

令和元年5月27日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10510

研究課題名(和文) 脳死関連肺障害の病態解明と予防・治療法の開発 - 特にNPYとVEGFと関連して

研究課題名(英文) Elucidation of the pathophysiology of brain death-related lung injury and development of precaution and remedy - especially in relation to NPY and VEGF

研究代表者

西脇 公俊 (NISHIWAKI, Kimitoshi)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10189326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、神経原性肺水腫(NPE)における細胞透過性に関与する神経ペプチドY(NPY)の作用機序を、ヒト正常肺微小血管内皮細胞とヒト気管支上皮細胞株Calu-3のin vitro細胞透過性評価系を用いて明らかにすることを目的とした。1.0E-7 MのNPYは両評価系で細胞透過性に影響を及ぼさなかった。しかしながら、1.0E-8 MのNPYで処理したマクロファージ培地の添加により、Calu-3細胞透過性は有意に亢進した。これらの結果は、NPEにおいて、NPYが血管内皮細胞や肺上皮細胞に直接作用するのではなく、マクロファージ刺激を介して肺上皮細胞透過性亢進を引き起こすことを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臓器移植医療において、たとえ脳死患者側が肺を提供臓器として了解していたとしても、肺障害のため移植手術に至らない場合が多い。その原因として、肺炎以外に脳浮腫・脳圧亢進による神経原性肺水腫の関与が報告されている。すでに研究代表者は、ラット肺水腫モデルを利用して、神経ペプチドY(NPY)の肺血管透過性亢進作用を見出している。この作用が、マクロファージを介して引き起こされるという本研究成果から、脳死後に誘発される肺障害の発生機序を明らかにできる可能性がある。さらに研究を進展させ、脳死患者の肺障害予防法・治療法を開発することで、より多くの脳死肺移植を可能とする。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to clarify the action mechanism of neuropeptide Y (NPY), which was considered to be related to the cell permeability in neurogenic pulmonary edema (NPE), using two in vitro cell permeability evaluation systems of human normal lung microvascular endothelial cells (HMVEC-L) and human bronchial epithelial cell lines Calu-3. NPY at the concentration of 1.0E-7 M did not affect cell permeability in both systems. However, the addition of macrophage medium treated with 1.0E-8 M NPY significantly increased the Calu-3 cell permeability. These results suggest that NPY did not act directly on both endothelial and epithelial cells, but could cause the increase in the lung epithelial cell permeability via macrophage stimulation in NPE pathophysiology.

研究分野：医歯薬学、外科系臨床医学、麻酔学

キーワード：神経原性肺水腫 細胞透過性 肺微小血管内皮細胞 気管支上皮細胞 神経ペプチドY 脳死肺移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

平成 22 年 7 月 17 日に改正臓器移植法が施行されてから脳死臓器移植が急増し、日本においても本格的な移植医療の第二の幕開けとも言える状況となった。脳死患者からどの臓器が提供されるかは脳死患者側の意思による部分もあるが、たとえ了解の得られた臓器であったとしてもその臓器に障害があると移植できない。特に肺については、最近の日本における脳死臓器移植においても提供される機会は少なく、海外における報告でも脳死患者から肺移植が行われる機会は 20%にも満たないと報告されている¹⁾。その背景には脳浮腫・脳圧亢進による神経原性肺水腫 (neurogenic pulmonary edema: NPE) の発生が示唆されている。実際、動物実験では、ブタ脳死モデルにおいて、NPE の発生とともに、血中および肺組織中神経ペプチド濃度の変化が観察されている²⁾。

NPE の発生機序は一般的に、くも膜下出血などの中枢神経系傷害による著明な交感神経系の興奮、引き続いて起こる血行動態変化 (血液のセントラリゼーション) による肺鬱血と肺毛細血管の傷害、透過性亢進型肺水腫発生の 3 段階で考えられていた³⁾。

研究代表者は、neuropeptide Y: NPY (肺交感神経終末にカテコールアミンと共存) -Y3 partial antagonist が NPE の発生を抑制すること、および NPE の水腫液中に NPY が ELISA 法によって高濃度に検出されたこと等から、第 2 段階には単に血行動態変化だけでなく、NPY を介した神経性調節による透過性亢進の機序も深く関与していることを明らかにしてきた。しかしながら、NPY が具体的にどのような機序で肺血管透過性亢進作用を示すのかは、未だ不明である。さらに一般的な肺水腫の透過性亢進機序との関連等も不明である。

一方、呼吸窮迫症候群 (以下 ARDS) 等において、トロンピンが、内皮細胞表面の PAR-1 レセプターに結合して G protein を介して、内皮細胞の収縮を引き起こし、また細胞間隙複合体 (adherens junction complex) の磷酸化が細胞間隙の変形を引き起こし、内皮細胞間に裂け目を生じさせて透過性亢進作用を発現していることが示された⁴⁾。従って、交感神経興奮に伴う血管透過性亢進においても、NPY が肺血管内皮細胞の収縮・内皮細胞間隙の変形を引き起こし、それが透過性亢進機序に直接つながっている可能性が十分に考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト正常肺微小血管内皮細胞とヒト気管支上皮細胞株 Calu-3 の *in vitro* 細胞透過性評価系を確立し、NPE における細胞透過性に関与する神経ペプチド Y (NPY) の作用機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養および試薬

正常ヒト肺微小血管内皮細胞 (HMVEC-L, Lonza) は、内皮細胞培地キット-2 (EGM-2、2% ウシ胎児血清、Lonza) により継代培養を行った。なお、EGM-2 に付属する添加因子の VEGF は、細胞透過性亢進作用を有するため、添加しなかった。ヒト気管支上皮細胞株 Calu-3 (AddexBio) の培養には、基本培地として DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) もしくは RPMI (Roswell Park Memorial Institute) -1640 を使用し、10% ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum; FBS, HyClone) と抗生物質 (100 units/mL ペニシリン G-100 µg/mL ストレプトマイシン、和光純薬) を添加したものを用いた。ヒト単球由来細胞株 THP-1 (JCRB 細胞バンク) は 10% FBS、抗生物質を含む RPMI-1640 で培養し、50 nM の phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を添加し、2 日間培養することでマクロファージに分化させて使用した。

細胞透過性評価には NPY (ペプチド研究所) の他に、既知の細胞透過性亢進物質としてリポポリサッカライド (LPS, Sigma) を使用した。

(2) ウエスタンブロッティング

THP-1 の単球からマクロファージへの分化は、マクロファージ特異的蛋白である CD11B の発現をウエスタンブロット法で確認した。THP-1 細胞と PMA 処理した THP-1 細胞をそれぞれプロテアーゼ阻害剤カクテル (Sigma) を含む RIPA バッファー (nacalai tesque) を用いて回収し、蛋白質濃度を BCA プロテインアッセイキット (Pierce) で測定した。細胞溶解液と Laemmli バッファーを用いてウエスタンブロッティング用サンプルを調製した。一定量の蛋白質 (5 µg) を 10% 濃度のポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により分離した。その後、Polyvinylidene Difluoride (PVDF) 膜 (MERCK MILLIPORE) に、セミドライ方式で転写を行った。PVDF 膜を 5% (w/v) スキムミルク (和光純薬) を含む 0.1% Tween-20 Tris 緩衝生理食塩水 (TBS-T) と室温で 1 時間反応させてブロッキングを行った後、一次抗体として 1000 倍希釈したウサギ抗 CD11B 抗体 (Cell Signaling Technology) と 4 時間で一晩反応させた。翌日、Horseradish Peroxidase (HRP) 標識二次抗体 (Cell Signaling) と室温で 1 時間反応させた後、HRP 用発光試薬 (ATTO) を用い、抗体反応物質の化学発光をイメージャー (Amersham Imager 600, GE Healthcare) で検出した。また、ハウスキーピング蛋白質であるアクチンを、マウス抗ベータアクチン抗体 (1:10000, abcam) を用いて上記と同様の方法で検出した。

(3) 細胞透過性試験

ダブルチャンバー法による *in vitro* 血管内皮細胞モデルは、円筒の下部に 1 µm の孔を持つポリエチレンテレフタレート (PET) 膜のついたミリセル® (MERCK MILLIPORE) 内に HMVEC-L を 1×10^5 cells/cm² で播種し、ミリセル® 外側の 24 穴プレートのウェル中にも液高が等しくなる

ように培地を入れ、5% CO₂ インキュベーター内で培養することにより作製した。薬物の添加は PET 膜上の細胞がコンフルエントに到達した播種 2 日後に行なった。一方、*in vitro* 肺上皮細胞モデルは、3 μm の孔を持つミリセル[®]内に Calu-3 を 1 × 10⁶ cells/cm² で播種し、HMVEC-L と同様の方法で作製した。薬物やマクロファージ培地の添加は播種 5 日後に行なった。

ミリセル内の上室には評価物質とイソチオシアン酸フルオレセイン (FITC) で標識されたアルブミンもしくはデキストラン (共に最終濃度 100 μg/mL, Sigma) を含む培地を、ミリセル外の下室ウェルには培地のみを添加し、5% CO₂ インキュベーター内で培養した。また、マクロファージを介した NPY の作用の検討では、マクロファージ分化後に NPY を添加して 6 時間培養し、培養液を回収したものを NPY 処置マクロファージ培地とし、FITC 結合物質とともにミリセル内上質に添加した。培養終了後、下室ウェル中に移行した FITC-結合物質の蛍光強度をマイクロプレートリーダー (SpectraMax[®] M3, Molecular Devices) により測定し (励起波長 495 nm、蛍光波長 520 nm) 細胞透過性の指標とした。同時に、細胞を播種していないミリセルを用いて透過性実験を行い、評価物質を添加していないコントロール群と比較すること、および透過実験終了後にミリセル内の細胞を 10% ホルマリンで固定したのち、ギムザ染色 (HMVEC-L) やパパニコウ染色 (Calu-3) し、細胞層形成の有無を確認した。(図 1)

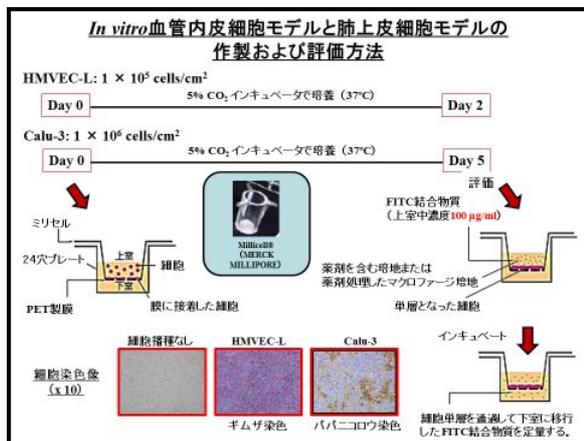


図 1: *In vitro* 血管内皮細胞モデルと肺上皮細胞モデルの作製および評価方法

(4) 統計解析

データは全て平均値±標準誤差で示した。統計解析はすべて SPSS ソフトウェア (IBM) を用い、両側 t 検定により解析した。P 値が 0.05 より小さい場合に統計学的に有意とした。

4. 研究成果

(1) *In vitro* 肺微小血管内皮細胞モデルおよび肺上皮細胞モデルの確立

新たに構築した *in vitro* 肺微小血管内皮細胞モデルおよび肺上皮細胞モデル系を用いた NPY の細胞透過性亢進作用評価に先立ち、すでに細胞透過性亢進作用を示すことが報告されている LPS で試験系の妥当性を評価した。その結果、HMVEC-L では 100、300、1000 ng/ml の LPS 添加 12 時間後において、Calu-3 では 10 μg/ml の LPS 添加 24 時間後において統計学的に有意な細胞透過性亢進作用が認められた (図 2)。これにより、細胞モデル系を確立できたと判断した。

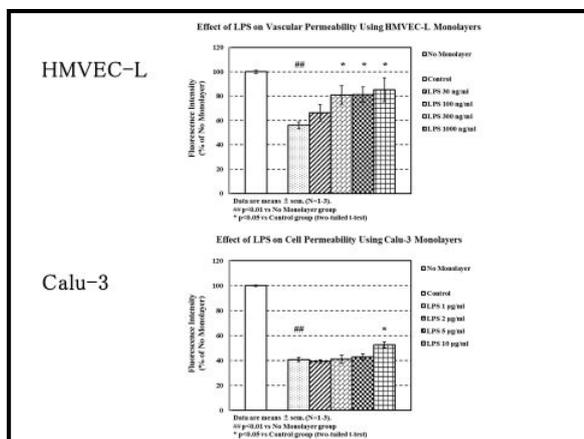


図 2: *In vitro* 血管内皮細胞モデルと肺上皮細胞モデルにおける LPS の作用

(2) NPY の細胞透過性亢進作用の検討

上記細胞モデルを用いて、NPY の細胞透過性亢進作用の有無を検討した。肺微小血管内皮細胞モデルにおいてはヒト血中に観察される範囲である 1 × 10⁻¹¹ ~ 1 × 10⁻⁷ M の NPY を、また肺上

皮細胞モデルにおいては、ラット脳死モデルで肺水腫液中に検出された 1×10^{-7} M の NPY を添加し、24 時間の反応時間で検討を行った。その結果、NPY はいずれの評価系においても有意な細胞透過性亢進作用を示さなかった (図 3)。

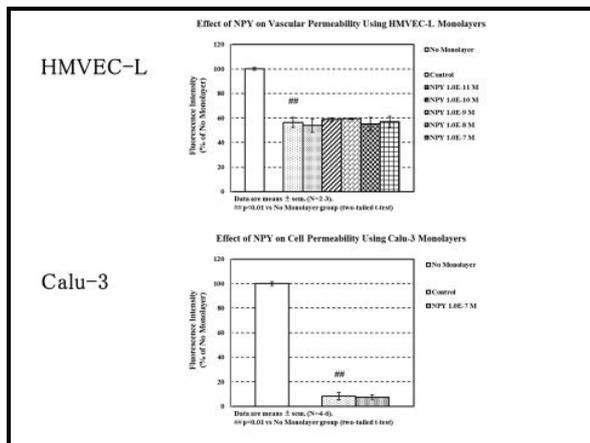


図 3 : *In vitro* 血管内皮細胞モデルと肺上皮細胞モデルにおける NPY の作用

(4) マクロファージを介した NPY の細胞透過性亢進作用

THP-1 細胞に 5 ng/ml の PMA を添加し、2 日間培養することで、マクロファージに分化することを確認した (図 4、ウェスタンブロッティング)。このマクロファージ細胞に 1×10^{-8} M の NPY を添加して 6 時間培養した。その培養上清を回収し、肺上皮細胞層に添加しての細胞透過性の有無を検討した。その結果、培養上清添加 6 時間後において、有意な細胞透過性亢進作用が認められた (図 4)。

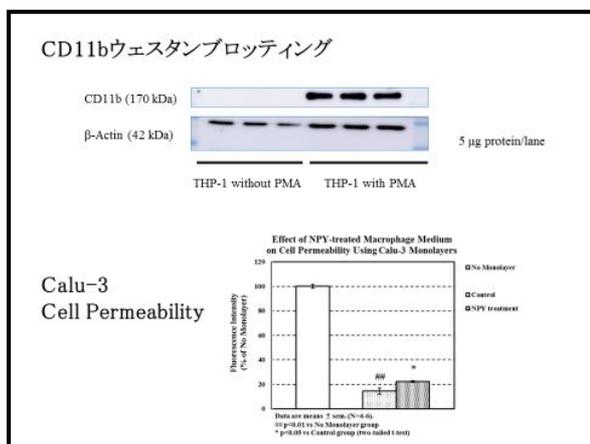


図 4 : THP-1 細胞のマクロファージへの分化と *in vitro* 肺上皮細胞モデルにおける NPY 処置マクロファージ培地の作用

(5) 研究結果の考察および今後の検討課題

本研究において、HMVEC-L を用いた肺血管透過性評価系と Calu-3 を用いた肺上皮細胞透過性評価系を確立した。試験系の妥当性を評価した LPS の濃度および反応時間は、透過性の評価指標の異なる他グループにより報告されたものと大差ないことから^{5,6)}、評価系として問題ないであろうと考えられる。これまで、肺動脈血管内皮細胞のみを用いて検討してきたが⁷⁾、肺水腫発症に関係深い肺微小血管内皮細胞と肺上皮細胞で評価系を確立できた意義は大きい。

新規評価系を用いた NPY の検討から、脳死後に遊離される NPY が、直接的に肺微小血管内皮細胞や肺上皮細胞に作用して細胞透過性を亢進するのではなく、最初に肺中で肺マクロファージに作用して、その後放出される何かしらの物質が肺上皮細胞の透過性を亢進し、肺水腫に至る可能性が示唆された。今後の検討課題として、マクロファージからの遊離物質の同定、マクロファージに局在し細胞透過性亢進に関与する NPY 受容体の同定、NPY 結合から物質遊離までのシグナル伝達の解明、細胞透過性亢進を抑制できる薬剤の探索などが挙げられる。研究代表者はこれまでに NPE 発症に NPY-Y3 受容体の関与を報告してきた⁸⁾。NPY-Y3 受容体は現在、ケモカインレセプター CXCR4/LESTR/Fusin と同一の受容体であるとされている。同受容体への NPY の結合を否定する報告もあり⁹⁾、NPY-Y3R に関する分子レベルでの研究は進んでいない。しかしながら、今後のマクロファージ細胞に対する NPY の作用の検討から、NPY-3R 受容体とされる CXCR4 受容体と NPY の関連性についても明らかにすることができるのではないかと考えている。

<参考文献>

- 1) Snell GI, et al. J Heart Lung Transplant 2008; 27: 662-7.
- 2) Anne B et al. J Heart Lung Transplant 2009; 28: 725-32.
- 3) West JB, et al. Schweiz Med Wochenschr. 1992; 122: 751-7.
- 4) Qiao J, et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2003; 284: L972-L980.
- 5) Gong P, et al. J Biol Chem. 2008; 283: 13437-49.
- 6) Serikov VB, et al. J Endotoxin Res. 2004; 10: 55-65.
- 7) 西脇公俊. 科研費報告書 (課題番号 23592251)
- 8) Nan YS, et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004; 286: H1027-33
- 9) Loetscher M, et al. J Biol Chem 1994; 269: 232-7

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)
〔学会発表〕(計 0 件)
〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6 . 研究組織

- (1)研究分担者 なし
- (2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。