, including gastric ulcer formation, multiple organ failure, cancer metastasis, and organ transplantation. In an effort to define the mechanisms responsible for reperfusion-induced vascular injury, a number of *in vitro* models have been developed to simulate the responses of endothelial cells to I/R. Due to its simplicity, many investigators have employed monolayers of cultured endothelial cells exposed to anoxia, followed by reoxygenation (A/R) as a model system to mimic I/R-induced vascular changes *in vivo*.

This review will provide an overview of our current understanding of leukocyte-endothelial cell interactions derived from *in vitro* studies of endothelial cell monolayers exposed to anoxia/reoxygenation, with specific emphasis on the molecular determinants mediating this inflammatory process and the contribution of reoxygenation-induced oxidative stress to the activation of NF- κ B and the expression of endothelial surface adhesion molecules.

Rec. 9/19/2002, Acc. 10/18/2002, pp39-43

Satoshi Kokura, Norimasa Yoshida, Toshikazu Yoshikawa

First Department of Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine

Key words oxidant stress, endothelial cell adhesion molecule, NF- κ B, AP-1, leukocyte

虚血再灌流という現象は、虚血性心疾患、脳血管障害、多臓器不全、癌およびその転移、胃潰瘍、虚血性腸炎など様々な疾患や臓器移植後の病態に関与している。微小循環、特に細静脈の血管内皮細胞は、虚血／再灌流現象に敏感で、この部位での白血球の微小血管内皮細胞への接着現象が、虚血／再灌流による組織障害に非常に重要である¹⁾。

単層培養した血管内皮細胞を無酸素下で一定時間培養した後、再酸素化に暴露する *in vitro* のモデルが、虚血／再灌流時の微小循環傷害のメカニズムを検討するために用いられている。この *in vitro* のモデルが、実際に生体で起った虚血／再灌流という現象によって引き起こされる血管内皮細胞応答に非常に類似した細胞応答をすることがわかってきた。すなわち、①キサンチンオキシダーゼの活性化^{2,3)}、②スーパーオキシドと過酸化水素の生成^{4,5)}、

③転写因子 NF- κ B と AP-1 の活性化⁶⁾、④内皮細胞接着分子の発現⁶⁾、⑤好中球の内皮細胞への接着⁷⁾、⑥内皮によるバリア機能の破綻⁸⁾、などの細胞応答が *in vitro* で再現できることが明らかとなった。

しかしながら、生体でのすべての現象が、この *in vitro* のモデルで再現できるわけではない。例えば、好中球の内皮細胞への接着におけるロイコトリエンの影響などは、このモデルでは再現できない⁹⁾。こういった点を十分理解しておけば、単層培養した血管内皮細胞を無酸素／再酸素化に暴露するこのモデルはシンプルであり、虚血／再灌流時の微小循環傷害の詳細なメカニズムを検討する上で非常に有用なモデルである。

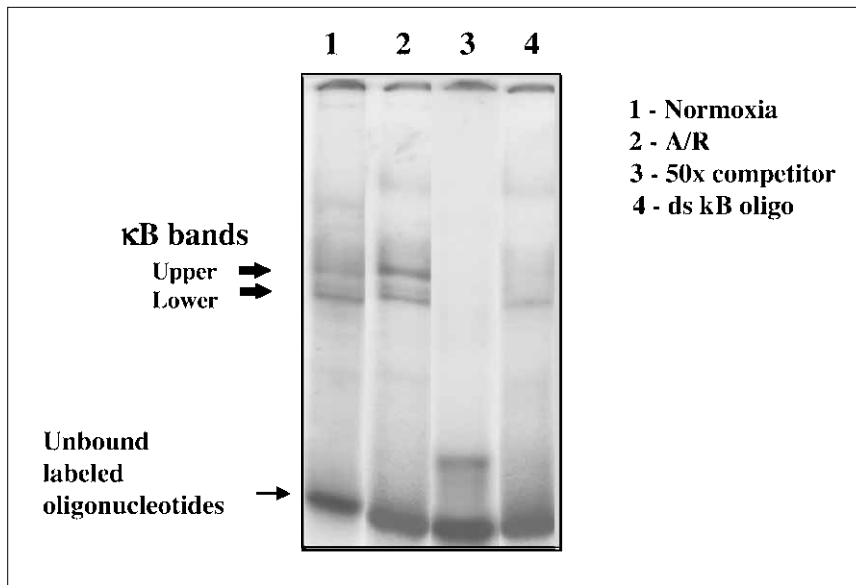


図1 無酸素／再酸素化後の血管内皮細胞内 NF-κB の DNA binding activity (EMSA)

HUVEC を無酸素下に1時間培養した後、21%酸素下で4時間培養し、核蛋白を抽出した。抽出した核蛋白 (10 μg) の DNA binding activity を electrophoretic mobility gel shift assays にて検討した。normoxia で5時間培養した HUVEC に比べて、anoxia/reoxygenation に曝露した HUVEC の方が、NF-κB の band は増強している。anoxia/reoxygenation 刺激が、HUVEC の NF-κB を活性化したことを示している。

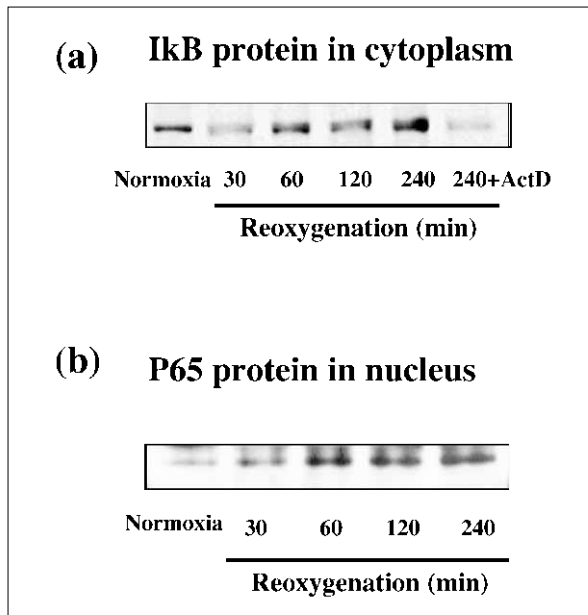


図2 無酸素／再酸素化による NF-κB の活性化

(a) Degradation of IκB, HUVEC の IκB の量的変化を western blotting で経時的に調べると、再酸素化後30分ですでに分解され、60分後には再び増加しはじめている。この増加は Actinomycin D で抑制されることから新合成されたものであることがわかる。細胞質に存在している IκB が再酸素化後30分で分解されていることから、この時点で NF-κB の核内移行がすでに始まっていることがわかる。(b) Translocation of p65 into nucleus, 実際に核蛋白を抽出して、p65 の核内移行を western blotting で経時的に調べると、再酸素化後30分でわずかに核内移行しており、60分後にはプラトーに達している。(文献13より引用)

無酸素／再酸素化により誘導される細胞接着分子の発現

ヒト臍帯血管内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell: HUVEC) を60分間、無酸素下で培養し、その後再酸素化すると血管内皮細胞上に細胞接着分子の P-selectin, E-selectin, VCAM-1 がそれぞれの発現のピークを持って誘導される⁶⁾。また、ICAM-1 は、無刺激の血管内皮細胞上にも常時発現しているが、無酸素／再酸素化によりその発現量の増加が認められる⁶⁾。

P-selectin は、再酸素化の直後 (15分以内) にまず速やかに細胞膜上に発現するが、これは細胞質内にプールされていた P-selectin が、細胞表面に移動した結果と考えられている。その後、P-selectin の発現は一旦低下するが、再酸素化3時間後位から、再び発現の誘導が認められる。この再発現のメカニズムは、明らかにはされていないが、細胞内のものがリサイクルされるのではないかと考えている。E-selectin は、無刺激の状態では発現していないが、再酸素化後2時間位から発現し、4～5時間後にピークとなる。この発現は、転写阻害剤や蛋白合成阻害剤により抑制されることから、転写依存性であることがわかっている。VCAM-1 も、E-selectin と同様の発現パターンとメカニズムを有しているが、その発現は、E-selectin より遅く4時間後より発現を認め、ほぼ8時間後にピークを認める。一方、ICAM-1 は、P-selectin, E-selectin, VCAM-1 とは異なり、無刺激状態でもかなり多量の ICAM-1 が血管内皮細胞上に発現している。そして、ICAM-1 も、再酸素化後2時間位から発現が増強し、それが長時間持続する。

E-selectin の発現は、転写因子 NF-κB の活性化阻害剤 (proteasome inhibitor, decoys for NF-κB binding) で低下す

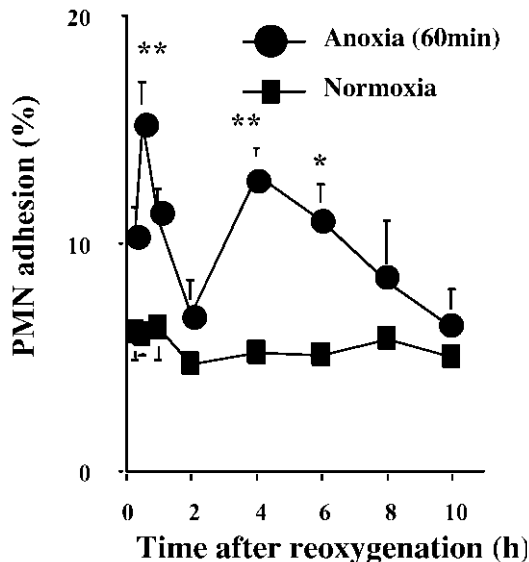


図3 無酸素／再酸素化後の血管内皮細胞への好中球の接着の経時的变化

HUVEC を、60 分間の無酸素に暴露した後、再酸素化した。 ^{51}Cr でラベルした好中球を再酸素化後の HUVEC に加え、30 分の coculture 後、非接着好中球を除去した。そして、接着細胞の比率を % で表した。好中球の HUVEC への接着は、再酸素化直後と 4 時間後に増加している。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs 0h. (文献 6 より引用)

ることから、無酸素／再酸素化により、血管内皮細胞内の NF- κ B が活性化された結果発現したと考えられる。実際に、無酸素／再酸素化により血管内皮細胞内の NF- κ B が活性化されることは、NF- κ B の DNA への binding activity の増強を EMSA (electrophoretic mobility shift assay) を用いて確認し (図 1)、再酸素化直後に、細胞質の I κ B protein が分解されることと再酸素化一時間後には p65 が核内に移行していることを western blotting を用いて確認している (図 2)。一方、ICAM-1、VCAM-1 の発現も NF- κ B の活性化阻害剤で部分的に抑制されるが、AP-1 の活性化阻害剤でも抑制されることから、NF- κ B に加えて転写因子 AP-1 の関与が考えられた。

無酸素／再酸素化により誘導される好中球と血管内皮細胞の接着

無酸素／再酸素化刺激を加えた血管内皮細胞に無刺激のヒト好中球を反応させると、好中球は 2 相性に内皮細胞に接着する。第 1 相は、再酸素化後 15 ～ 30 分に認められ、その後、接着率は一度低下するが、4 時間後に第 2 相のピークを迎える (図 3)。これらの好中球と血管内皮細胞の相

表 1 無酸素／再酸素化によって誘導される好中球の内皮細胞への接着—細胞接着分子と転写因子の役割—

ECAM Transcription factor	phase 1	A/R phase 2
<i>Adhesion molecules</i>		
P-selectin	+++	+
ICAM-1	+++	+
E-selectin	-	+++
VCAM-1	-	-
<i>Transcription factors</i>		
NF- κ B	-	++
AP-1	-	+

Adhesion molecules: +++ and + refer to dominant and contributing effects
Transcription factors; + and - refer to involvement or lack of involvement

互作用は、無酸素／再酸素化に暴露された内皮細胞から生成される活性酸素によって引き起こされると考えられる。微小血管においては、活性酸素は、少なくとも 2 つの異なる機序によって組織傷害を引き起こしている。まず第一には、内皮細胞の脂質、蛋白、核酸を酸化することによる内皮細胞傷害である¹⁰⁾。第二に、内皮細胞からの炎症反応 mediators の産生と内皮細胞上の細胞接着分子の発現である^{6,7)}。

われわれの検討では、第 1 相の内皮細胞と好中球の細胞接着は、PAF antagonist, SOD, catalase など抑制され、第 2 相の反応は、PAF antagonist では部分的に抑えることが可能であるが、細胞内に移行しない SOD や catalase では抑えることができず、膜透過性の抗酸化剤で抑制される。したがって、第 1 相の内皮細胞と好中球の細胞接着は、無酸素／再酸素化に暴露された内皮細胞から細胞外に産生される PAF と過酸化水素が重要な役割を果たし、第 2 相の応答は、PAF に加えて細胞内で生成される活性酸素が引き起こしていると考えられる。さらに、興味深いことに好中球と血管内皮細胞の接着反応は、第 1 相と第 2 相では、関与している接着分子が異なる。すなわち、各種細胞接着分子に対する blocking antibody を用いた検討から、第 1 相は、内皮細胞上に発現している P-selectin および constitutive な ICAM-1 と好中球のそれぞれのリガンドとの接着作用が関与しており、第 2 相では、P-selectin、新たに発現した ICAM-1 に加えて、E-selectin も大きく関与していることが明らかとなった (表 1)。前述したとおり、第 2 相に関与している細胞接着分子群は転写因子の NF- κ B と AP-1 の活性化を介して発現している。したがって、転写因子の NF- κ B と AP-1 の活性化阻害剤は、第 1 相は抑制しないが、第 2 相は抑制する。

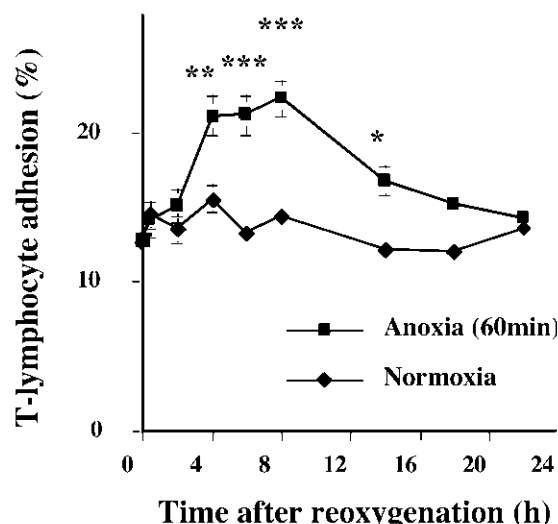


図4 無酸素／再酸素化後の血管内皮細胞へのT-リンパ球の接着の経時的変化

HUVEC を60分間の無酸素に暴露した後、再酸素化した。51Cr でラベルしたT-リンパ球を再酸素化後のHUVECに加え、30分のcoculture後、非接着T-リンパ球を除去した。そして接着細胞の比率を%で表した。T-リンパ球のHUVECへの接着は再酸素化後2時間位から増加し、6時間から8時間にそのピークを認める。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.0001$ vs 0h. (文献12より引用)

無酸素／再酸素化により誘導されるT-リンパ球と血管内皮細胞の接着

虚血／再灌流後の組織に浸潤してくる白血球は好中球優位ではあるが、虚血／再灌流傷害におけるT-リンパ球の重要性を示唆する報告が近年増えてきている¹¹⁾。

無酸素／再酸素化刺激を加えた血管内皮細胞へのT-リンパ球の接着は、好中球の場合とは異なり2相性を示さない(図4)。再酸素化後4時間ぐらいから接着が認められ、8時間後にピークがある¹²⁾。好中球の血管内皮細胞への接着の場合は、第1相において、細胞質から細胞表面に移動してきたP-selectinとconstitutiveに存在するICAM-1が関与していたが、この時期にT-リンパ球の接着が起らないことはP-selectinやICAM-1に対する、T-リンパ球上のリガンドの親和性あるいは発現量が好中球とは異なる可能性が示唆される。

各種細胞接着分子あるいはそのリガンドに対するblocking antibodyを用いた検討から、LFA-1:ICAM-1とVLA-4:VCAM-1の接着がT-リンパ球の血管内皮細胞への接着に関与していることが明らかとなった(表2)。そして、再酸素化後の血管内皮細胞へ接着する細胞は、CD4⁺サブ

表2 無酸素／再酸素化によって誘導されるT-リンパ球の内皮細胞への接着—細胞接着分子と転写因子の役割—

ECAM Transcription factor	A/R
<i>Adhesion molecules</i>	
P-selectin	-
ICAM-1	+++
E-selectin	-
VCAM-1	+++
<i>Transcription factors</i>	
NFκB	++
AP-1	+

Adhesion molecules: +++ and + refer to dominant and contributing effects; + and - refer to involvement or lack of involvement

セットであり、CD8⁺サブセットはほとんど接着しない(図5)。このサブセットの選択性の機序は今のところ不明であるが、虚血／再灌流後の肝臓に浸潤してくるリンパ球が、CD4⁺T-リンパ球であるという*in vivo*の実験結果とも一致する。

われわれは、無酸素／再酸素化に暴露された内皮細胞からは、PAFと過酸化水素が生成され、これらが好中球の内皮細胞への接着に重要であることを見出したが、特にPAFは、好中球に作用していると考えられる。それゆえに、再酸素化後の内皮細胞が、リンパ球上のLFA-1やVLA-4の発現量や親和性を増加させるような物質を生成している可能性も考えられる。再酸素化後の内皮細胞がIL-8を産生することと抗IL-8抗体が、再酸素化後の内皮細胞上のICAM-1やVCAM-1の発現に影響を与えることなくT-リンパ球の血管内皮細胞への接着を抑制することから、IL-8がT-リンパ球上のLFA-1やVLA-4に影響を与えていることが示唆される¹²⁾。T-リンパ球の血管内皮細胞への接着に関与している細胞接着分子には、ICAM-1とVCAM-1があるが、VCAM-1は、無刺激の内皮細胞にはほとんど発現していないが、無酸素／再酸素化後に緩やかに発現してくる。われわれの検討では、この無酸素／再酸素化後のVCAM-1の発現は、転写阻害剤や蛋白合成阻害剤で阻止される。

前述したとおり、ある種のサイトカイン刺激や酸化ストレスを受けた血管内皮細胞は、転写因子のNF-κBとAP-1の活性化を介して、種々の細胞接着分子を発現する。NF-κBとAP-1のそれぞれの阻害剤の両方が、無酸素／再酸素化後のVCAM-1の発現とT-リンパ球の血管内皮細胞への接着を抑制する。また、無酸素／再酸素化後の血管内皮細胞からのIL-8の産生もNF-κBとAP-1の両方が関与してい

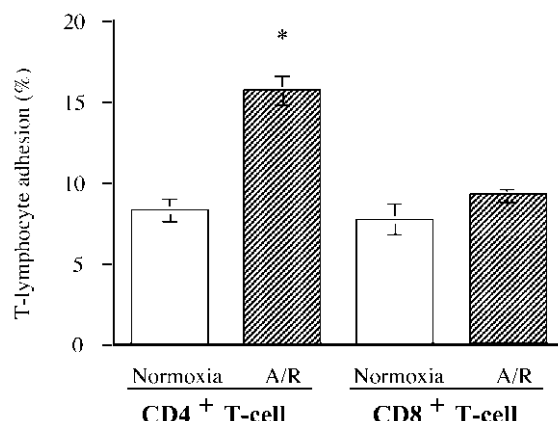


図5 CD4⁺ T-リンパ球とCD8⁺ T-リンパ球の血管内皮細胞への接着

HUVECを60分間の無酸素に暴露した後、再酸素化した。⁵¹CrでラベルしたCD4⁺ T-リンパ球あるいはCD8⁺ T-リンパ球を再酸素化8時間後のHUVECに加え、30分のcoculture後、非接着T-リンパ球を除去した。そして接着細胞の比率を%で表した。T-リンパ球のHUVECへの接着をサブセットで調べたところ、CD4⁺ T-cellは接着の亢進を示すが、CD8⁺ T-cellは反応しなかった。* $p < 0.001$ vs normoxia. (文献12より引用)

ることが明らかとなっている。したがって、無酸素/再酸素化に暴露された内皮細胞においては、転写因子のNF- κ BとAP-1が活性化され、内皮細胞は、ICAM-1とVCAM-1を自らの細胞表面に発現するとともにIL-8を分泌する。このIL-8は、T-リンパ球上のLFA-1やVLA-4を活性化し、その結果T-リンパ球の血管内皮細胞への接着が引き起こされる。

おわりに

無酸素/再酸素化により誘導される白血球と血管内皮細胞の相互作用のメカニズムがかなり細部まで明らかとなり、細胞接着分子の発現における転写因子NF- κ BとAP-1の役割もほぼ解明された感がある。白血球の内皮細胞への接着を阻止することにより、虚血/再灌流傷害を抑制するためには、無酸素/再酸素化によるNF- κ BとAP-1の活性化を制御する必要がある。NF- κ BとAP-1の活性化の機序の詳細の解明と活性化を抑える確実かつ有効な方法の開発が今後の課題である。

文 献

- 1) Granger DN, Kvietys PR, Perry MA: Leukocyte-endothelial cell adhesion induced by ischemia and reperfusion. *Can J Physiol Pharmacol*, 71: 67-75, 1993.

- 2) Ratych RE, Chuknyiska RS, Bulkley GB: The primary localization of free radical generation after anoxia/reoxygenation in isolated endothelial cells. *Surgery*, 102: 122-131, 1987.
- 3) Inauen W, Granger DN, Meininger CJ, Schelling ME, Granger HJ, Kvietys PR: An in vitro model of ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. *Am J Physiol*, 259: G134-G139, 1990.
- 4) Terada LS, Willingham IR, Rosandick ME, Leff JA, Kindt GW, Repine JE: Generation of superoxide anion by brain endothelial cell xanthine oxidase. *J Cell Physiol*, 148: 191-196, 1991.
- 5) Zweier JL, Kuppusamy P, Thompson-Gorman S, Klunk D, Luty GA: Measurement and characterization of free radical generation in reoxygenated human endothelial cells. *Am J Physiol*, 266: C700-C708, 1994.
- 6) Ichikawa H, Flores S, Kvietys PR, Wolf RE, Yoshikawa T, Granger DN, Aw TY: Molecular mechanisms of anoxia/reoxygenation-induced neutrophil adherence to cultured endothelial cells. *Circ Res*, 81: 922-931, 1997.
- 7) Yoshida N, Granger DN, Anderson DC, Rothlein R, Lane C, Kvietys PR: Anoxia/reoxygenation-induced neutrophil adherence to cultured endothelial cells. *Am J Physiol*, 262: H1891-H1898, 1992.
- 8) Inauen W, Payne DK, Kvietys PR, Granger DN: Hypoxia/reoxygenation increases the permeability of endothelial cell monolayers: role of oxygen radicals. *Free Rad Biol Med*, 9: 219-223, 1990.
- 9) Eppihimer MJ, Granger DN: Ischemia/reperfusion-induced leukocyte-endothelial interactions in postcapillary venules. *Shock*, 7: 1-10, 1997.
- 10) Zweier JL, Kuppusamy P, Luty GA: Measurement of endothelial cell free radical generation: Evidence for a central mechanism of free radical injury in postischemic tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85: 4046-4050, 1988.
- 11) Zwacka RM, Zhang Y, Schlossberg JH, Dudus L, Engelhardt JF: CD4⁺ T-lymphocytes mediate ischemia-reperfusion induced inflammatory responses in mouse liver. *J Clin Invest*, 100: 279-289, 1997.
- 12) Kokura S, Wolf RE, Yoshikawa T, Ichikawa H, Granger DN, Aw TY: Endothelial Cells exposed to anoxia/reoxygenation are hyperadhesive to T-lymphocytes: Kinetics and molecular mechanisms. *Microcirculation*, 7: 13-23, 2000.
- 13) Kokura S, Rhoads CA, Wolf RE, Yoshikawa T, Granger DN, Aw TY: NF- κ B signaling in posthypoxic endothelial cells: relevance to E-selectin expression and neutrophil adhesion. *J Vasc Res*, 38: 47-58, 2001.