

[総説]

## 好中球エラスターゼと各種病態

山口 類<sup>1, 2)</sup>      山口 康 雄<sup>1)</sup>

Neutrophil elastase-mediated diseases

Rui YAMAGUCHI, Yasuo YAMAGUCHI

1) 熊本保健科学大学保健科学研究科

2) 熊本大学大学院医学教育学部公衆衛生学分野<sup>2)</sup>

### 要旨

活性化好中球から, elastase, proteinase 3, Cathepsin G などのプロテアーゼが遊離する。感染により活性化された好中球が自らの DNA や granule proteins を含む網目状の構造物を放出する現象 (neutrophil extracellular traps: NETs) が報告された。NETs は感染症に罹患する患者に臓器不全を引き起こす要因となる。活性化好中球から遊離される protease はプロテアーゼ活性化受容体 (protease-activated receptor: PARs) を介して細胞内へシグナルを伝達し, 炎症反応を引き起こす。7 回膜 貫通構造を有する G タンパク質 共役型受容体である PARs には, PAR-1 から PAR-4 の 4 種類が存在する。好中球エラスターゼは PAR-2 を介して細胞内にシグナルを伝達する。急性炎症では全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome: SIRS) が発症し, 活性化好中球から遊離される好中球エラスターゼにより呼吸不全を併発する。急性炎症の進行と血中の好中球エラスターゼ濃度は密接に関連している。また, 臓器阻血再灌流障害の病因の一つに好中球が関与している。また, 肥満は健康障害を引き起こす世界的な問題であるが, 肥満者では血中の好中球エラスターゼ濃度が上昇している。臓器の線維化には遊走・浸潤した好中球が重要な役割を演じている。このように, 好中球は急性炎症, 阻血再灌流障害, 脂肪組織の慢性炎症, 臓器の線維化などに重要な役割を演じている。本稿では, 各種病態における好中球エラスターゼによる免疫修飾反応について概説する。

キーワード：好中球エラスターゼ, プロテアーゼ活性化受容体, neutrophil extracellular traps

### I. 緒言

好中球はマクロファージと同様に食細胞として病原体に対する初期の生体防御反応に関与し自然免疫誘導に重要な役割を演じている。好中球は細菌の侵入に対して, 遊走, 貪食, 殺菌, そし内包する顆粒中の消化酵素で消化する。また, 好中球は活性化に伴い核内のクロマチンを細胞外に放出することが発見された<sup>1)</sup>。このクロマチン網は neutrophil extracellular traps (NETs) と呼ばれ, 細菌を補足し, また捉えられた細菌は好中球やマクロファージ

に貪食されやすくなる。この過程で好中球は死滅するが, 壊死 (necrosis) やアポトーシス (apoptosis) とは異なる細胞死のため, NETosis と名付けられた。また, 活性化好中球から, elastase, proteinase-3, cathepsin G などのタンパク分解酵素 (プロテアーゼ) やリソソーム・タンパクの一種であるペルオキシダーゼなどが遊離される。ペプチド結合を切断する酵素をプロテアーゼ (protease) と総称するが, プロテアーゼには切断する配列をあまり選ばない基質特異性が低いものや, 特定のタンパク・ペプチドの特定の部位だけを特異的に切断する高度な選択性

を持つ基質特異性が高いものがある。プロテアーゼはいずれも特有の作用最適 pH を有しており、酸性プロテアーゼ、中性プロテアーゼ、アルカリ性プロテアーゼに分類される。活性中心にセリン残基を持つタンパク分解酵素である中性セリンプロテアーゼの一種であるトロンビンに関する研究が飛躍的に進歩した。その結果、血液の凝固に関わる酵素の一種であるトロンビンに対する細胞応答から受容体の存在が想定され、1991年にトロンビン受容体の cDNA クローニングが報告された<sup>2, 3)</sup>。更に、このプロテアーゼ活性化受容体 (protease-activated receptor: PAR) は G タンパク共役型受容体スーパーファミリーに属することが明らかとなった<sup>4)</sup>。その後、PAR-4 の cDNA クローニングが報告<sup>5)</sup>され、合計 4 種類の PAR-1, PAR-2, PAR-3, PAR-4 が存在することが判明した。また、PARs の活性化に伴い、細胞内にシグナルが伝達される<sup>6)</sup>。従って、好中球の活性化や NETs に伴い、好中球外へ遊離したタンパク分解酵素により誘導される種々の病態形成機序が着目される。本稿では、好中球から放出される強力なタンパク分解酵素であるエラスターゼによる種々の生理活性作用について述べる。

## Ⅱ. 重症急性膵炎

急性膵炎が重症化し「重症急性膵炎」を併発すると死亡率が極めて高くなる。つまり、急性膵炎に伴う呼吸不全で死亡する症例が多い。そのため、重症急性膵炎は「難病」に指定された1991年当時は、重症膵炎の死亡率が30%と極めて高く、その救命率を向上させることが急務であった。しかし、その発生機序については不明な点が多かった。全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome: SIRS) の概念が提唱<sup>7)</sup>され、重症急性膵炎における早期合併症の本態は、SIRS で産生される様々なメディエーターによって惹起される重要臓器の機能不全 (多臓器不全) であると考えられた。また、入院後の血中マーカーの変動に関する研究では、急性膵炎の重症化の指標として、血中の好中球エラスターゼと IL-6 濃度が重要である (図 1) ことが判明した<sup>8)</sup>。また、急性膵炎の重症化に伴う呼吸不全の発生機序解明を目的に図 2 に示すようなラット敗血症合併膵炎モデルを作製した。このラット敗血症合併セルレイン膵炎モデルでは、セルレイ

ンによる軽症の浮腫性膵炎に lipopolysaccharide (LPS) を腹腔内投与すると、肝臓や膵臓には組織変化は認められなかったが、肺では顕著な出血を併発することが判明した。しかし、この肺出血は好中

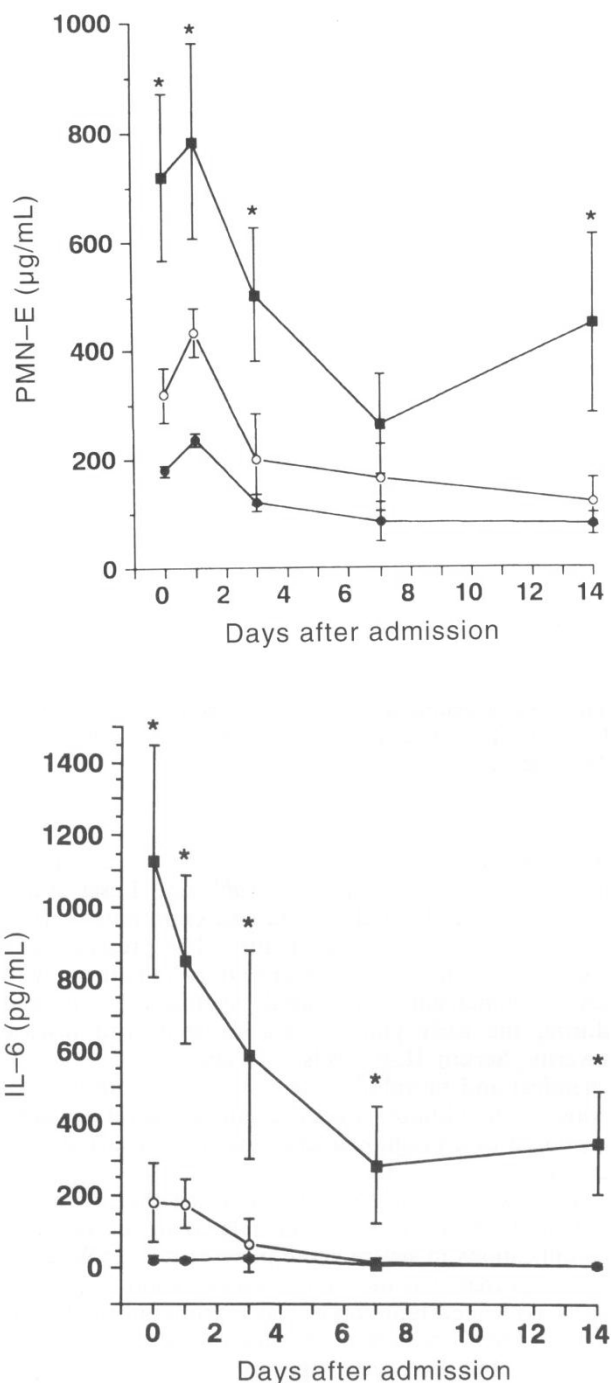


図 1. 急性膵炎と血中好中球エラスターゼ及び IL-6 濃度の推移

■ : severe acute pancreatitis  
○ : moderate acute pancreatitis  
● : mild acute pancreatitis  
Data = mean ± S.E. \*P < 0.01

球エラスターゼ阻害剤（ONO-5046）を投与すると、その予防が可能である（図3）ことを我々は報告した<sup>9)</sup>。ONO-5046は現在、好中球エラスターゼ阻害

剤：医療用薬品「エラスボール」として、全身性炎症反応症候群に伴う急性肺障害治療薬として広く使用されている。

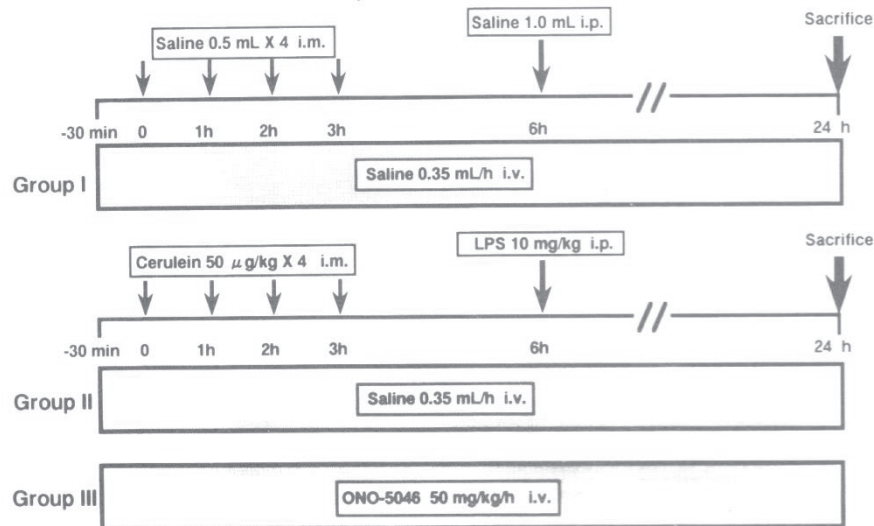


図2. ラット敗血症合併セルレイン膵炎モデル Cerulein：浮腫性膵炎（軽症）の誘導  
Lipopolysaccharide: LPS 腹腔内投与

#### 好中球エラスターゼ阻害剤：ONO-5046

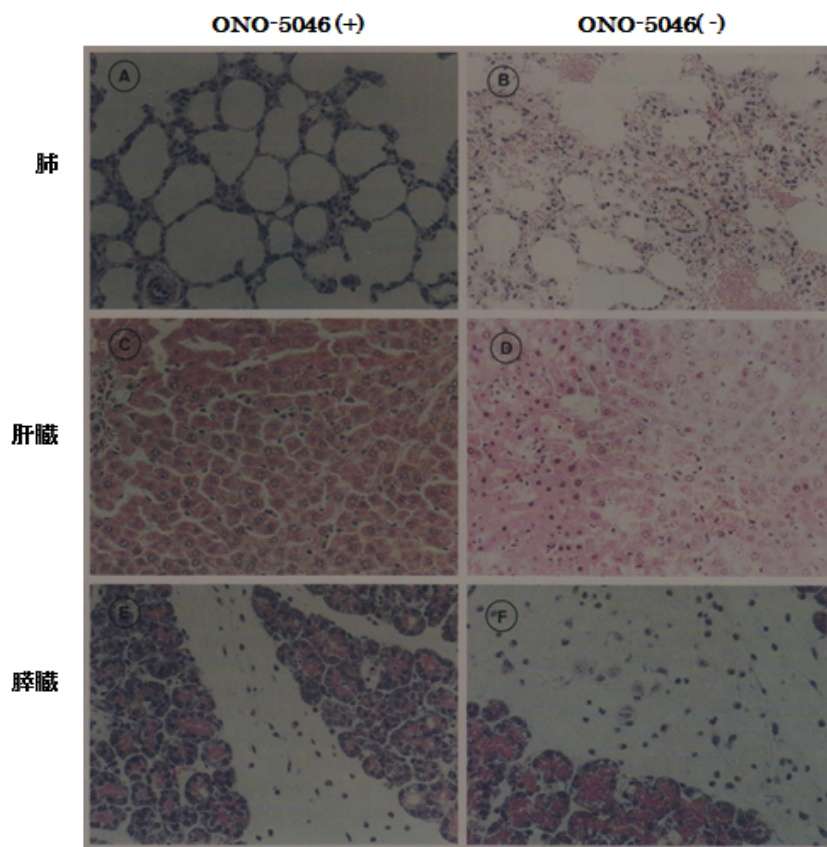


図3. 敗血症合併セルレイン膵炎における肺障害と好中球エラスターゼ阻害剤（ONO-5046）の効果  
敗血症合併膵炎＝セルレイン膵炎＋腹腔内 LPS (10 mg/kg) 投与 LPS: lipopolysaccharide

### Ⅲ. 肝阻血再灌流障害

虚血状態にある臓器に血液再灌流が起ると、その臓器の組織内微小循環で種々の毒性物質の産生が惹起される現象を虚血（阻血）再灌流障害という。門脈を30分間遮断したラット肝阻血再灌流障害モデルでは、northern blotting により interleukin-8 (IL-8) の superfamily である cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) mRNA の発現が増強した（図4）。ラットではヒトの IL-8 に相当するサイトカインは発見されていないため、研究ではラットの好中球遊走因子である CINC の産生について検討を

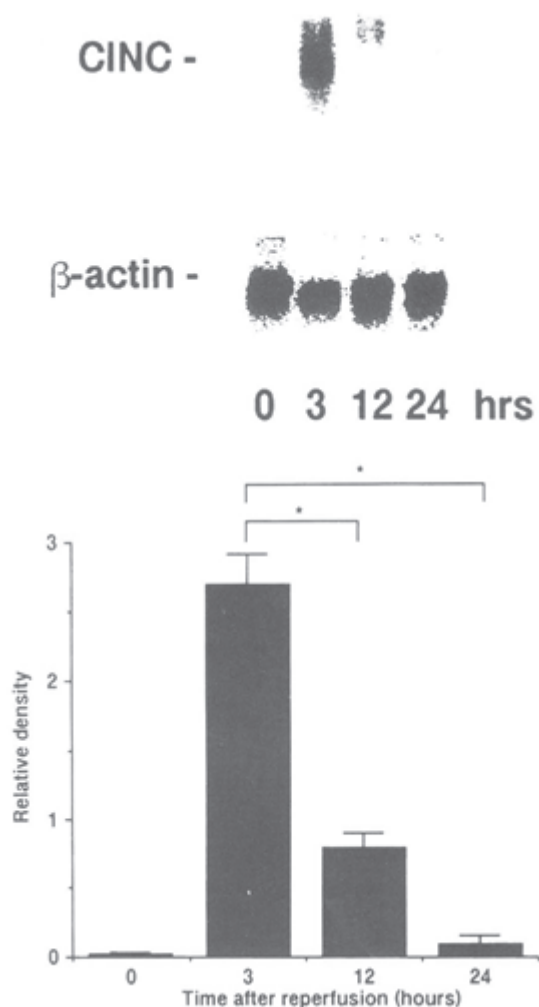


図4. ラット肝阻血再灌流障害における肝組織中の CINC mRNA (northern blotting) の発現動態  
CINC: cytokine-induced neutrophil chemoattractant  
Data=mean  $\pm$  S.E. \*P<0.01

行った。肝阻血再灌流後、肝組織中の CINC mRNA の発現が上昇することが判明した（図4）。次に、Kupffer 細胞の不活性化剤であるガドリニウムクロライド ( $\text{GdCl}_3$ ) を投与すると、血中 CINC 濃度の著明な低下が認められた（図5）。その結果、ラット肝阻血再灌流障害時には、Kupffer 細胞から CINC が分泌増強されることが判明した<sup>10)</sup>。

以上より、阻血再灌流障害肝では Kupffer 細胞からの CINC の分泌により好中球の遊走・浸潤が起こることが推察された。そこで、ラット肝阻血再灌流障害モデルに好中球エラスターゼ阻害剤 (ONO-5046) を投与すると CINC の産生分泌が有意に抑制されることが判明した<sup>11)</sup>。また、阻血再灌流障害肝に遊走・浸潤する活性化好中球から分泌される好中球エラスターゼにより血管内皮細胞に細胞間接着分子-1 (intercellular adhesion molecule-1: ICAM-1) の発現が増強することを報告した<sup>12)</sup>。また、rat endothelial cell line (WK-5 cells) を用いた実験では、好中球エラスターゼにより ICAM-1 mRNA の

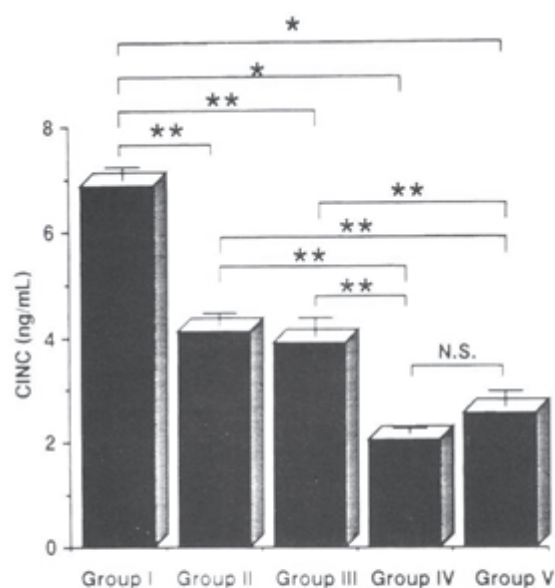


図5. ラット肝阻血再灌流障害時の血中 CINC 濃度とガドリニウムクロライド ( $\text{GdCl}_3$ ) 投与による効果

Group I: untreated

Group II: pretreated with heparin

Group III: pretreated with  $\text{GdCl}_3$

Group IV: pretreated with heparin/ $\text{GdCl}_3$

Data=mean  $\pm$  S.E. \*P<0.01 \*\*P<0.05

N.S.: not significant



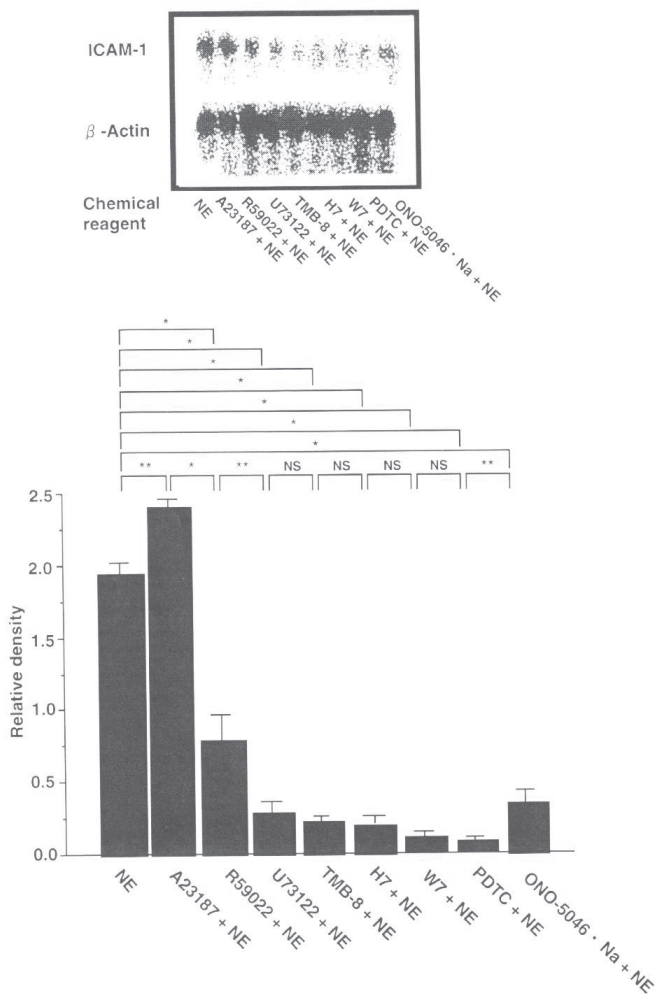


図6. ラット血管内皮細胞株 (WK-5 cells) の好中球エラスターゼ刺激による ICAM-1 mRNA の発現と各種細胞内シグナル伝達阻害剤の効果  
DA=mean ± SE. \*P<0.01 \*\*P<0.05  
N.S.: not significant

発現が増強すること、また、ICAM-1 mRNA の発現は diacylglycerol kinase/protein kinase C/phospholipase C/Ca<sup>2+</sup>calmodulin/nuclear transcription factor kappa B を介して起こる (図6) が判明した<sup>13)</sup>。このように、肝虚血再灌流

表1. 使用薬剤とその作用機序

Chemicals	Functions
A23187	Calcium ionophore
R59022	Diacylglycerol kinase inhibitor
U73122	Phospholipase C inhibitor
TMB-8	Intracellular Ca <sup>2+</sup> antagonist
W7	Calmodulin antagonist
H7	Protein kinase C inhibitor
PDTC	NF-kB inhibitor
ONO-5046	Neutrophil elastase inhibitor

障害の発症には好中球エラスターゼが深くに関与していることが示唆された。また、表1に実験で使った阻害剤とその作用について示す。好中球エラスターゼ刺激による WK-5 cells の ICAM-1 mRNA の発現と使用した細胞内シグナル伝達系阻害剤の効果より、図7に示すような、細胞内シグナル伝達経路が想定された。

#### IV. 播種性血管内血液凝固症候群

播種性血管内凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation : DIC) は、敗血症に伴い単球/マクロファージや血管内皮細胞の組織因子 (tissue factor: TF) の発現・活性化により引き起こされる。グラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分であるリポ多糖 (Lipopolysaccharide : LPS) により単球に TF が発現増強する<sup>14)</sup>。敗血症は、病原体により引き起こされる全身性炎症反応症候群 (SIRS) で、高サイトカイン血症状態を呈する。SIRS で分泌される IL-1β, tumor necrosis factor (TNF), IL-8 などのサイトカインにより好中球が活性化し、elastase, proteinase-3, cathepsin G などのタンパク分解酵素を遊離する。なかでも、好中球エラス

表2. 各種 PKC 阻害剤と PKC isoforms に対するそれぞれの阻害作用

Reagent	PKC isoform				
Ro-318425	PKC $\alpha$	PKC $\beta$ I	PKC $\beta$ II	PKC $\gamma$	
Go 6976	PKC $\alpha$	PKC $\beta$ I			
Go 6983	PKC $\alpha$	PKC $\beta$ I		PKC $\gamma$	PKC $\delta$
CGP41251	PKC $\alpha$	PKC $\beta$ I	PKC $\beta$ II	PKC $\gamma$	PKC $\delta$
PKC $\theta$ / $\delta$ inhibitor				PKC $\delta$	PKC $\theta$

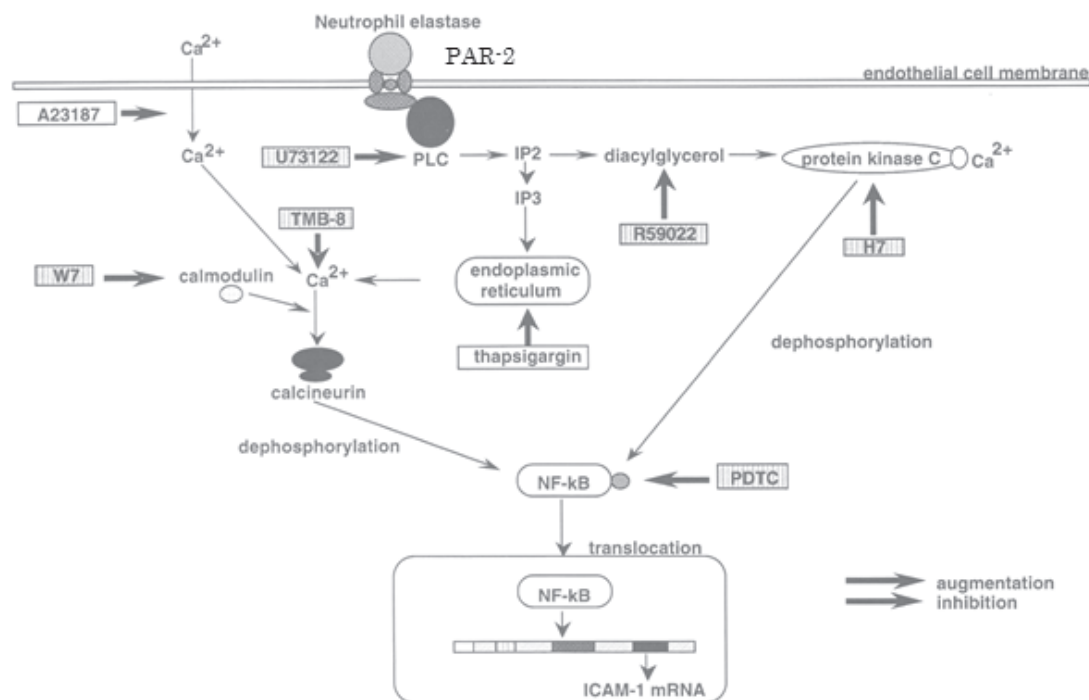


図7. 好中球エラスターゼ刺激における WK-5 cells の ICAM-1 mRNA 発現機序

Protease-activated receptor-2: PAR-2

ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1

ターゼはアンチトロンビン III のヘパリン結合部に作用して、アンチトロンビン III を不活化し、凝固亢進状態となる。また、好中球エラスターゼは、末梢血単球を刺激して、protein kinase C $\theta/\delta$  を介して TF の産生を増強 (図8) する<sup>15)</sup>。このように、好中球エラスターゼは DIC の発症にも深く関与していることが判明した。表2に使用した薬剤による PKC isoforms に対する阻害効果を示す。

## V. 肥満

好中球エラスターゼは、血液中では、protease inhibitor ( $\alpha_1$ -antitrypsin,  $\alpha_2$ -macroglobulin, inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor) と結合し不活化される。肥満者では、血中  $\alpha_1$ -antitrypsin 濃度が低下しており、好中球エラスターゼ活性が上昇し内臓脂肪組織における慢性炎症を惹起していることが報告されている<sup>16)</sup>。この慢性炎症反応は、内臓脂肪細胞から産生される chemokines による炎症性細胞の遊走によって引き起こされる。Body mass index (BMI) <30 kg/m<sup>2</sup> の被験者から得られた凍結内臓脂肪細胞を分化・誘導した内臓脂肪細胞では、inflammatory chemokines である monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), regulated on activation, normal T

cell expressed and secreted (RANTES), interleukin (IL)-8, neutrophil-activating peptide (ENA)-78 mRNA などの発現が認められた。一方、BMI>30 kg/m<sup>2</sup> の対象者から得られた凍結内臓脂肪細胞を分化・誘導した脂肪細胞では、MCP-1, RANTES, IL-8, ENA-78に加えて、homeostatic/constitutive chemokines である lymphotactin  $\beta$  や fraktalkine の mRNA の発現が認められた<sup>17)</sup>。BMI>30 kg/m<sup>2</sup> と BMI<30 kg/m<sup>2</sup> の対象者から得られた内臓脂肪細胞における chemokine profiles の相違を図9・10に示す。

MCP-1 は転写因子である Nuclear factor kappaB (NF- $\kappa$ B) を介して発現する<sup>18)</sup>。しかし、好中球エラスターゼ刺激により NF- $\kappa$ B repressing factor (NKRF) が誘導される<sup>19)</sup>。BMI>30 kg/m<sup>2</sup> の内臓脂肪細胞を好中球エラスターゼで刺激すると NF- $\kappa$ B repressing factor が発現・誘導<sup>17)</sup>され、MCP-1 及び RANTES mRNA の発現が軽減した。図11に好中球エラスターゼ刺激による NKRF を介する MCP-1 mRNA の発現抑制効果を示す。このように好中球エラスターゼは内臓脂肪細胞における chemokines の発現にも影響を及ぼし、脂肪組織の慢性炎症の発症・増悪に密接に関与している。

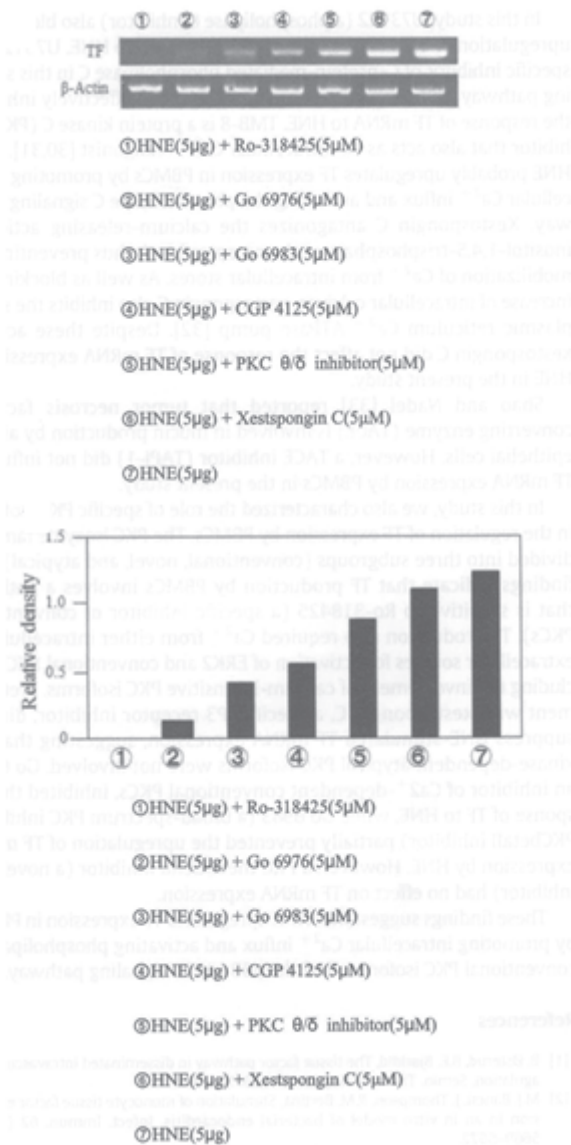


図8. 好中球エラスターゼ刺激による単球の tissue factor (TF) mRNA 発現と使用薬剤による protein kinase C (PKC) isoforms の阻害効果

## Ⅵ. 抗炎症性サイトカイン interleukin (IL) -13 の発現

単球は分化因子である granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) の刺激によりマクロファージへ分化する。SIRS では GM-CSF が遊離され単球 / マクロファージの分化が起こる<sup>20)</sup>。GM-CSF-dependent macrophages では細胞表面にプロテアーゼ活性化受容体 (protease-activated receptor 2 : PAR-2) の発現が増強 (図12) しており、PAR-2の agonist である好中球エラスターゼで

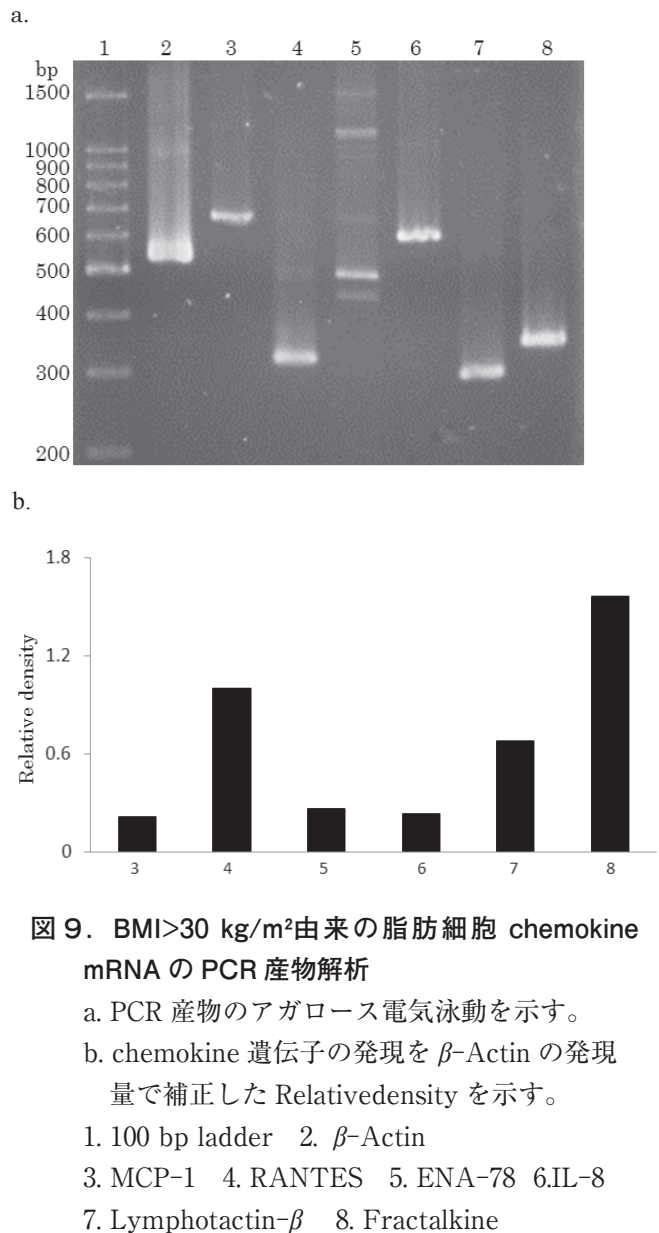


図9. BMI>30 kg/m<sup>2</sup>由来の脂肪細胞 chemokine mRNA の PCR 産物解析

- a. PCR 産物のアガロース電気泳動を示す。  
 b. chemokine 遺伝子の発現を β-Actin の発現量で補正した Relative density を示す。  
 1. 100 bp ladder 2. β-Actin  
 3. MCP-1 4. RANTES 5. ENA-78 6. IL-8  
 7. Lymphotactin-β 8. Fractalkine

刺激すると、IL-13が分泌亢進する (図13) ことが判明した<sup>21)</sup>。

macrophages は、pro-inflammatory (classically activated) M1 macrophages と anti-inflammatory (alternatively activated) M2 macrophages に大別され、GM-CSF-dependent macrophages は M1 macrophages に属するとされている。しかし、PAR-2の発現増強により好中球エラスターゼ刺激で anti-inflammatory cytokine である IL-13を分泌することより、好中球エラスターゼがマクロファージの2極化に間接的に関与していることが推察される。また、好中球エラスターゼ刺激による PAR-2を介した細胞内シグナル伝達系の解析を行った。

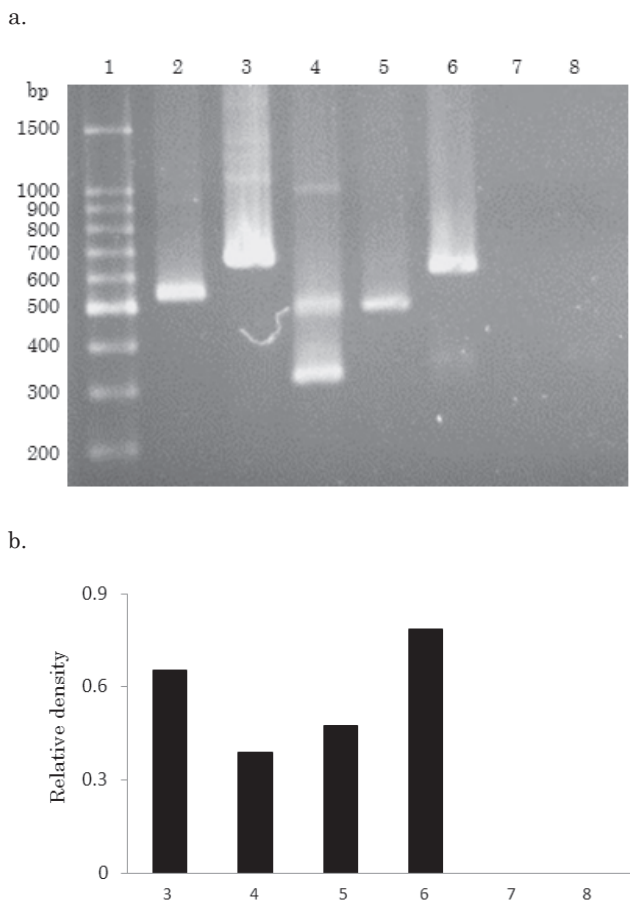


図10. BMI<30 kg/m<sup>2</sup>由来の脂肪細胞 chemokine mRNA の PCR 産物解析

- a. PCR 産物のアガロース電気泳動を示す。  
 b. chemokine 遺伝子の発現を  $\beta$ -Actin の発現量で補正した Relativedensity を示す。
1. 100 bp ladder 2.  $\beta$ -Actin  
 3. MCP-1 4. RANTES 5. ENA-78 6. IL-8  
 7. Lymphotactin- $\beta$  8. Fractalkin

しかし、PD98059, SB203580, BIRB796などの阻害剤を用いて、好中球エラスターゼ刺激による IL-13産生の細胞内シグナル伝達経路について検討した(図14)。表4に使用した薬剤とその作用点を示す。mitogen-activated protein kinase (MAPK) p38に関しては、p38  $\alpha$  /  $\beta$  及び p38  $\gamma$  /  $\delta$  の阻害剤であ

る SB203580及び BIRB796で、IL-13産生に対する細胞内シグナル伝達系の阻害効果は認められなかった。一方、extracellular signal-regulated kinase (ERK) には ERK1/2が存在しており、ERK1 inhibitor である PD98059では阻害効果が認められなかったため、ERK1或いは ERK2 inhibitor である U0126を使用した実験を実施した。U0126の half maximal (50%) inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) は、ERK1は70  $\mu$ M、一方、ERK2は60  $\mu$ M であると報告されている<sup>22)</sup>。そこで、U0126を用いた実験結果を図15に示す。U0126の投与で IL-13の産生が有意に抑制された。PD98059 (ERK1 inhibitor) の効果が認められなかったことより、好中球エラスターゼ刺激による IL-13の産生機序には ERK-2が深く関与していることが示唆された<sup>23)</sup>。以上のように、好中球エラスターゼ刺激により GM-CSF-dependent macrophages より IL-13が産生増強されることが判明した。IL-13は臓器の線維化と密接に関連していることが報告されている<sup>24)</sup>。臓器線維症(肝硬変・肺線維症・慢性膵炎等)の責任細胞として活性化星細胞が知られている。慢性膵炎に伴う線維化では、膵外分泌細胞のみならず、内分泌細胞の障害を引き起こし糖尿病の発生につながる。また、膵線維化に伴い慢性疼痛の発症や膵管上皮の変化に起因する膵癌の合併が問題となる。膵星細胞が活性化すると alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)を発現する<sup>25)</sup>。そこで、我々は、凍結ヒト膵星細胞を用いて、IL-13刺激による  $\alpha$ -SMA の発現について検討した。その結果、図16に示すように、IL-13の刺激により、ヒト膵星細胞に  $\alpha$ -SMA の発現増強が認められ、星細胞の活性化が確認された。このように、好中球エラスターゼは、臓器線維化にも関与していることが示唆された。

表3. 細胞内シグナル伝達系阻害剤 PD98059、SB203580、IRB796の作用機序

Chemicals	Functions
PD98059	Extracellular signal-regulated kinase-1 inhibitor
SB203580	Mitogen-activated protein kinase p38 $\alpha$ / $\beta$ inhibitor
BIRB796	Mitogen-activated protein kinase p38 $\alpha$ / $\beta$ or $\gamma$ / $\delta$ inhibitor



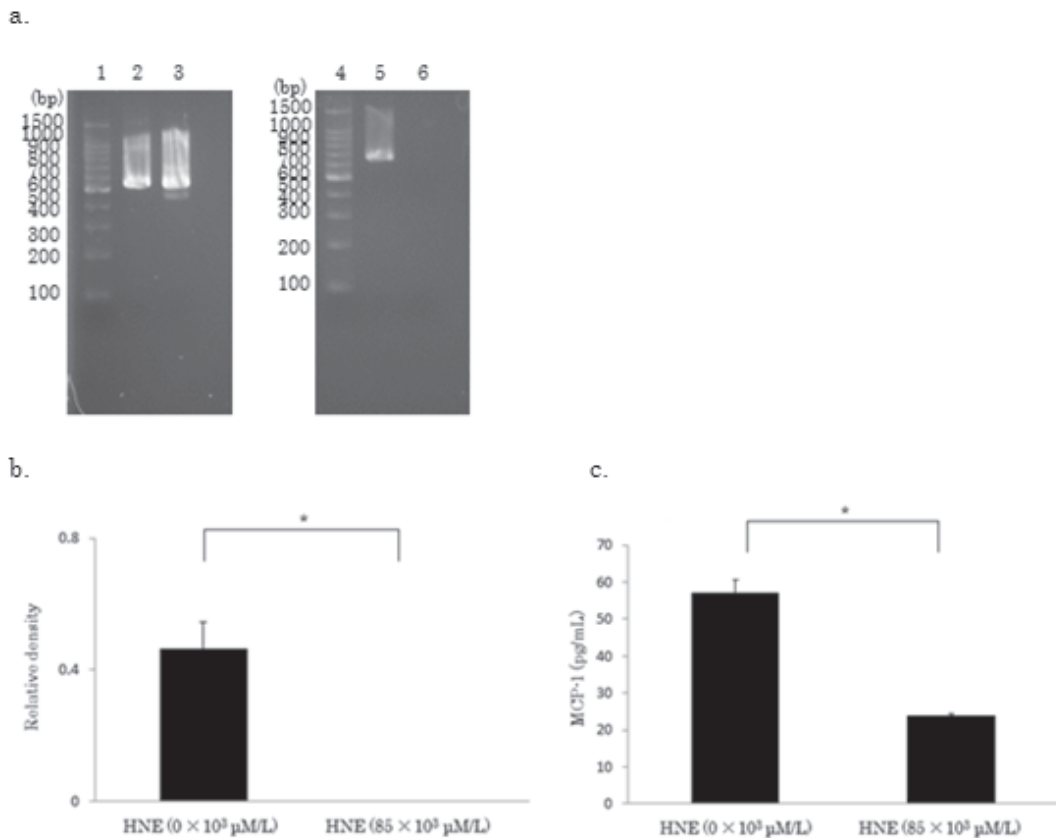


図11. 好中球エラスターゼ刺激による内臓脂肪細胞における MCP-1発現の抑制効果

- a. MCP-1 mRNA   b. Relative density   c. MCP-1 concentration in whole-cell lysates  
 1. Markers   2. HNE ( $0 \times 10^3 \mu\text{M/L}$ ):  $\beta$ -actin   3. HNE ( $85 \times 10^3 \mu\text{M/L}$ ):  $\beta$ -actin  
 4. Markers   5. HNE ( $0 \times 10^3 \mu\text{M/L}$ ): MCP-1 mRNA   6. HNE ( $85 \times 10^3 \mu\text{M/L}$ ): MCP-1 mRNA  
 Human neutrophil elastase : HNE

## VII. 結語

好中球エラスターゼは、プロテアーゼ活性化受容体 (protease-activated receptors) を細胞内にシグナル伝達系し各種病態に深く関与していることが判明した。

## 文献

- 1) Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al: Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303 : 1532-1535, 2004.
- 2) Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, et al: Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, 64 : 1057-1068, 1991.
- 3) Rasmussen UB, Vouret-Craviari V, Jallat S, et al: cDNA cloning and expression of a hamster alpha-thrombin receptor coupled to  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization. *FEBS Lett*, 288 : 123-128, 1991.
- 4) Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, et al: Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev*, 53: 245-282, 2001.
- 5) Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, et al: Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 6642-6646, 1998.
- 6) Soh UJ, Does MR, Chen B, et al: Signal transduction by protease-activated receptors. *Br J Pharmacol*, 160: 191-203, 2010.

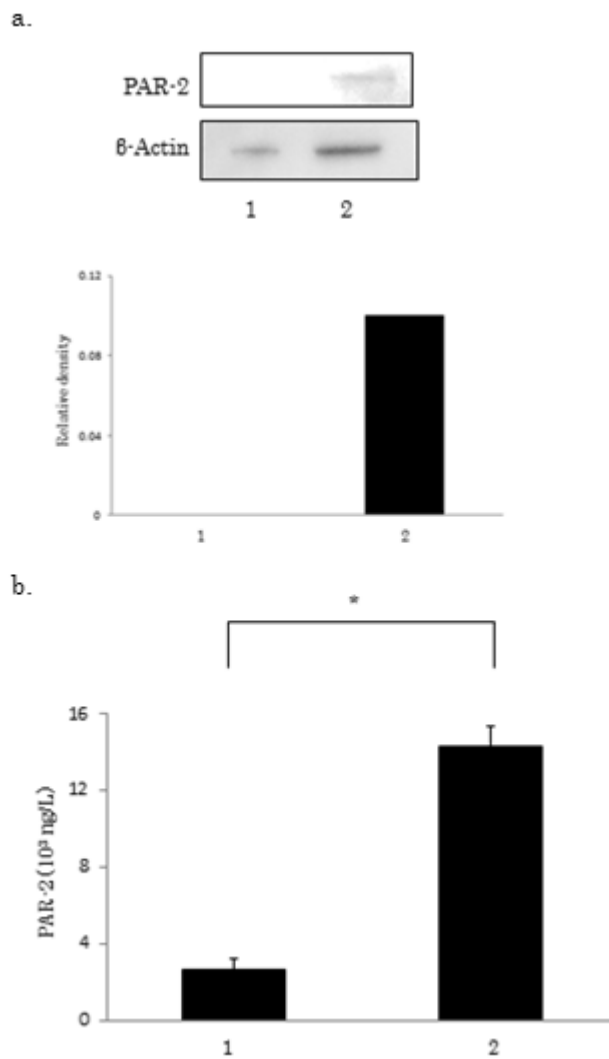


図12. GM-CSF 刺激によるマクロファージの protease-activated receptor 2 (PAR-2) の発現

a. Western blotting b. PAR-2 concentration in whole-cell lysates  
 1. Monocytes (0 day) 2. GM-CSF-dependent macrophages (9 day)  
 Data= mean  $\pm$  S.E. \*P<0.01

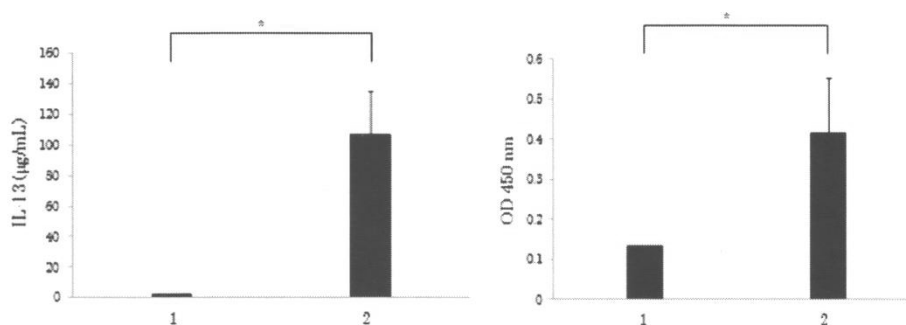


図13. 好中球エラスターゼ刺激による IL-13産生

1. GM-CSF-dependent macrophages (9 days) + HNE ( $0 \times 10^3 \mu$  g/L)  
 2. GM-CSF-dependent macrophages (9 days) + HNE ( $5 \times 10^3 \mu$  g /L)  
 IL-13: interleukin-13 OD: optical density \*P<0.01

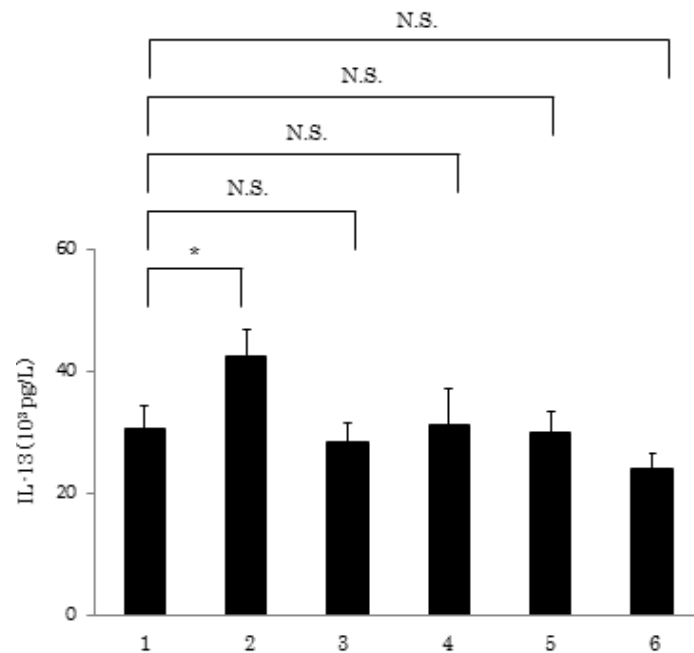


図14. 好中球エラスターゼ刺激による IL-13産生：PD98059, SB203580, BIRB796の細胞内シグナル伝達系の阻害効果

1. Macrophages (day 9) + HNE (50 μM)
2. Macrophages (day 9) + PD98059 (10 μM) + HNE (50 μM)
3. Macrophages (day 9) + SB203580 (10 μM) + HNE (50 μM)
4. Macrophages (day 9) + BIRB796 (5 μM) + HNE (50 μM)
5. Macrophages (day 9) + BIRB796 (10 μM) + HNE (50 μM)
6. Macrophages (day 9) + BIRB796 (20 μM) + HNE (50 μM)

Data = mean ± SE. \*P < 0.01 N.S.: not significant

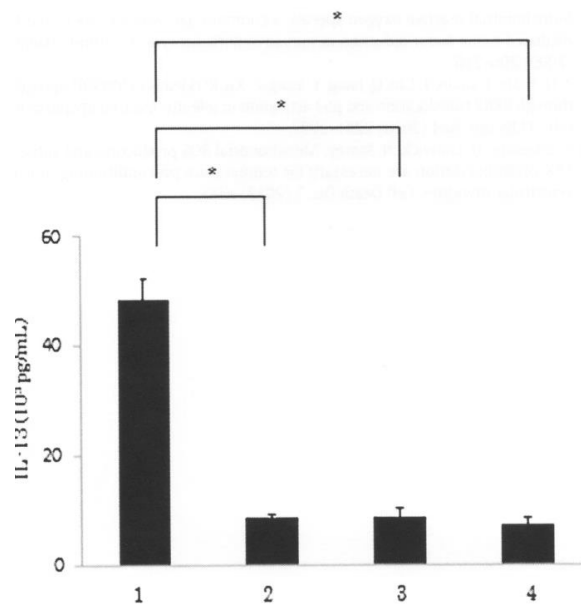


図15. 好中球エラスターゼ刺激による IL-13産生に対する U0126の阻害効果

1. Macrophages (day 9) + HNE (50 μM)
2. Macrophages (day 9) + U0126 (20 μM) + HNE (50 μM)
3. Macrophages (day 9) + U0126 (40 μM) + HNE (50 μM)
4. Macrophages (day 9) + U0126 (60 μM) + HNE (50 μM)

Data = mean ± S.E. \*p < 0.01

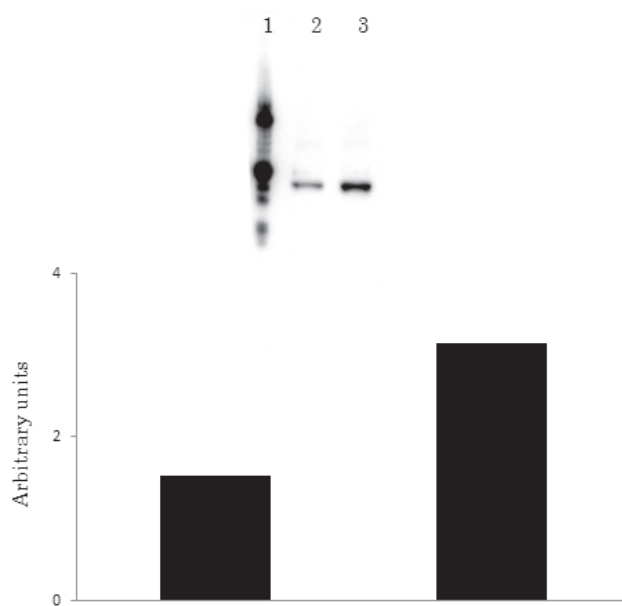


図16. IL-13刺激によるヒト腓星細胞の alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) の発現 (western blotting)

1. Markers    2. IL-13 (0 ng)  
3. IL-13 (100 ng)

- 7) Bone RC. Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation. *Crit Care Med*, 24: 163-172, 1996.
- 8) Ikei S, Ogawa M, Yamaguchi Y: Blood concentrations of polymorphonuclear leucocyte elastase and interleukin-6 are indicators for the occurrence of multiple organ failures at the early stage of acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol*, 13: 1274-1283, 1998.
- 9) Guo L, Yamaguchi Y, Ikei S, et al: Neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046) prevents lung hemorrhage induced by lipopolysaccharide in rat model of cerulein pancreatitis. *Dig Dis Sci*, 40 : 2177-2183, 1995.
- 10) See comment in PubMed Commons below Hisama N, Yamaguchi Y, Okajima K, et al: Anticoagulant pretreatment attenuates production of cytokine-induced neutrophil chemoattractant following ischemia-reperfusion of rat liver. *Dig Dis Sci*, 41: 1481-1486, 1996.
- 11) Yamaguchi Y, Akizuki E, Ichiguchi O, et al: Neutrophil elastase inhibitor reduces neutrophil chemoattractant production after ischemia-reperfusion in rat liver. *Gastroenterology*, 112: 551-560, 1997.
- 12) Yamaguchi Y, Matsumura F, Wang FS, et al: Neutrophil elastase enhances intercellular adhesion molecule-1 expression. *Transplantation*, 65: 1622-1628, 1998.
- 13) Ishihara K, Yamaguchi Y, Uchino S, et al: ICAM-1 signal transduction in cells stimulated with neutrophil elastase. *Dig Dis Sci*, 51: 2102-2112, 2006.
- 14) Mészáros K, Aberle S, Dedrick R, et al: Monocyte tissue factor induction by lipopolysaccharide (LPS) : dependence on LPS-binding protein and CD14, and inhibition by a recombinant fragment of bactericidal/permeability-increasing protein. *Blood*, 83: 2516-2525, 1994.
- 15) Kawata J, Aoki M, Ishimaru Y, et al: Mechanism of tissue factor production by



- monocytes stimulated with neutrophil elastase. *Blood Cells Mol Dis*, 54: 206-209, 2015.
- 16) Nijhuis J, Rensen SS, Slaats Y, et al: Neutrophil activation in morbid obesity, chronic activation of acute inflammation. *Obesity*, 17: 2014-2018, 2009.
- 17) Yamaguchi R, Yamaguchi Y: Excessive Adiposity an Established Risk Factor for Metabolic Diseases. *J Cell Sci Ther*, 6: 1, 2015.
- 18) Rovin BH, Dickerson JA, Tan LC, et al: Activation of nuclear factor-kappa B correlates with MCP-1 expression by human mesangial cells. *Kidney Int*, 48: 1263-1271, 1995.
- 19) Ho SC, Lee KY, Chan YF, et al: Neutrophil elastase represses IL-8/CXCL8 synthesis in human airway smooth muscle cells through induction of NF-kappa B repressing factor. *J Immunol*, 183: 411-420, 2009.
- 20) Fanning NF, Kell MR, Shorten GD, et al: Circulating granulocyte macrophage colony-stimulating factor in plasma of patients with the systemic inflammatory response syndrome delays neutrophil apoptosis through inhibition of spontaneous reactive oxygen species generation. *Shock*, 11: 167-174, 1999.
- 21) Aoki M, Yamaguchi R, Yamamoto T, et al: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor primes interleukin-13 production by macrophages via protease-activated receptor-2. *Blood Cells Mol Dis*, 54: 353-359, 2015.
- 22) Duncia JV, Santella JB 3rd, Higley CA, et al: MEK inhibitors: the chemistry and biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products. *Bioorg Med Chem Lett*, 8: 2839-2844, 1998.
- 23) Yamaguchi R, Yamamoto T, Sakamoto A, et al: Mechanism of interleukin-13 production by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent macrophages via protease-activated receptor-2. *Blood Cells Mol Dis*, 55: 21-26, 2015.
- 24) Kaviratne M, Hesse M, Leusink M, et al: IL-13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGF-beta independent. *J Immunol*, 173: 4020-4029, 2004.
- 25) Haber PS, Keogh GW, Apte MV, et al: Activation of pancreatic stellate cells in human and experimental pancreatic fibrosis. *Am J Pathol*, 155: 1087-1095, 1999.
- (平成27年 9 月24日受理)

## Neutrophil elastase-mediated diseases

Rui YAMAGUCHI and Yasuo YAMAGUCHI

Neutrophil serine proteases such as elastase, proteinase 3, and cathepsin G are released from activated neutrophils during inflammation. Activated neutrophils eliminate invading microorganisms by expelling nuclear DNA and histones to form extracellular web-like structures called neutrophil extracellular traps (NETs). NETs have been reported contribute to organ dysfunction in patients with infectious diseases. Proteases play important roles in regulating the inflammatory response through their actions on protease-activated receptors (PARs). PARs, a family of G-protein-coupled seven-transmembrane-domain receptors, includes PAR-1, PA-2, PAR-3, and PAR-4. PARs are activated by proteolytic unmasking of the N-terminal cryptic tethered ligand by certain serine protease. Neutrophil elastase (NE) activates PAR-2. NE concentration is associated with progression of acute pancreatitis. Neutrophils also are considered crucial effector cells in the pathophysiology of organ ischemia/reperfusion injury. NETs promote thrombosis. Obesity is one of the major public health problems worldwide.

Obese mice and human subjects have increased activity of neutrophil elastase. Hepatic macrophages regulate the influx of neutrophils and are indirectly involved in fibrotic liver. Thus, neutrophils contribute to the pathogenesis of a number of human diseases such as pancreatitis, reperfusion injury, obesity-associated inflammation, and fibrosis. In this article we will discuss the possible immunomodulatory effects of neutrophil elastase on various diseases.