

## 原 著

## 高濃度酸素環境がグルコルチコイド受容体におよぼす影響

鈴木 幸 男<sup>1)</sup> 西 尾 和 三<sup>1)</sup> 竹 内 修<sup>2)</sup>  
戸 田 京 子<sup>2)</sup> 鈴 木 達 夫<sup>2)</sup> 土 本 寛 二<sup>1)</sup>

1) 北里研究所病院内科

2) 北里研究所病院研究部バイオメディカル

## Glucocorticoid receptor expression under hyperoxic condition

Yukio Suzuki<sup>1)</sup> Kazumi Nishio<sup>1)</sup> Osamu Takeuchi<sup>2)</sup>  
Kyoko Toda<sup>2)</sup> Tatsuo Suzuki<sup>2)</sup> Kanji Tsuchimoto<sup>1)</sup>

1) Department of Internal Medicine, Kitasato Institute Hospital

2) Department of Biomedical Research, Kitasato Institute Hospital

### 要約

酸化ストレスによる炎症の第一段階は白血球と血管内皮間の相互作用であり、種々の接着分子が介在する。そこで培養ヒト肺動脈血管内皮細胞を用い、高濃度酸素 (90% O<sub>2</sub>) および大腸菌由来エンドトキシン (LPS) が接着分子の一つである intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 発現に及ぼす影響を検討した。ICAM-1 発現は高濃度酸素および LPS により増加した。高濃度酸素による ICAM-1 発現の増加はグルコルチコイド (メチルプレドニゾロン; MP) により抑制されたが、LPS による ICAM-1 発現増加は抑制されなかった。次に高濃度酸素および LPS が血管内皮細胞のグルコルチコイド受容体 (GR) 発現に及ぼす影響を検討した。高濃度酸素は LPS に比べて GR をより強く発現した。以上より高濃度酸素環境では、MP による ICAM-1 発現の抑制は GR 発現の増強を介することが示唆された。(臨床環境10: 28~32, 2001)

### Abstract

The purpose of this study is to clarify the effects of hyperoxia and lipopolysaccharide (LPS) on intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and glucocorticoid receptor (GR) expressions in endothelial cells. Human pulmonary artery endothelial cells were cultured to confluence, and then the monolayers were exposed to either control (21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) or hyperoxic (90% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) conditions with or without LPS or glucocorticoid (methylprednisolone; MP). Both hyperoxia and LPS (1μg/ml) increased the levels of ICAM-1 expression. The treatment with MP (1mM) reduced ICAM-1 expressions induced by hyperoxia, but did not reduce them induced by LPS. Hyperoxia increased the level of GR expressions more than LPS. These results suggest that MP inhibits hyperoxia-induced ICAM-1 expression via increased GR expression in endothelial cells. (Jpn J Clin Ecol 10 : 28~32, 2001)

《Key words》 oxidant injury, hyperoxia, adhesion molecule, steroid, glucocorticoid receptor

受付: 平成13年1月30日 採用: 平成13年4月13日

別刷請求宛先: 鈴木幸男

〒108-8642 港区白金5-9-1 北里研究所病院内科

Received: January 30, 2001 Accepted: April 13, 2001

Reprint Requests to Yukio Suzuki, Department of Internal Medicine, Kitasato Institute Hospital, 5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108-8642 Japan

## I. 緒言

生理的条件下の生体では白血球は血管内を滞りなく流れている。ここに酸化ストレスなどの何らかの刺激が加わると流血中の白血球は一時的に血管壁に捕捉されて再び離れ (tethering)、血管壁を転がるようになり (rolling)、次いで血管壁に付着し (adhesion)、炎症部位へと遊走する (chemotaxis)。この白血球と血管内皮の間を仲介する蛋白が接着分子である<sup>1)</sup>。我々は高濃度酸素環境などの酸化ストレスは血管内皮細胞上に接着分子の一つである intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 の発現を選択的に増強させ、白血球の血管内皮への接着を促進して肺傷害を惹起することを示した<sup>2)</sup>。

一方、臨床的に種々の自己免疫疾患や炎症性疾患に対してステロイドが広く用いられている。特にグルココルチコイドであるメチルプレドニゾロン (MP) はステロイドパルス療法として汎用されている<sup>3)</sup>。この際、グルココルチコイドは細胞質内のグルココルチコイド受容体 (GR) と結合してその抗炎症作用・免疫抑制作用を発揮することが知られている<sup>4)</sup>。

高濃度酸素環境が血管内皮細胞の GR 発現にどのような影響を与えるのかは明らかでない。そこで培養ヒト肺動脈血管内皮細胞を用いて高濃度酸素環境とグラム陰性細菌の膜構成成分であるリポ多糖 (LPS) が ICAM-1 および GR 発現におよぼす影響について対比・検討した。

## II. 方法

正常ヒト肺動脈血管内皮細胞 (クラボウ、大阪) を 10% 仔牛胎児血清 (FCS) 添加培養液 (endothelial cell growth medium、クラボウ) を用いて継代培養した後、100mm 培養皿 (Corning, New York) で単層に培養してコンフルエントとした。実験には継代数 8 代から 12 代の細胞を用いた。trypan blue 色素排除法による細胞の生存率は 95% 以上であった。

コンフルエントになった細胞の培養上清中に大腸菌由来エンドトキシン (lipopolysaccharide; LPS, serotype 955: B5, Sigma, St. Louis, MO) 1 $\mu$ g/ml

またはグルココルチコイドとしてメチルプレドニゾロン (methylprednisolone; MP, 11 $\beta$ , 17, 21-trihydroxy-6 $\alpha$ -methyl-1, 4-pregnadiene-3, 20-dione-21-sodium succinate, MW497, Upjohn, Kalamazoo, MI) 1mM を添加した。その後直ちに可変型培養器 (APM-36, ASTEC, 福岡) を用いて、各培養細胞を 21% 酸素、5% 二酸化炭素、1 気圧または 90% 酸素、5% 二酸化炭素、1 気圧に 48 時間暴露した。すなわち細胞を以下の 5 群に分けて実験を行った。1) 対照群 (無添加で 21% 酸素下で 48 時間培養)、2) 高濃度酸素群 (無添加で 90% 酸素に 48 時間暴露)、3) 高濃度酸素 + MP 群 (培養上清に MP を添加し、直ちに 90% 酸素に 48 時間暴露)、4) LPS 群 (培養上清に LPS を添加し、21% 酸素下で 48 時間培養)、5) LPS + MP 群 (培養上清に同時に LPS と MP を添加し、21% 酸素下で 48 時間培養)。実験中、培養器内の酸素および二酸化炭素濃度は経時的にモニターし、90 $\pm$ 5% および 5.0 $\pm$ 0.1% に維持した。血液ガス分析装置 (model 178, Corning) を用いて得られた高濃度酸素暴露群の培養液中の酸素分圧値は常に 580 Torr 以上であり、また対照群と高濃度酸素暴露群とで培養液中の pH 値に有意差を認めなかった。

接着分子の一つである ICAM-1 の発現はフローサイトメトリーを用いて検討した。各群の内皮細胞を回収し、Dulbecco リン酸緩衝液 (DPBS) で洗浄した。これを phycoerythrin 標識抗ヒト ICAM-1 抗体 (LB-2, Becton Dickinson, San Jose, CA) と 30 分間、4 $^{\circ}$ C で反応させた。DPBS で洗浄後、1% paraformaldehyde (Sigma) で固定した。蛍光強度はフローサイトメトリー (FACScan, Becton Dickinson) を用いて測定し、各検体とも細胞 10,000 個ずつ測定した。バックグラウンドはマウス IgG2 コントロール抗体 (Becton Dickinson) を用いて補正した。実験を 4 回ずつ施行し、結果は対照に対する相対的蛍光強度比 (%) で示した。

血管内皮細胞の GR 発現は Western blot 法により検討した。対照群および高濃度酸素暴露群の細胞を DPBS で洗浄したのち PMSF, aprotinin 添加 RIPA 緩衝液 (4 $^{\circ}$ C) に反応させ細胞溶解液を得た。得られた検体を回収し 15,000 回転、4 $^{\circ}$ C で 20

分間遠心後、上清を回収し、溶解液中の蛋白濃度を BCA 法にて測定した。等量の蛋白量の検体を SDS sample buffer (20% glycerol, 4% SDS, 0.16M Tris, 4%  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.5% bromphenol blue) と混合し、煮沸後、10% SDS-polyacrylamide gel (Realgel plate, バイオクラフト、東京) 上で電気泳動した (SDS-PAGE)。これを polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレン (Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA) に転写した後、抗グルココルチコイド受容体抗体 (E-20, Santa Cruz, Santa Cruz, CA) と反応させた。次いで HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Santa Cruz) と反応させ、ECL キット (RPN2106, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) を用いて化学発光させ、フィルム (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech) に感光させた。ゲル電気泳動画像の各バンドの量比を NIH image (National Institute of Health, Bethesda, MD) を用いて定量評価した。

実験は 4 回施行し、得られた結果を平均  $\pm$  標準偏差で表した。群間の比較には分散分析と Scheffé 検定を行い、危険率 5% 未満を有意とした (StatView II, Abacus Concepts, Berkeley, CA)。

### III. 結果

まずフローサイトメトリー法を用いて肺動脈血管内皮細胞上の ICAM-1 発現におよぼす高濃度酸素および LPS の影響を検討した (表 1)。高濃

表 1 ICAM-1 発現強度

対照群	100.0 $\pm$ 5.0
高濃度酸素群	190.6 $\pm$ 9.5*
高濃度酸素 +MP 群	124.7 $\pm$ 6.2†
LPS 群	351.1 $\pm$ 68.3*
LPS+MP 群	364.2 $\pm$ 76.4

MP; methylprednisolone, LPS; lipopolysaccharide  
\* $p < 0.05$  vs 対照群, † $p < 0.05$  vs 高濃度酸素群

肺血管内皮細胞を高濃度 (90%) 酸素またはエンドトキシン (LPS, 1  $\mu$ g/ml) で 48 時間刺激し、一部の実験では培養上清中にグルココルチコイド (MP, 1mM) を加えた。ICAM-1 発現強度をフローサイトメトリーで測定し、対照 (100%) に対する相対的蛍光強度比 (%、平均  $\pm$  標準偏差) を求めた。

度酸素群で ICAM-1 発現は対照群に比較して約 1.9 倍増加し、これは MP の同時投与により抑制された (高濃度酸素 +MP 群)。一方、LPS 群では ICAM-1 発現は対照群に比較して約 3.5 倍と増加したが、MP 投与によって抑制されなかった (LPS+MP 群)。即ち高濃度酸素および LPS という刺激の種類によって ICAM-1 発現の程度や MP に対する反応性が異なることが示された。

そこでグルココルチコイド受容体に及ぼす高濃度酸素および LPS の影響を Western blot 法を用いて検討した。結果を図 1 に示す。刺激後 2 時間では高濃度酸素暴露と LPS 刺激で GR 発現に有意差を認めなかった。その後、高濃度酸素暴露および LPS 刺激による GR 発現は 4 時間で各々 250  $\pm$  63% および 139  $\pm$  24%、8 時間で 274  $\pm$  69% および 115  $\pm$  20% であり、高濃度酸素暴露による GR 発現は LPS 刺激よりも高値であった ( $P < 0.05$ )。即ち、高濃度酸素暴露の方が LPS 刺激に比べて GR 発現はより強く、かつ長時間発現することが示された。

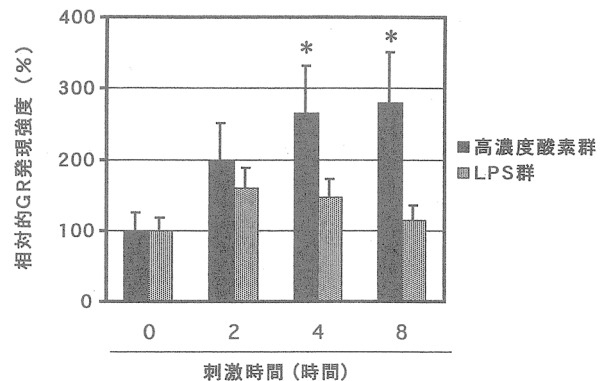


図 1 グルココルチコイド受容体 (GR) 発現の経時的変化

高濃度酸素および LPS 刺激による GR 発現の経時変化を示す。対照を 100% として相対的強度比 (%、平均  $\pm$  標準偏差) で示した。\* $p < 0.05$  vs LPS 群。

### IV. 考按

ICAM-1 は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する接着分子であり、通常、様々な細胞表面に分布し、TNF- $\alpha$  や IL-1, 6, 8 などの炎症性サイトカインによってその発現が増強される<sup>1)</sup>。ICAM-1 は好中球表面の CD11a/CD18 (LFA-1) や

CD11b/CD18(Mac-1) と結合し、白血球の血管内皮細胞への接着に中心的な役割を果たす。このCD18/ICAM-1 を介する接着経路は様々な病態、例えば気管支喘息、虚血・再灌流障害、敗血症などに関与する。高濃度酸素および LPS の両刺激とも血管内皮細胞の ICAM-1 発現を亢進させた(表1)。高濃度酸素が ICAM-1 発現を増強する機序として、第1に高濃度酸素が血管内皮細胞を刺激して IL-1, 8 や PAF などを産生させ、これらの可溶性因子が血管内皮細胞を刺激して ICAM-1 発現が増強すること (autocrine)、第2に高濃度の酸素分子自体が直接、血管内皮細胞を刺激することが考えられた。

MP により高濃度酸素による ICAM-1 発現増強は抑制されたが、LPS による ICAM-1 発現増強は抑制されなかった(表1)。この機序として図1で示したように高濃度酸素の方が LPS より GR が強く発現し、MP が結合しやすく作用発現が強いことが考えられた。このように刺激の種類により GR 発現の程度や動態が異なることが示された。そして MP は高濃度酸素暴露による ICAM-1 発現を抑制して白血球の血管内皮への接着を抑制し、臓器傷害を軽減することが推測された。

グルココルチコイド (GC) は視床下部-下垂体-副腎系のエフェクター分子として副腎皮質より分泌されるステロイドホルモンであり、糖質・脂肪・蛋白質の代謝、抗炎症作用・免疫抑制作用など生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている。標的臓器において GC は GR を介して作用を発揮する。GR はヒトのすべての有核細胞に存在し、GC の作用を発現するうえで不可欠の分子である。GR は核内レセプタースーパーファミリーに属する転写因子であり、細胞質で熱ショック蛋白質 (heat shock protein 90; hsp90) などと安定な複合体を形成している。GR は GC と結合すると hsp90を乖離し、活性化される。活性化された GR は速やかに核内に移行しホモ二量体を形成する。その後、GR は標的遺伝子のプロモーター領域にあるグルココルチコイド応答配列 (GRE) に結合し RNA ポリメラーゼ II を活性化

して標的遺伝子の転写を促進させる<sup>4)</sup>。

近年、GR が他の細胞内情報伝達系と密接にクロストークし、標的遺伝子の発現を転写レベルで調節することが明らかになってきた<sup>5)</sup>。特に AP-1 や NF- $\kappa$ B と GR との相互作用は GC による情報伝達系と増殖因子、サイトカイン、接着分子などによる情報伝達系のクロストークの分子機構として重要である<sup>6,7)</sup>。GC は GRE に結合することなく NF- $\kappa$ B や AP-1 と蛋白質-蛋白質相互作用を介して、NF- $\kappa$ B や AP-1 の標的遺伝子に対する転写活性を抑制する<sup>8)</sup>。これには種々のサイトカイン、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS)、誘導型サイクロキシゲナーゼ (COX-2)、エンドセリン-1、接着分子などの蛋白質が含まれる。このようにプロモーター領域に GRE を認めないが GC により転写が抑制される遺伝子が多数あることは注目すべきである。

高濃度酸素環境のように GR 発現が長時間増強するような病態では、治療としてグルココルチコイドが有用である可能性が高い。逆に LPS のように GR 発現が軽微の場合にはグルココルチコイドの効果が期待できない。すなわち種々の炎症性疾患に対してステロイド治療を行う際に、GR の発現状態を検討してステロイド投与の是非を決定する時代が近い将来、到来すると思われる。

## V. 文献

- 1) Adams DH, Shaw S: Leukocyte-endothelial interactions and regulation of leukocyte migration. *Lancet* 343: 831-836, 1994
- 2) Suzuki Y, Aoki T, et al; Effect of hyperoxia on adhesion molecule expression in human endothelial cells and neutrophils. *Am J Physiol* 272: L418-L425, 1997
- 3) Chiara O, Giomarelli PP, et al: Inhibition by methylprednisolone of leukocyte-induced pulmonary damage. *Crit Care Med* 19: 260-265, 1991
- 4) Barnes PJ: Anti-inflammatory actions of glucocorticoid: molecular mechanisms. *Clin Sci* 94: 557-572, 1998

- 5) Göttlicher M, Heck S. et al: Transcriptional crosstalk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J Mol Med* 76:480-489, 1998
- 6) Auphan N, DiDonato JA, et al: Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- $\kappa$ B activity through induction of I $\kappa$ B synthesis. *Science* 270:286-290, 1995
- 7) Foletta VC, Segal DH, et al: Transcriptional regulation in the immune system: all roads lead to AP-1. *J Leukoc Biol* 63:139-152, 1998
- 8) Ray A, Prefontaine KE: Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF- $\kappa$ B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:752-756, 1994