Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Nitric Oxide Inhibits Neutrophil Adhesion to Cytokine-activated Cardiac Myocytes

大橋, 佳隆

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
1997-03-31

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲1648

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001648

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

氏名・（本籍）　大橋佳隆（おおはしよしたか）　（兵庫県）

博士の専攻分野の名称　博　士（医　学）

学位記番号　博い第1103号

学位授与の要件　学位規則第4条第1項該当

学位授与の日付　平成9年3月31日

学位論文題目　Nitrin Oxide Inhibits Neutrophil Adhesion to Cytokine-activated Cardiac Myocytes
（好中球のサイトカイン刺激心筋細胞への接着に対する一酸化窒素の抑制効果）

審査委員　主査　教授　横山光宏
教授　岡田昌義　教授　伊東　宏

論文内容の要旨

1．緒言

虚血再灌流傷害をはじめとする心血管病態に，炎症機転が重要な役割を果たすことが知られている。白血球は血管壁に接着した後，遊走し，標的細胞に傷害作用をおよぼす。白血球による心筋傷害には，遊走白血球の放出する各種メディエーターを介するものに加え，白血球が心筋細胞に直接接着することによって生じることが示されている。この過程には一連の接着分子のカスケードが介在しており，白血球と心筋細胞との接着においては，各種炎症性サイトカイン刺激により心筋細胞上に発現するintercellular adhesion molecule－1（ICAM－1）と，そのリガンドとして，活性化された白血球表面のβ2インテグリン（特にCD11b／CD18）がその主なものである。

一酸化窒素（NO）は内皮依存性血管弛緩因子の主体であるのみならず，白血球と内皮細胞接着の内因性抑制因子として作用することが，Kubesらによって示されている。NO前駆体であるL-arginineやNO供与体は，各種再灌流傷害モデルにおいて，内皮細胞機能障害と好中球の集積および心筋壊死を抑制する。しかし白血球と心筋細胞の接着自体におよぼすNOの影響は不明である。そこで本研究の目的は，白血球と心筋細胞の接着におけるNOの作用とそのメカニズムの解明を試みることである。

2．方法

コラゲナーゼをランゲンドルフ法にて灌流し単離した成体ラット心筋細胞と，ヒト末梢血よりPercoll密度勾配遠心法にて分離した好中球を用いて，好中球と心筋細胞との接着を以下のように測定した。あらかじめinterleukin－1β（IL－1β，4－25U／mL）にて4時間刺激した心筋細胞に，platelet activating factor（PAF,20,200ng／mL）にて15分間刺激した好中球を1：10の割合で加え共培養した。そして，15分後に50個の心筋細胞について，単一心筋細胞あたりに接着した好中球の個数を顕微鏡下に計数した。NOおよび接着分子の関与を明らかにするため，心筋細胞，好中球をNO合成酵素（NOS）阻害薬，NO供与体，抗接着分子抗体，蛋白合成阻害薬で処置して検討した。

好中球のβ2インテグリン（CD11a／CD18,CD11b／CD18）の発現量は，好中球をPAFにて刺激し，phycoerythrin（PE）標識抗CD11a抗体およびfluorescein（FITC）標識抗CD11b抗体を用いてフローサイトメトリーにて定量した。さらに，好中球をNO供与体または8 Bromo-cyclicGMP（8 Br-cGMP）で前処置し，その量的変化へのNOおよびcGMPの影響を検討した。

心筋細胞のICAM－1の発現量とそれに対するNOの影響は，新生児ラットよりトリプシン処理にて得た心筋細胞を培養し以下のように検討した。培養心筋細胞をNO供与体の存在下または非存在下にIL－1βにて刺激し，抗ラットICAM－1抗体にて処理後，FITC標識抗マウス免疫グロブリンを用いた間接蛍光抗体法による免疫細胞化学的検討およびペルオキシダーゼオルトフェニレンジアミン発色を用いたELISA法による定量を行った。

3．結果

好中球－心筋細胞接着とNOの効果

好中球と心筋細胞との接着は，好中球をPAF200ng／mLにて，心筋細胞をIL－1β10U／mLにて刺激時に非刺激時の2.5（2.47±0.21，P＜0.05）倍に増加し，この最大接着は蛋白合成阻害薬cycloheximide，抗ICAM－1抗体20μg／mLの前処置にて抑制された。心筋細胞をNOS阻害薬であるL-N-monomethyl arginine（L-NMMA）,L-nitroarginine methyl ester（L-NAME）1 mmol／Lまたは，NO供与体であるsodium nitroprusside（SNP）,S-nitroso-N-acetylpenicillamine（SNAP）10,100μmol／Lの存在下にIL－1βで刺激しても，これらの非存在下での接着に比べその程度に有意な変化はなかった。しかし，好中球を15分間SNPまたはSNAP（5，10μmol／L）にて前処置した後にPAF刺激を行った場合には，心筋細胞との接着は未処置に比べ濃度依存的に抑制された。

接着分子発現に対するNOの効果

好中球表面のCD11b／CD18（Mac－1）の発現量は，PAF（20,200ng／mL）37°C 15分間の刺激にて濃度依存的に増加した。この量的変化はSNAP 10,100μmol／L，8 Br-cGMP0.1，1 mmol／Lいずれの前処置にても抑制されなかった。一方，CD11a／CD18（LFA－1）の発現量はPAFの刺激によって変化しなかった。心筋細胞表面のICAM－1発現量の増加はIL－1β（10,100U／mL）刺激4時間後より認められ，6時間でピークとなり，濃度依存的であった。この発現量増加はcycloheximide 20μg／mLの前処置にて消失したが，SNAP 10,100μmol／Lの投与によって影響されなかった。

4．考案

以上の成績より，心筋細胞と白血球の接着は各細胞をそれぞれIL－1βとPAFで刺激したときに促進されるが，NOは心筋細胞のICAM－1発現と好中球表面のCD11b／CD18の量的変化をともなわずに，主として好中球に作用して細胞接着を抑制することが明らかとなった。

心筋細胞は構成型および誘導型NOSを有し，内因性にNOを産生することが示されている。本研究では心筋細胞のNOS阻害薬での前処置が接着に影響しなかったことから，心筋細胞由来の内因性NOの接着抑制効果は認められなかったが，心筋細胞の刺激時間が限られている点，異種動物由来の細胞間の接着を扱っている点から，内因性NOの作用を過小評価している可能性がある。実際in vivoの心臓では，心筋，好中球に加え，血管平滑筋，内皮細胞，マクロファージがNOSを有し，これらの細胞からのNOがparacrine的に作用することが予想される。Bathらは，非活性化単球と内皮細胞との接着においてsuperoxide dismutase存在下でNOが接着抑制効果を示し，さらに活性化単球由来の

superoxideはNOを不活化することを報告している。このことは，本研究でNO供与体が好中球の活性化前に処置したときのみ抑制作用を示したことや，比較的高濃度のNO供与体が接着抑制に必要であったことを説明しうる成績である。

ICAM－1と結合する際には，好中球の活性化によるCD11b／CD18の量的，質的変化が必要である。膜表面でのβ2インテグリンの発現量増加（量的upregulation）のメカニズムは明らかにされつつあるが，この変化は必ずしも接着促進に必要かつ十分とは言えないとの指摘もある。質的変化としては，インテグリン分子の形状変化と新たなepitopeの形成などの機能的変化が考えられているが，本研究の結果は，NOはむしろこの好中球の活性化にともなうCD11b／CD18の質的変化（質的upregulation）を抑制することを示唆している。

インテグリン機能の抑制に働く機序として，cyclic GMP（cGMP）に加え，交感神経β刺激，プロスタグランディンなどcyclic AMP（cAMP）増加を介するものが種々報告されている。NOはcGMP上昇とそれによるphosphodiesterase抑制を介し，cAMPをも増加させるとの報告があり，cAMPの増加を介するインテグリンの質的upregulationの抑制がNOによる接着抑制の機序として関与していることも考えられる。また，NOはインテグリンの機能調節に重要な働きをすると考えられるsuperoxideの産生，チロシンリン酸化，さらに細胞骨格の制御にも関わっているとされ，これらの経路の関与も考えられる。従って，NOの作用点に関しては今後さらなる研究が必要である。

5．まとめ

NOは，白血球と血管内皮細胞との接着のみならず，白血球と心筋細胞との接着において，好中球のCD11b／CD18の質的upregulationの制御を介してその抑制に働く。このことは，炎症機転が重要な働きをはたす虚血再灌流傷害において，硝酸剤およびNO供与体が心保護作用を示す機序として，NOの好中球と心筋細胞の接着抑制効果が深く関与していることを示唆している。

論文審査の結果の要旨

虚血再灌流傷害をはじめとする心血管病態に，炎症機転が重要な役割を果たすことが知られている。白血球は血管壁に接着した後，遊走し，標的細胞に傷害作用をおよぼす。白血球による心筋傷害には，遊走白血球の放出する各種メディエーターを介するものに加え，白血球が心筋細胞に直接接着することによって生じることが示されている。この過程には一連の接着分子のカスケードが介在しており，白血球と心筋細胞との接着においては，各種炎症性サイトカイン刺激により心筋細胞上に発現するintercellular adhesion molecule（ICAM－1）と，そのリガンドとして，活性化された白血球表面のβ2インテグリン（特にCD11b／CD18）がその主なものである。しかし白血球と心筋細胞の接着自体におよぼすNOの影響は不明である。そこで本研究の目的は，白血球と心筋細胞の接着におけるNOの作用とそのメカニズムの解明を試みることである。

コラゲナーゼをランゲンドルフ法にて灌流し単離した成体ラット心筋細胞と，ヒト末梢血よりPercoll密度勾配遠心法にて分離した好中球を用いて，好中球と心筋細胞との接着を以下のように測定した。あらかじめinterleukin－1β（IL－1β，4－25U／mL）にて4時間刺激した心筋細胞に，platelet activating factor（PAF,20,200ng／mL）にて15分間刺激した好中球を1：10の割合で加え共培養した。そして，15分後に50個の心筋細胞について，単一心筋細胞あたりに接着した好中球の個数を顕微鏡下に計数した。好中球のβ2インテグリン（CD11a／CD18,CD11b／CD18）の発現量

は，好中球をPAFにて刺激し，phycoerythrin（PE）標識抗CD11a抗体およびfluorescein（FITC）標識抗CD11b抗体を用いてフローサイトメトリーにて定量した。心筋細胞ICAM－１の発現量は新生児ラットよりトリプシン処理にて得た心筋ｓ細胞を培養し以下のように検討した。心筋細胞をIL－１βにて刺激し，抗ラットICAM－１抗体にて処理後，FITC標識抗マウス免疫グロブリンを用いた間接蛍光抗体法による免疫細胞化学的検討およびペルオキシダーゼオルトフェニレンジアミン発色を用いたELISA法による定量を行った。

１．好中球と心筋細胞とNOの効果

好中球と心筋細胞との接着は，好中球をPAF200ng／mLにて，心筋細胞をIL－１β10U／mLにて刺激時に非刺激時の2.5倍に増加し，この最大接着は蛋白合成阻害薬cycloheximide，抗ICAM－１抗体の前処置にて抑制された。心筋細胞をNOS阻害薬であるL-N-monomethyl arginine（Ｌ＝NMMA）,L-nitroarginine methyl ester（Ｌ＝NAME）１mmol／Ｌまたは，NO供与体であるsodium nitroprusside（SNP）,S-nitroso-N-acetylpenicillamine（SNAP）の存在下にIL－１βで刺激しても，これらの非存在下での接着に比べその程度に有意な変化はなかった。しかし，好中球を15分間SNPまたはSNAPにて前処置した後にPAF刺激を行った場合には，心筋細胞との接着は未処置に比べ濃度依存的に抑制された。

２．接着分子発現に対するNOの効果

好中球表面のCD11b／CD18（Mac－１）の発現量は，PAF（20,200ng／mL）37°Ｃ，15分間の刺激にて濃度依存的に増加した。この量的変化はSNAP，８Br－cGMPいずれの前処置にても抑制されなかった。一方，CD11a／CD18（LFA－１）の発現量はPAFの刺激によって変化しなかった。心筋細胞表面のICAM－１発現量の増加はIL－１β（10,100U／mL）刺激４時間後より認められ，６時間でピークとなり，濃度依存的であった。この発現量増加はcycloheximideの前処置にて消失したが，SNAPの投与によって影響されなかった。

以上の成績により，心筋細胞と白血球の接着は各細胞をそれぞれIL－１βとPAFで刺激したときに促進されるが，NOは心筋細胞のICAM－１発現と好中球表面のCD11b／CD18の量的変化をともなわずに，主として好中球に作用して細胞接着を抑制することが明らかとなった。

ICAM－１と結合する際には，好中球の活性化によるCD11b／CD18の量的，質的変化が必要である。本研究の結果は，NOは好中球の活性化にともなうCD11b／CD18の質的変化（質的upregulation）を抑制することを示唆している。

NOがインテグリン機能の抑制に働く機序として，cyclic GMP（cGMP）やAMPの増加に加え，superoxideの産生，チロシンリン酸化，さらに細胞骨格の制御などが考えられる。従って，NOの作用点に関しては今後さらなる研究が必要である。

本研究はNOは白血球と心筋細胞との接着におけるNOの役割を研究したものであるが，従来ほとんど行われなかったNOが好中球のCD11b／CD18の質的upregulationの制御を介してその抑制に働くことを明らかにし，重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって，本研究は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。