

虚血,再灌流障害における転写因子NF- κ B活性化の関与

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 村岡, 恵一 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9113

虚血、再灌流障害における転写因子NF- κ B 活性化の関与

金沢大学医学部外科学第二講座 (主任: 宮崎逸夫教授)

村 岡 恵 一

移植臓器の機能的予後に大きな影響を与える虚血、再灌流障害において、腫瘍壊死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α), インターフェロン- γ (interferon- γ), 顆粒球コロニー形成刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF), インターロイキン-6 (interleukin-6, IL-6), インターロイキン-8 (interleukin-8, IL-8) 等のサイトカインや細胞間接着分子 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1), 血管細胞接着分子 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1), E-セレクトリン等の接着分子が関与していると考えられているが、その機序に関しては未だ解明されていない点が多い。また、これらのサイトカイン遺伝子および接着分子遺伝子の発現には、転写因子である核内因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) の活性化が必要であるが、虚血、再灌流時の、これらの遺伝子の転写活性について検討した報告はない。虚血、再灌流障害における NF- κ B の関与について明らかにするために、培養細胞を用いて、低酸素化、再酸素化における NF- κ B の活性化について検討する目的で以下の実験を行った。マウス線維芽細胞 (L-TK⁻細胞) に、IL-6 遺伝子の TATA ボックスだけを含む領域の上流に κ B 配列のみを組み込んだものをリポーター遺伝子として、トランスフェクションし、低酸素化による IL-6 遺伝子の転写活性をクロラムフェニコールアセチル化酵素 (chloramphenicol acetyl transferase, CAT) アッセイで測定した。低酸素化および再酸素化における NF- κ B の DNA 結合活性を IL-6 遺伝子の κ B 配列をプローブとして用い、電気泳動シフトアッセイ (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 法にて検討した。さらに、NF- κ B のインヒビターである阻害因子 κ B (I κ B α) のプロセッシングを抗 I κ B α 抗体を用い、ウェスタンブロット法にて検討した。その結果、低酸素化による IL-6 遺伝子の転写活性は、経時的に増強し、低酸素に5時間暴露した場合、コントロールに比べ、転写活性は約5倍に増強した。しかし、IL-6 の κ B 配列の変異型を組み込んだものをリポーター遺伝子とした場合、低酸素化による IL-6 遺伝子の転写活性化を認めなかった。低酸素化により NF- κ B の DNA 結合活性は誘導されたが、再酸素化することにより元に復した。低酸素化により I κ B α はプロセッシングされたが、再酸素化することにより再合成され、未刺激の状態に戻った。また、NF- κ B の活性化は、抗酸化剤である N-アセチルシステイン (N-acetyl cysteine, NAC), トコフェロールおよびチロシンキナーゼインヒビターであるゲニステインを前投与することにより抑制された。さらに、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (mitogen activated protein kinase, MAPK) ファミリーに特異的なフォスファターゼである CL100 発現遺伝子をコトランスフェクションし多量発現させることにより低酸素化による NF- κ B の活性化は抑制されたが、細胞外シグナル規定キナーゼ (extracellular signal-regulated kinase, ERK) の上流に位置しこれを活性化する MAP/ERK キナーゼ (MEK) の発現遺伝子をコトランスフェクションし多量発現させても NF- κ B の活性化は抑制されなかった。以上の結果から、低酸素刺激により I κ B α がプロセッシングされ、活性化された NF- κ B が核内に移行することにより、 κ B 配列を介した IL-6 遺伝子の発現が誘導されると考えられた。さらに、低酸素化による NF- κ B 活性化の経路に細胞内活性化酸素、チロシンキナーゼおよび ERK 以外の MAP キナーゼが関与している可能性が示唆された。以上より、虚血、再灌流障害の一機序として低酸素化による NF- κ B 活性化の関与が示唆された。

Key words hypoxia, ischemia-reperfusion injury, MAP kinase, NF- κ B, reoxygenation

臓器移植において、虚血、再灌流障害は、移植臓器の機能的予後に大きな影響を与える因子として、注目を集めている¹⁾²⁾。虚血、再灌流障害とは、血流の途絶により障害された組織が血流再開により、さらに障害される現象といえる。虚血、再灌流による組織障害の機序として、再灌流後に血管内皮やマクロファージから産生される化学走化性因子により、好中球が再灌流を受けた組織へ集積して活性化され、血管内皮細胞へ接着

し、さらに血管外へ遊走して、細胞障害をひきおこす過程が、重要であると考えられている³⁾⁷⁾。好中球の集積、血管内皮細胞への接着、血管外への遊走において、腫瘍壊死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α), インターロイキン-6 (interleukin-6, IL-6), インターロイキン-8 (interleukin-8, IL-8) 等のサイトカインや細胞間接着分子 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1), 血管細胞接着分子 (vascular cell adhesion molecule-

平成6年12月15日受付, 平成7年1月27日受理

Abbreviations: CAT, chloramphenicol acetyl transferase; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; DMSO, dimethyl sulphoxide; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FCS, fetal calf serum; G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; IFN- γ , interferon- γ ; IL-1, interleukin-1; IL-6, interleukin-6; IL-8, interleukin-8; LFA-1,

1, VCAM-1), E-セレクトイン等の接着分子が関与していると考えられているが^{8)~10)}, その機序に関しては未だ解明されていない点が多い。

これらのサイトカイン遺伝子および接着分子遺伝子の発現には, 転写因子である核内因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) の活性化が必要であるが^{11)~15)}, 虚血, 再灌流障害における NF- κ B 活性化の関与について検討した報告はない。

また, 最近, マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (mitogen activated protein kinase, MAPK) ファミリーが, NF- κ B 活性化と共通する幾つかの刺激で活性化されることが報告されている。

本研究では, 低酸素および再酸素化における NF- κ B 活性化の関与とその活性化経路, ならびに, MAP キナーゼファミリーとの関連性についての基礎的検討を行った。

材料および方法

I. 細胞および培養法

マウス線維芽細胞 (L-TK⁻) を実験に使用した。細胞は10%牛胎児血清 (fetal calf serum, FCS) を添加した Dulbecco 変法 Eagle 培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) (日本製薬, 東京) にて培養した。マウス線維芽細胞 (L-TK⁻) は, 大阪大学細胞工学センター平野俊夫博士より提供を受けた。

II. 低酸素化および再酸素化の実験モデル

細胞を 5% CO₂ 気相下で 24 時間培養後, 大気コントロール培養チェンバー (Bellco, Vineland, NJ, USA) 内に移し, O₂ (0%), CO₂ (5%) および N₂ の混合ガスを 10l/min の流量で 5 分間, 注入した後, 37°C の恒温室に静置した。これを低酸素化とした。1 時間, 3 時間, 5 時間, 7 時間後に培養細胞を大気コントロール培養チェンバーからとりだし, 通常の酸素濃度下の CO₂ 培養装置内に置換した。これを再酸素化とした。

III. 低酸素化による NF- κ B の転写活性化の測定

低酸素化による NF- κ B の転写活性化は, IL-6 遺伝子の TATA ボックスだけを含む領域の上流に IL-6 遺伝子の κ B 配列 (5'-GGGATTTTCCC-3') のみを 3 つ組み込んだもの (IL-6 κ BCAT) をリポーター遺伝子としてトランスフェクションした細胞を用い, クロラムフェニコールアセチル化酵素 (chloramphenicol acetyl transferase, CAT) アッセイにて測定した。また, IL-6 遺伝子の κ B 配列 (5'-GGGATTTTCCC-3') を (5'-GGGATTTTCCG-3') に変異させたリポーター遺伝子 (p κ Bmt) を用い, CAT アッセイを行った。

CAT アッセイの方法を以下に示す。細胞を 60mm ディッシュに 1.5×10^6 個播種し, 5%FCS 添加 DMEM 培地で 24 時間培養後, リポーター遺伝子 5 μ g をジェチルアミノエチルデキストラン法¹⁶⁾ でトランスフェクションした。トランスフェクションの効率を上げる目的で, 90 分後, 10%ジメチルスルホキシド (dimethyl sulphoxide, DMSO) (SIGMA, St. Louis, USA) 含有 DMEM 培地 2ml を添加し 2 分間静置した後, DMEM 培地にて洗浄し, 24 時間, 無血清 DMEM 培地にて培養した。

細胞を大気コントロールチェンバー内に一定時間静置して低酸素に暴露後, 通常の酸素濃度下の CO₂ 培養装置内で 5 時間培

養し, 超音波発生装置を用い, 緩衝液 (0.25M Tris-HCl, pH 7.8) 80 μ l 内でホモジナイズし, 細胞質内蛋白質を抽出した。

抽出した蛋白質 50 μ g と ¹⁴C-クロラムフェニコール (25 μ Ci/ml) (アマシャムジャパン, 東京) 5 μ l と 4mM アセチルコエンザイム A 20 μ l とを 37°C, 90 分間インキュベーション後, シリカゲル TLC プレート (MERK, Darmstadt, Germany) に展開し, バイオイメージングアナライザー BAS1000 (FUJIX, 東京) で転写活性を測定した¹⁷⁾。

また, NF- κ B のインヒビターである I κ B α 遺伝子, MAP キナーゼファミリーに特異的なフォスファターゼである CL100 遺伝子 (0.2 μ g), および, MAP キナーゼの上流に位置し, MAP キナーゼを活性化する MAP/ERK キナーゼ 1 (MEK1) のドミナントネガティブの発現遺伝子 (2 μ g) をリポーター遺伝子とコトランスフェクションし, 強発現させた後, 低酸素に暴露した。抗酸化剤である N-アセチルシステイン (N-acetyl cysteine, NAC) (50mM), トコフェロール (10 μ g/ml) および, チロシンキナーゼインヒビターであるゲニステイン (50 μ M) は, 低酸素暴露開始 2 時間前に培地中に添加した。

IV. NF- κ B の DNA 結合活性

低酸素化および再酸素化における NF- κ B の DNA 結合活性は, 電気泳動シフトアッセイ (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 法にて検討した¹⁸⁾¹⁹⁾。

IL-6 遺伝子の κ B 配列 (5'-GGGATTTTCCC-3') をプローブとして用いた。DNA フラグメント 1 μ g, ³²P-CTP (アマシャムジャパン) 3 μ l, Klenow ポリメラーゼ (1.6u/ml) (東洋紡, 東京) 1.5 μ l, 10 倍 Klenow 緩衝液 (東洋紡) 2 μ l, 5mM のアデニン, グアニン, チミンの混合液 (2 μ l), および, 再蒸留水を加えた溶液 20 μ l を 37°C, 30 分間インキュベーションし, プローブの 3' 末

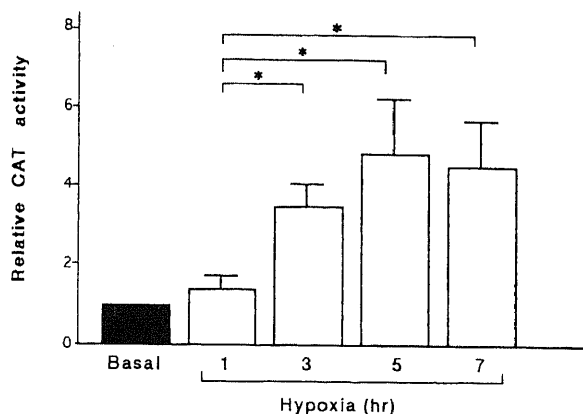


Fig. 1. Hypoxia-induced transcriptional activation of NF- κ B. L-TK⁻ cells were transfected with the IL-6 κ BCAT reporter gene which contains three functional NF- κ B binding sites and were exposed to hypoxia for various times. Cell extracts were prepared for CAT activity determination. CAT activities were expressed relative to the basal CAT activity which was set at a value of 1. Cells transfected with IL-6 κ BCAT increased their CAT activity 5-fold after a 5-hour exposure to hypoxia. *, $p < 0.05$ compared to the relative CAT activity of the cells which were exposed to 1-hour hypoxia (Student's t test).

lymphocyte-function associated antigen-1; LPS, lipopolysaccharide; LTB₄, leukotriene B₄; MAPK, mitogen activated protein kinase; MEK, MAP/ERK kinase; NAC, N-acetyl cysteine; NF- κ B, nuclear factor- κ B; PAF, platelet activating factor; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1

端を ^{32}P で標識した。

細胞を大気コントロールチャンバー内で、1時間、3時間、5時間、7時間、低酸素に暴露した直後、および、5時間低酸素暴露後1時間、2時間、再酸素化した直後に、Dignamら¹⁹⁾の方法に従って、核内蛋白質を抽出した。

核内蛋白質 12 μg を混じた緩衝液 (20mM HEPES, pH 7.5, 40mM KCl, 0.2mM EDTA, 1mM dithiothreitol, poly (dI·dC)-poly (dI·dC) 2 μg , 10%グリセロール, 2%ポリビニルアルコール) 19 μl を室温にて10分間静置後、30000cpm/ μl に調整したプローブ 1 μl を添加し、室温にて20分間インキュベーション後、4%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した²⁰⁾²¹⁾。ポジティブコントロールとして、ヒトリコンビナントインターロイキン-1 (human recombinant interleukin-1, human recombinant IL-1) (20ng/ml) を核内蛋白質抽出30分前に投与した。

プローブと結合した蛋白質が NF- κB であることを同定する目的で、IL-6 遺伝子の κB 配列を含む DNA フラグメント 30ng, リコンビナント I $\kappa\text{B}\alpha$ 1 μg , NF- κB のサブユニットである p50, p65 に対する抗体をそれぞれ核内蛋白質とインキュベーションした後、 ^{32}P で標識したプローブと反応させ、EMSA を行った。

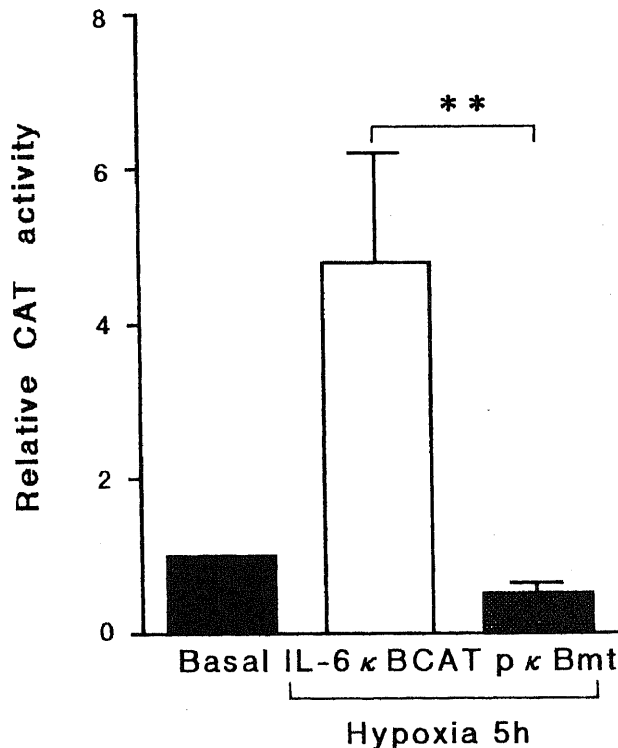


Fig. 2. Hypoxia-induced κB -dependent transcriptional activation. L-TK⁻ cells were transfected with the IL-6 κBCAT reporter gene or with the p κBmt reporter gene which is identical to IL-6 κBCAT except its three NF- κB binding sites have been mutated, and were exposed to 5-hour hypoxia. Cell extracts were prepared for CAT activity determination. When p κBmt was transfected, no transcriptional activation by hypoxia was observed. **, $p < 0.01$ compared to the relative CAT activity of the cells which were transfected with the IL-6 κBCAT reporter gene (Student's t test).

V. ウエスタンブロット法による I $\kappa\text{B}\alpha$ のプロセッシングの評価

NF- κB のインヒビターである、I $\kappa\text{B}\alpha$ のプロセッシングを SDS-PAGE で検討した。

低酸素刺激後、細胞を緩衝液 (20mM Tris-HCL, pH 7.4, 0.1% SDS, 1% トリトン, 10% デオキシコール酸ナトリウム) 50 μl でホモジネーションして抽出した試料 15 μl と 2-メルカプトエタノール (和光純薬, 大阪) 3 μl とを混和し、2分間、煮沸後、10%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。ECL-ニトロセルロース膜 (アマシャムジャパン) に転写し、このニトロセルロース膜を抗 I $\kappa\text{B}\alpha$ 抗体と反応させ、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合法により発色させた。

VI. 統計処理法

CAT アッセイ法で測定した IL-6 遺伝子の転写活性は、平均値±標準偏差 (SD) で表現した。各平均値間の検定には Student t 検定を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

成 績

1. 低酸素化による NF- κB の転写活性

低酸素化による IL-6 遺伝子の転写活性を CAT アッセイで測定した結果を図1に示す。IL-6 遺伝子の転写活性は、経時的に増強し、低酸素に5時間暴露した場合、コントロールに比べ、約5倍に増強した。

しかし、図2に示すように、IL-6 遺伝子の κB 配列

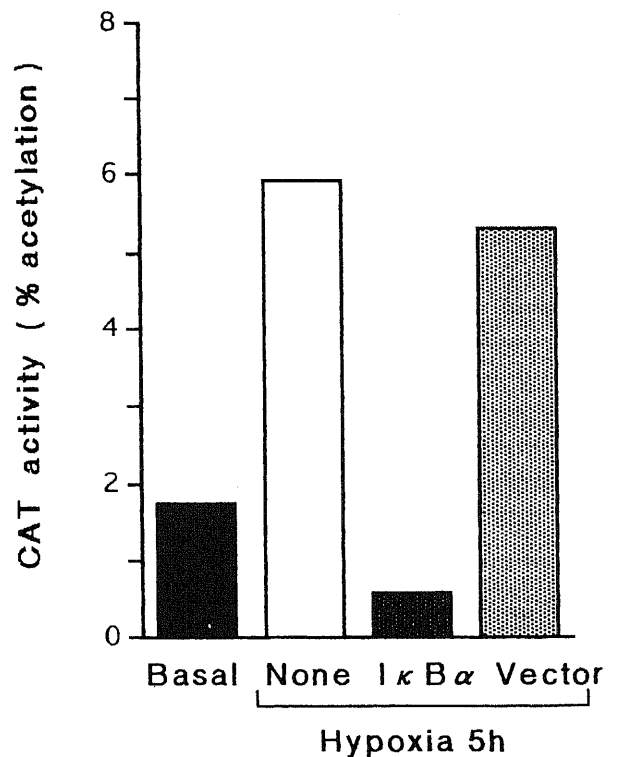


Fig. 3. Effect of the expression of I $\kappa\text{B}\alpha$ on hypoxia-induced κB -dependent transcriptional activation. L-TK⁻ cells were cotransfected with the expression vector of I $\kappa\text{B}\alpha$ and were exposed to 5-hour hypoxia. Cell extracts were prepared for CAT activity determination. When the expression vector of I $\kappa\text{B}\alpha$ was transfected, no transcriptional activation by hypoxia was observed.

(5'-GGGATTTTCCC-3') を (5'-GGGATTTTCCG-3') に変異させたリポーター遺伝子 (κ Bmt) をトランスフェクションした後, 低酸素に 5 時間暴露させた場合, IL-6 遺伝子の転写活性化は認めなかった. また, 図 3 に示すように, NF- κ B のインヒビ

ターである I κ B α の発現遺伝子をリポーター遺伝子とコトランスフェクションし, 多量発現させることにより, IL-6 遺伝子の転写活性化は抑制された.

低酸素暴露開始 2 時間前に, 抗酸化剤である NAC, トコフェロール, チロシンキナーゼインヒビターであるゲニステインを培地中に添加した. その結果, 図 4 に示すように, 低酸素による IL-6 遺伝子の転写活性化は, これらの薬剤により, 有意に抑制された.

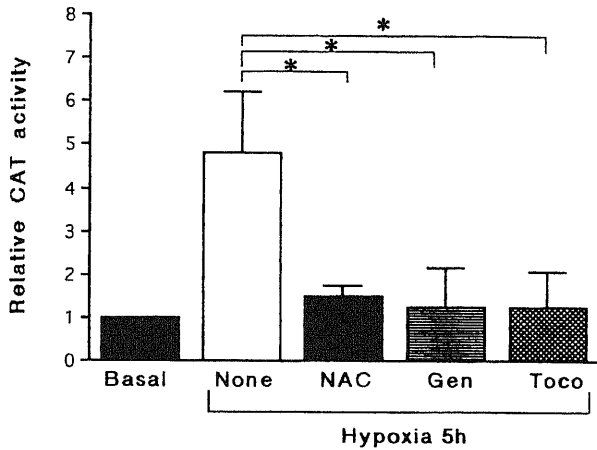


Fig. 4. Effect of tyrosine kinase inhibitors and antioxidants on κ B-dependent transcriptional activation induced by hypoxia. L-TK⁻ cells were exposed to hypoxia for 5 hours in the absence or presence of genistein (Gen) (50 μ M), N-acetyl cysteine (NAC) (50 mM) or α -tocopherol (Toco) (10 μ g/ml). κ B-dependent transcriptional activation was estimated by CAT activity determination. Pretreatment of cells with tyrosine kinase inhibitors and antioxidants inhibited the transcriptional activation by hypoxia. *, $p < 0.05$ compared to the relative CAT activity of the cells which were exposed to 5-hour hypoxia (Student's t test).

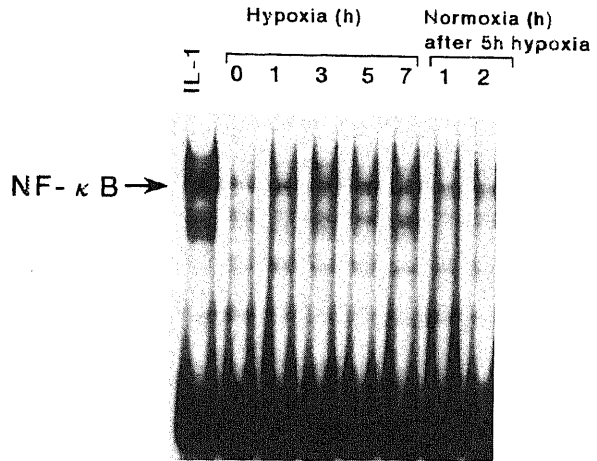


Fig. 5. EMSA of the DNA binding activity of NF- κ B. L-TK⁻ cells were exposed to hypoxia and then normoxia for various times. Nuclear extracts were prepared for EMSA analysis with IL-6 κ B probes. The DNA binding activity of NF- κ B was induced by hypoxia.

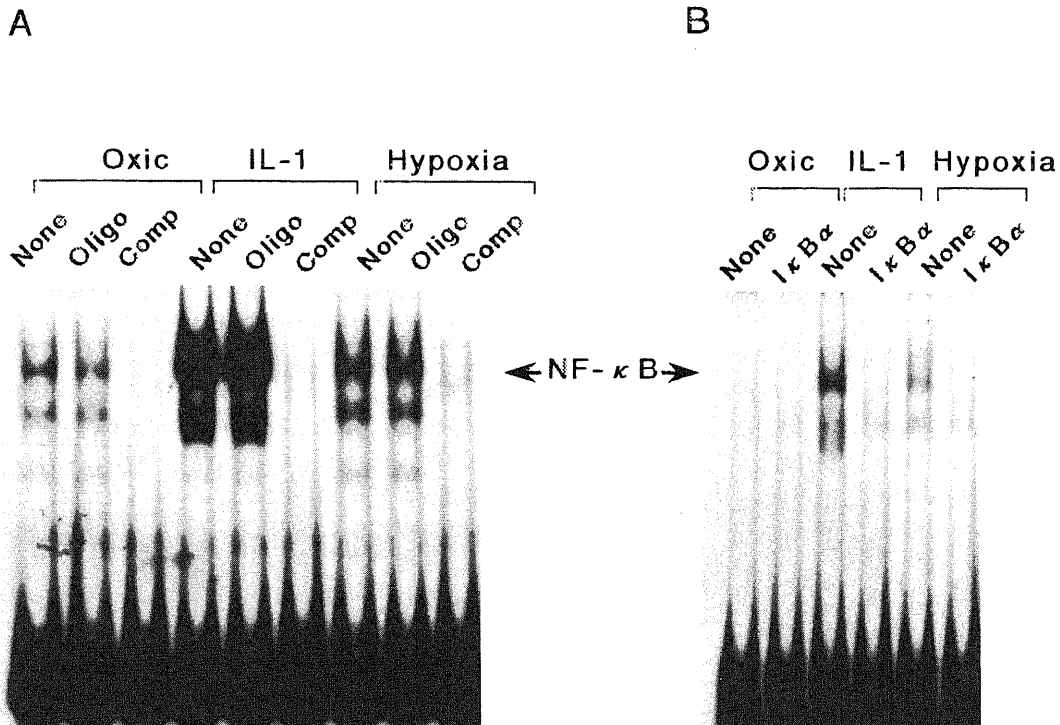


Fig. 6. EMSA of the DNA binding activity of NF- κ B. L-TK⁻ cells were exposed to hypoxia for 5 hours. Nuclear extracts were prepared for EMSA analysis with IL-6 κ B probes. A, Hypoxia-induced DNA binding activity was abolished by competition with an excess of unlabelled oligonucleotide (30 ng) which contains κ B sites (lanes comp, competitor). B, Hypoxia-induced DNA binding activity was abolished by I κ B α (1 μ g).

II. 低酸素化および再酸素化による NF- κ B の DNA 結合活性

低酸素化および再酸素化における NF- κ B の DNA 結合活性を EMSA 法にて分析した結果を図 5 に示す. NF- κ B の

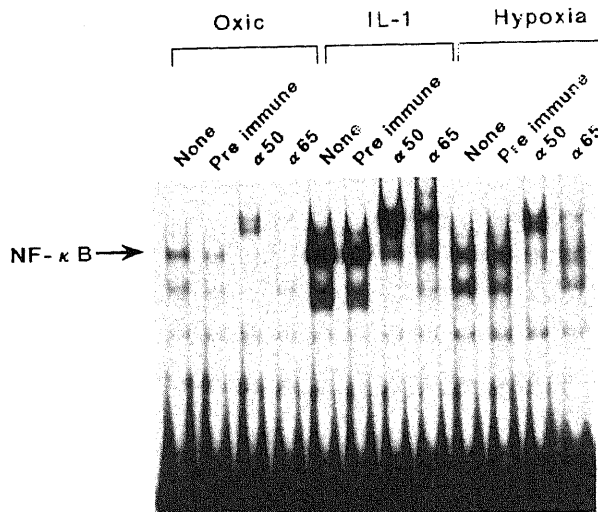


Fig. 7. Supershift assays of NF- κ B-binding activity induced by a 5-hour hypoxia. Preincubation of 12 μ g of nuclear extracts from L-TK⁻ cells treated with hypoxia with preimmune (control), and anti-p50 (α 50) and anti-p65 (α 65) sera before EMSA resulted in supershift bands consistent with the formation of DNA-protein-antibody complexes containing p50 and p65.

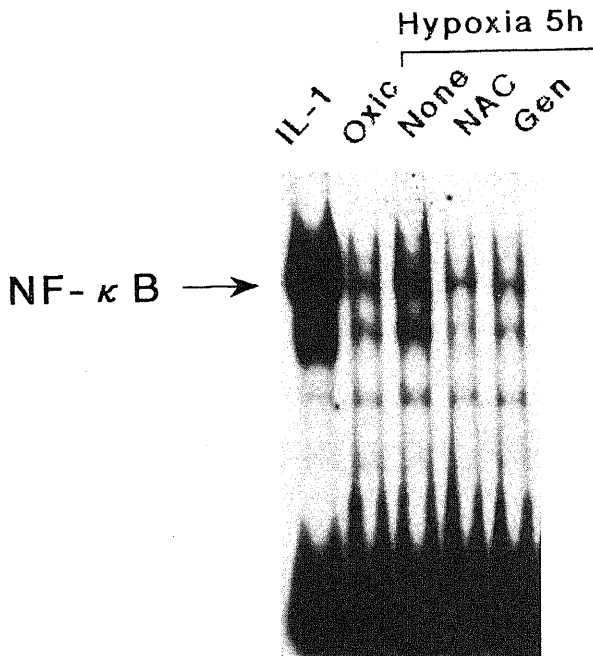


Fig. 8. Effect of tyrosine kinase inhibitors and antioxidants on hypoxia-induced NF- κ B binding activation. Nuclear extracts prepared from L-TK⁻ cells exposed to 5-hour hypoxia in the absence or presence of genistein (Gen) (50 μ M) or N-acetyl cysteine (NAC) (50 mM) were analysed on EMSA with IL-6 κ B probes. Pretreatment of cells with tyrosine kinase inhibitors and antioxidants inhibited the hypoxia-induced NF- κ B binding activation.

DNA 結合活性は、低酸素暴露後 1 時間目から誘導され、低酸素に 5 時間暴露させた後、再酸素化することにより、元に復した。

IL-6 遺伝子の κ B 配列を含む DNA フラグメント 30ng をあらかじめ、核内蛋白質とインキュベーションした後、³²P で標識したプローブと反応させ、EMSA を行った (コンペティションアッセイ) 結果を図 6 A に示す. κ B 配列を含む DNA フラグメントと核内蛋白質を予めインキュベーションすることにより、NF- κ B の DNA 結合活性は消失した。

また、図 6 B に示すように、リコンビナント I κ B α 1 μ g をあらかじめ、核内蛋白質とインキュベーションし、プローブと反応させた後、EMSA を行った結果、NF- κ B の DNA 結合活性は消失した。

抗 p50 抗体と抗 p65 抗体をそれぞれ、核内蛋白質とインキュベーションを行った後、プローブと反応させ、EMSA を行った (スーパーシフトアッセイ) 結果を図 7 に示す. 抗 p50 抗体および抗 p65 抗体を投与することにより、それぞれ、バンドがシフトした。

抗酸化剤である NAC およびチロシンキナーゼインヒビターであるゲニステインを低酸素暴露 2 時間前に培地に投与し、その効果を EMSA にて分析した結果を図 8 に示す. 低酸素による NF- κ B の DNA 結合活性は、NAC およびゲニステインの前投与により抑制された。

III. 低酸素化および再酸素化における I κ B α のプロセッシング

低酸素化および再酸素化における、I κ B α のプロセッシングを抗 I κ B 抗体を用い、ウエスタンブロット法で分析した結果を図 9 に示す。

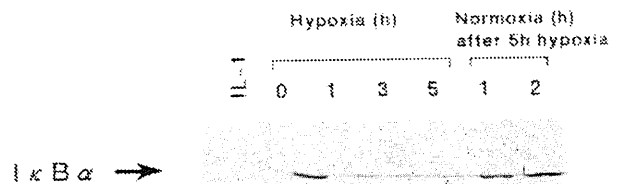


Fig. 9. Western blot analysis of I κ B α protein in L-TK⁻ cells which were exposed to hypoxia and then normoxia for various times. Cell extracts were prepared for Western blot analysis with anti I κ B α antiserum. I κ B α processing was induced by hypoxia but not by reoxygenation.

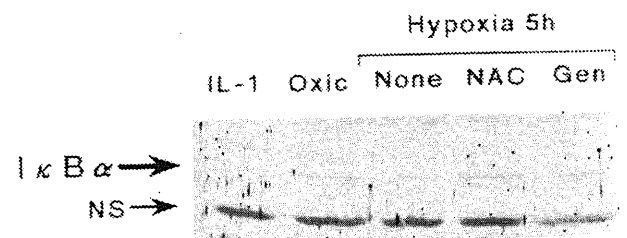


Fig. 10. Effect of tyrosine kinase inhibitors and antioxidants on hypoxia-induced I κ B α processing. Cell extracts prepared from L-TK⁻ cells exposed to 5-hour hypoxia in the absence or presence of genistein (Gen) (50 μ M) or N-acetyl cysteine (NAC) (50 mM) were analysed by Western blot analysis with anti I κ B α antiserum. Pretreatment of cells with tyrosine kinase inhibitors and antioxidants inhibited hypoxia-induced I κ B α processing.

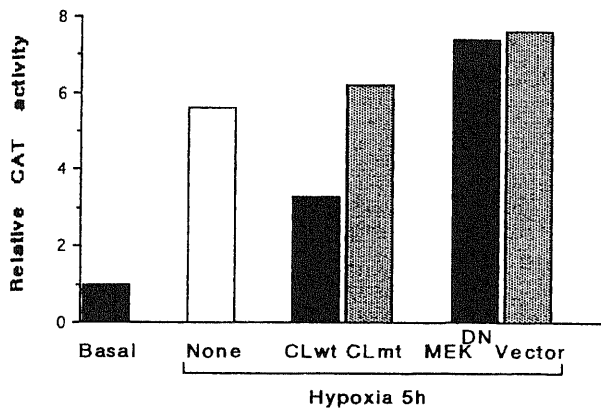


Fig. 11. Effect of MEK dominant negative and CL100 expression on κ B-dependent transcriptional activation induced by hypoxia. L-TK⁻ cells were cotransfected with κ B reporter genes and CL100 or MEK dominant negative expression vectors, and were exposed to hypoxia for 5 hours. κ B-dependent transcriptional activation was estimated by CAT activity determination. When CL100 expression vector was cotransfected, κ B-dependent transcriptional activation was inhibited. But when MEK dominant negative expression vector was cotransfected, κ B-dependent transcriptional activation was not inhibited.

ポジティブコントロールとして, IL-1 (20ng/ml) を培地中に添加すると, 30分で I κ B α はプロセッシングされた。

低酸素に1時間, 3時間, 5時間暴露させることにより, I κ B α は, プロセッシングされた。また, 低酸素に5時間暴露させた後, 再酸素化することにより, I κ B α の細胞質内のレベルは, 未刺激のレベルに復した。

低酸素化による I κ B α のプロセッシングにおける, 抗酸化剤である NAC およびチロシンキナーゼインヒビターであるゲニステインの効果について検討した結果を図10に示す。NAC およびゲニステインの前投与により, I κ B α のプロセッシングは抑制された。

IV. 低酸素化による NF- κ B の活性化における MAP キナーゼファミリーの関与

リポーター遺伝子 (IL-6 κ BCAT) と CL-100 の発現遺伝子 (0.2 μ g), または, MEK1 のドミナントネガティブの発現遺伝子 (2 μ g) をコトランスフェクションし, 細胞内に多量発現させた後, 低酸素化による IL-6 遺伝子の転写活性を CAT アッセイにて測定した結果を図11に示す。

CL100 の発現遺伝子をコトランスフェクションし, 多量発現させることにより, 低酸素による IL-6 遺伝子の転写活性化は抑制された。しかし, MEK1 のドミナントネガティブの発現遺伝子をコトランスフェクションし, 多量発現させることにより, 低酸素化による IL-6 遺伝子の転写活性化は抑制されなかった。

考 察

組織の虚血, 再灌流障害には, サイトカインや接着分子が重要な役割を担っていると考えられている。それらの因子の障害過程は, 次のように6段階に分けて考えることができる²⁹。まず第1段階では, 虚血および再灌流に伴い血管内皮やマクロファージなどからいくつかの化学走化性因子が産生される。そのなかでも補体成分の C5a, ロイコトリエン B₄ (leukotriene

B₄, LTB₄), 血小板活性化因子 (platelet activating factor, PAF), およびインターロイキン-1 (interleukin-1, IL-1), TNF- α , IL-8 等の種々のサイトカインの産生が再灌流時の初期において重要であると考えられている²⁹⁻³¹。産生されたこれらの因子により, 好中球が再灌流を受けた組織に集積する。第2段階では, 産生された化学走化性因子により好中球の活性化が行われる。すなわち, LTB₄, PAF, 種々のサイトカインなどにより刺激された好中球に Mac-1, リンパ球機能関連抗原 (lymphocyte-function associated antigen-1, LFA-1) などの接着分子の発現増強が認められる。第3段階では, 接着分子を介した好中球の内皮細胞上におけるローリングおよび初期接着が行われる。ローリング現象は, 内皮細胞上の P-セレクトリンや E-セレクトリンを介した接着により誘導され²⁹, また, 好中球上の L-セレクトリンに対するモノクローナル抗体で阻害される²⁹ ことから, これら3種のセレクトリンが重要な役割を担っていると考えられている。第4段階では, 活性化された LFA-1, Mac-1, ICAM-1 などの接着分子を介した好中球の血管内皮細胞への接着が認められる。これらの接着分子の発現量は炎症性サイトカインの IL-1, TNF- α やインターフェロン- γ (interferon- γ , IFN- γ) などの刺激により増加する³⁰。第5段階では, 血管内皮細胞に接着した好中球の血管内皮を越えた血管外への遊走が行われる。この遊走は LFA-1, Mac-1 と ICAM-1 の相互作用を介して起こる³¹。変形した好中球が内皮細胞を通過する際には, 隣り合う内皮細胞間の解離による血管透過性亢進を伴う。血管透過性の亢進は, IL-1, TNF- α , 顆粒球コロニー形成刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF), IL-6 などのサイトカインにより誘導される³²⁻³⁵。

第6段階は, 血管外に遊走した好中球による細胞障害である。虚血後再灌流による組織障害には活性酸素の発生が重要であり, Mac-1, ICAM-1 を介した接着が重要であると考えられている³⁴。

すなわち, 虚血, 再灌流障害の過程において, 種々のサイトカインおよび接着分子が重要な役割を担っていると考えられる。そして, TNF- α , IFN- γ , G-CSF, IL-6, IL-8 等のサイトカイン遺伝子および ICAM-1, VCAM-1, E-セレクトリン等の接着分子遺伝子の発現誘導には, 転写因子 NF- κ B の活性化が必要であることから^{11)-15,36)-38)}, 虚血, 再灌流障害に NF- κ B 活性化の関与が強く示唆される。しかし, 虚血, 再灌流時のこれらの遺伝子の転写活性化の機序について検討した報告はない。そこで, 本実験では, 低酸素化および再酸素化と NF- κ B 活性化の関与, ならびに, その機序について基礎的検討をおこなった。

NF- κ B は分子量約5万の p50 と約6.5万の p65 の2つのサブユニットからなり^{39,40)}, 細胞質では I κ B α とよばれるインヒビターと結合した不活性な状態で存在しているが⁴¹⁾, IL-1 や TNF- α などの炎症性サイトカイン, 種々の酸化ストレス, 放射線, 紫外線, などの多様な有害ストレスによって, I κ B α がリン酸化などの修飾を受けて不活性化され⁴²⁾⁻⁴⁴⁾, その結果 NF- κ B は核内に移行し, 種々の遺伝子の転写活性化に働くというモデルが考えられている。

本実験ではポジティブコントロールとして IL-1 刺激を行い, CAT アッセイ, EMSA, ウェスタンブロットで IL-6 遺伝子の転写活性化, NF- κ B の DNA 結合活性の増強, I κ B α のプロセッシングを認めた。これは Henkel ら⁴⁵⁾の実験結果と一致する。

低酸素化による刺激では, IL-6 遺伝子の転写活性化は経時的

に増強したが、 κB 配列の変異型をリポーター遺伝子として用いると転写活性化を認めなかった。この結果は、低酸素化により、 κB 配列を介して IL-6 遺伝子の発現が誘導されることを示している。また、低酸素暴露中、NF- κB の DNA 結合活性が増強し、I $\kappa B\alpha$ のプロセッシングが進行していたこと、さらに、コンペティションアッセイおよびスーパーシフトアッセイの結果から IL-6 遺伝子の κB 配列に結合した蛋白質が NF- κB であると同定されたことから、低酸素刺激により I $\kappa B\alpha$ がプロセッシングを受け、NF- κB が核内に移行することにより、IL-6 遺伝子が発現誘導されることが示唆された。

また、低酸素暴露後、再酸素化することにより、NF- κB の DNA 結合活性は消失し、低酸素中にプロセッシングされていた I $\kappa B\alpha$ は再合成され、未刺激の状態に復したことから、NF- κB は低酸素化により活性化され、再酸素化により元に復することが明らかとなった。

再灌流障害の一機序として、虚血中に、NF- κB が活性化されることにより TNF- α 、IFN- γ 、G-CSF、IL-6、IL-8 等のサイトカイン遺伝子や ICAM-1、VCAM-1、E-セレクトリン等の接着分子遺伝子の発現誘導が既に開始されており、血流再開後に、好中球を主体とした白血球の活性化、血管内皮細胞の活性化、サイトカインネットワークの増幅、接着分子の発現増強がおこり、組織障害が進行すると考えられた。しかし、その詳細な機序については今後の検討が必要である。

Schreck ら⁴⁹は、IL-1、TNF- α 、ホルボールエステル、過酸化水素などの種々のストレスによる NF- κB の活性化が NAC やブチル化ヒドロキシアリゾールなどの抗酸化剤によってブロックされることから、種々のストレスにより細胞内で活性化酸素が生成され、これが何らかの形で NF- κB の活性化に関与していることを報告している。本実験においても、抗酸化剤である NAC、トコフェロールを低酸素刺激前に投与することにより、低酸素化による NF- κB の活性化は抑制されたことから、低酸素刺激による NF- κB 活性化の経路に活性化酸素が関与している可能性が示唆された。また、チロシンキナーゼインヒビターであるゲニステイン⁴⁰を前投与することにより、NF- κB の活性化が抑制されたことから、低酸素刺激による NF- κB 活性化のシグナル伝達経路にチロシンキナーゼが関与している可能性が示唆された。これらの結果は、抗酸化剤やチロシンキナーゼインヒビターが虚血、再灌流障害の予防に有効である可能性を示唆している。

最近、MAP キナーゼファミリーが、NF- κB の活性化と共通する刺激、即ち、IL-1、TNF- α 等のサイトカイン、紫外線照射、リポ多糖類 (lipopolysaccharide, LPS) 等の刺激で活性化されることが報告されている⁴⁷⁻⁵¹。そこで、低酸素刺激による NF- κB 活性化における MAP キナーゼファミリーの関与について検討する目的で、MAP キナーゼファミリーに特異的なフォスファターゼである CL-100⁵² の発現遺伝子および MEK1⁵³ のドミナントネガティブの発現遺伝子をリポーター遺伝子 (IL-6 κB CAT) とコトランスフェクションし多量発現させた後、低酸素に暴露させ、IL-6 遺伝子の転写活性を CAT アッセイにて測定した。その結果、低酸素化による IL-6 遺伝子の転写活性化は、CL-100 の多量発現により抑制されたが、MEK1 ドミナントネガティブの多量発現によっては抑制されなかった。MEK は MAP キナーゼファミリーのうち細胞外シグナル規定キナーゼ (extracellular signal-regulated kinase, ERK) のチ

ロン、スレオニン残基をリン酸化し、これを活性化する MAPK キナーゼである⁵³ ことから、低酸素刺激による NF- κB 活性化のシグナル伝達経路に ERK 以外の MAP キナーゼファミリー、例えば、p38⁵⁴、JNK⁵⁰等が関与している可能性が示唆された。

結 論

虚血、再灌流障害における NF- κB の関与について検討する目的で、IL-6 遺伝子を指標にして、低酸素化、再酸素化による NF- κB の活性化について研究し、以下の知見を得た。

1. 低酸素化によって、転写因子 NF- κB 活性化による IL-6 遺伝子の転写活性は経時的に増強し、低酸素開始後 5 時間では、コントロールに比べ約 5 倍まで転写活性が増強した。
2. 転写因子 NF- κB の活性化は、再酸素化により、元に復した。
3. 低酸素化による NF- κB の活性化は、抗酸化剤である NAC、トコフェロール、チロシンキナーゼインヒビターであるゲニステインによって抑制された。
4. 低酸素化による NF- κB 活性化は、MAP キナーゼファミリーに特異的なフォスファターゼである CL100 の多量発現により抑制されたが、MEK1 ドミナントネガティブの多量発現によっては抑制されなかった。

以上より、虚血、再灌流障害の一機序として、低酸素化による転写因子 NF- κB の活性化の関与が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御教鞭を賜りました恩師宮崎逸夫教授に深甚なる謝意を表します。また、終始直接の御指導を戴きました金沢大学がん研究所病態生理部山本健一教授に深謝致します。また、大気コントロールチェンバーを貸与下さるとともに、御助言を戴きました金沢大学医学部生化学第二講座山本博教授に心から感謝致します。さらに、御指導と御協力を頂きました金沢大学外科学第二講座泉良平博士、清水康一博士ならびに講座の皆様、および金沢大学がん研究所病態生理部の教員の皆様に心から感謝致します。

なお、本論文の要旨の一部は、第30回日本移植学会総会 (1994年、広島)、第24回日本免疫学会総会 (1994年、京都) において発表した。

文 献

- 1) Corner, H. D.: Evidence that free radicals are involved in graft failure following orthotopic liver transplantation in the rat-an electron paramagnetic resonance spin tapping study. *Transplantation*, **54**, 199-204 (1992).
- 2) Ploeg, R. J.: Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation-a multivariate analysis. *Transplantation*, **55**, 807-813 (1993).
- 3) Hernandez, L. A., Grisham, M. B., Twohig, B., Arfors, K. E., Harlan, J. M. & Granger, D. N.: Role of neutrophils in ischemia/reperfusion-induced microvascular injury. *Am. J. Physiol.*, **253**, 699-703 (1987).
- 4) Go, L. O., Murry, C. E., Richard, V. J., Weischedel, G. R., Jennings, R. B. & Reimer, K. A.: Myocardial neutrophil accumulation during reperfusion after reversible or irreversible ischemic injury. *Am. J. Physiol.*, **255**, 1188-1198 (1988).
- 5) Jaeschke, H., Farhood, A. & Smith, C. W.: Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in

- vivo. *FASEB J.*, **4**, 3355-3359 (1990).
- 6) **Horgan, M. J., Wright, S. D. & Malik, A. B.:** Antibody against leukocyte integrin (CD18) prevents reperfusion-induced lung vascular injury. *Am. J. Physiol.*, **259**, 315-319 (1990).
- 7) **Kubes, P., Ibbotson, G., Russel, J., Wallace, J. L. & Granger, D. N.:** Role of platelet-activating factor in ischemia/reperfusion-induced leukocyte adherence. *Am. J. Physiol.*, **259**, 300-305 (1990).
- 8) **Bevilacqua, M. P., Pober, J. S., Mendrick, D. L., Cotran, R. S. & Gimbrone, M. A.:** Identification of an inducible endothelial leukocyte adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 9328-9242 (1987).
- 9) **Pober, J. S. & Cotran, R. S.:** What can be learned from the expression of endothelial adhesion molecules in tissues? *Lab. Invest.*, **64**, 301-305 (1991).
- 10) **Rothlein, R., Dustin, M. L., Martin, S. D. & Springer, T. A. A.:** human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J. Immunol.*, **137**, 1270-1275 (1986).
- 11) **山本健一:** 細胞内レドックス機構による NF- κ B の活性制御. *Medical Immunology*, **26**, 421-427 (1993).
- 12) **Van Huijsduijnen, R. H., Whelan, J. & Pescini, R.:** AT-cell enhancer cooperates with NF-kappa B to yield cytokine induction of E-selectin gene transcription in endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **267**, 22385-22391 (1992).
- 13) **Kaszubska, W., Hooft van Huijsduijnen, R. & Ghersa, P.:** Cyclic AMP-independent ATF family members interact with NF-kappa B and function in response to cytokines. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 7180-7190 (1993).
- 14) **Lewis, H., Kaszubska, W., Delamarter, J. F. & Whelan, J.:** Cooperativity between two NF- κ B complexes, mediated by High-Mobility-Group protein I (Y), is essential for cytokine-induced expression of the E-selectin promoter. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 5701-5709 (1994).
- 15) **Schindler, U. & Baichewal, V. R.:** Three NF- κ B binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 5820-5831 (1994).
- 16) **Lopata, M. A., Cleveland, D. W. & Sollner-Webb, B.:** High level transient expression of a chloramphenicol acetyl transferase gene by DEAE-dextran mediated DNA transfection coupled with a dimethyl sulfoxide or glycerol shock treatment. *Nucleic Acids Res.*, **12**, 5707-5717 (1984).
- 17) **Gorman, C. M., Moffat, L. F. & Howard, B. H.:** Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 1044-1051 (1982).
- 18) **Baeuerle, P. A. & Baltimore, D.:** Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF- κ B transcription factor. *Cell*, **53**, 211-217 (1988).
- 19) **Dignam, J. D., Lebovitz, R. M. & Roeder, R. G.:** Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.*, **11**, 1475-1489 (1983).
- 20) **Singh, H., Sen, R., Baltimore, D. & Sharp, P. A.:** A nuclear factor that binds to a conserved sequence motif in transcriptional control elements of immunoglobulin genes. *Nature*, **319**, 154-158 (1986).
- 21) **Shimizu, H., Mitomo, K., Watanabe, T., Okamoto, S. & Yamamoto, K.:** Involvement of a NF- κ B-like transcription factor in the activation of the interleukin-6 gene by inflammatory lymphokines. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 561-568 (1990).
- 22) **上久保康弘, 上出利光:** 虚血後再灌流障害と接着分子; 心筋の再灌流障害について. *BIO THERAPY*, **6**, 1485-1492 (1992).
- 23) **Crawford, M., Grover, F. & Kolb, W.:** Complement and neutrophil activation in the pathogenesis of ischemic myocardial injury. *Circulation*, **78**, 1449 (1988).
- 24) **Jaeschke, H., Farhood, A., Bautista, A., Spolarics, Z. & Spitzer, J.:** Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Am. J. Physiol.*, **264**, G801 (1993).
- 25) **Zimmerman, G., McIntyre, T., Mehra, M. & Prescott, S.:** Endothelial cell-associated platelet activating factor: a novel mechanism for signaling intercellular adhesion. *J. Cell. Biol.*, **110**, 529 (1990).
- 26) **Kubes, P., Ibbotson, G., Russel, J., Wallace, J. & Granger, N.:** Role of platelet activating factor in ischemia/reperfusion-induced leukocyte adherence. *Am. J. Physiol.*, **259**, G300 (1990).
- 27) **Baggiolini, M., Walz, A. & Kunkel, S. L.:** Neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J. Clin. Invest.*, **84**, 1045-1049 (1989).
- 28) **Lawrence, M. B. & Springer, T. A.:** Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: Distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell*, **65**, 859-873 (1991).
- 29) **von Andrian, U. H., Chambers, J. D. & McFvoy, L. M.:** Two-step model of leukocyte endothelial cell interaction in inflammation: Distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte β 2 integrins in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 7538-7542 (1992).
- 30) **Smith, C. W., Rothlein, R., Hughes, B. J., Mariscalco, M. M., Rudloff, H. E., Schmalstieg, F. C. & Anderson, D. C.:** Recognition of an endothelial determinant for CD18-dependent human neutrophil adherence and transendothelial migration. *J. Clin. Invest.*, **82**, 1746-1756 (1988).
- 31) **Shappell, S. B., Toman, C., Anderson, D. C., Taylor, A. A., Entman, M. L. & Smith, C. W.:** Mac-1 (CD11b/CD18) mediates adherence-dependent hydrogen peroxide production by human and canine neutrophils. *J. Immunol.*, **144**, 2702-2711 (1990).
- 32) **Royall, J. A., Berkow, R. L. & Beckman, J. S.:** Tumor necrosis factor and interleukin-1 α increase vascular endothelial permeability. *Am. J. Physiol.*, **257**, L399-L410

(1989).

- 33) Bocchietto, E., Guglielmetti, A. & Silvagno, F.: Proliferative and migratory responses of murine microvascular endothelial cells to granulocyte-colony stimulating factor. *J. Cell. Physiol.*, **155**, 89-95 (1993).
- 34) Nathan, C., Srimal, S. & Farber, C.: Cytokine-induced respiratory burst of human neutrophils: Dependent on extracellular matrix proteins and CD 11/CD 18 integrins. *J. Cell Biol.*, **109**, 1341-1349 (1989).
- 35) Baeuerle, P. A.: The inducible transcription activator NF- κ B: regulation by distinct protein subunits. *Biochim. Biophys. Acta*, **1072**, 63-80 (1991).
- 36) Liou, H. C. & Baltimore, D.: Regulation of the NF- κ B/rel transcription factor and I κ B inhibitor system. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **5**, 477-487 (1993).
- 37) Grilli, M., Chiu, J. J. S. & Lenardo, M. J.: NF- κ B and Rel: participants in a multifunctional transcriptional regulatory system. *Int. Rev. Cytol.*, **143**, 1-62 (1993).
- 38) Collins, T.: Endothelial nuclear factor- κ B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab. Invest.*, **68**, 499-508 (1993).
- 39) Baeuerle, P. A. & Baltimore, D.: A 65-kD subunit of active NF- κ B is required for inhibition of NF- κ B by I κ B. *Genes & Dev.*, **3**, 1689-1698 (1989).
- 40) Ghosh, S., Gifford, A. M., Riviers, L. R., Tempst, P., Nolan, G. P. & Baltimore, D.: Cloning of the p50 DNA binding subunit of NF- κ B: homology to rel and dorsal. *Cell*, **62**, 1019-1029 (1990).
- 41) Baeuerle, P. A. & Baltimore, D.: I κ B: a specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor. *Science*, **242**, 540-546 (1988).
- 42) Beg, A. A., Finco, T. S., Nantermet, P. V. & Baldwin, A. S. Jr.: Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I κ B α : a mechanism for NF- κ B activation. *Mol. Cell Biol.*, **13**, 3301-3310 (1993).
- 43) Henkel, T., Machleidt, T., Alkalay, I., Kronke, M., Ben-Neriah, Y. & Baeuerle, P. A.: Rapid proteolysis of I κ B- α is necessary in the activation of transcription factor NF- κ B. *Nature*, **365**, 182-185 (1993).
- 44) Sun, S. C., Ganchi, P. A., Ballard, D. W. & Greene, W. C.: NF- κ B controls expression of inhibitor I κ B α : evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science*, **259**, 1912-1915 (1993).
- 45) Schreck, R., Rieber, P. & Baeuerle, P. A.: Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.*, **10**, 2247-2258 (1991).
- 46) Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itou, N., Shibuya, M. & Fukami, Y.: Genistein, a specific inhibitor tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.*, **262**, 5592-5595 (1987).
- 47) Guesdon, F., Freshney, N., Waller, R. J., Rawlinson, L. & Saklatvala, J.: Interleukin 1 and tumour necrosis factor stimulate two novel protein kinases that phosphorylate the that heat shock protein hsp27 and B-casein. *J. Biol. Chem.*, **268**, 4236-4143 (1993).
- 48) Saklatvala, J., Rawlinson, L., Marshall, C. J. & Kracht, M.: Interleukin 1 and tumour necrosis factor activate the mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase in cultured cells. *FEBS Lett.*, **334**, 189-192 (1993).
- 49) Freshney, N. W., Rawlinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J. & Saklatvala, J.: Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell*, **78**, 1039-1049 (1994).
- 50) Minden, A., Lin, A., Smeal, T., Derijard, B., Cobb, M., Davis, R. & Karin, M.: c-Jun N-terminal phosphorylation correlates with activation of the JNK subgroup but not the ERK subgroup of Mitogen-Activated protein kinases. *Mol. Cell Biol.*, **14**, 6683-6688 (1994).
- 51) Han, J., Lee, J-D., Tobias, P. S. & Ulevitch, R. J.: Endotoxin induces rapid protein tyrosine phosphorylation in 70z/3 cells expressing CD14. *J. Biol. Chem.*, **268**, 25009-25014 (1993).
- 52) Alessi, D. R., Smythe, C. & Keyse, S. M.: The human CL100 gene encodes a Tyr/Thr-protein phosphatase which potently and specifically inactivates MAP kinase and suppresses its activation by oncogenic ras in *Xenopus* oocyte extracts. *Oncogene*, **8**, 2015-2020 (1993).
- 53) Crews, C. M. & Erikson, R. L.: Purification of a murine protein-tyrosine/threonine kinase that phosphorylates and activates the Erk-1 gene product: relationship to the fission yeast byr1 gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 8205-8209 (1992).

