

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17062

研究課題名(和文) プログラムネクロシスがARDS及び続発する遠隔臓器傷害に与える影響の検討

研究課題名(英文) Role of programmed necrosis in ARDS and the following remote organ injury

研究代表者

東條 健太郎 (Tojo, Kentaro)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：80737552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではARDSモデルマウスを用いて、ARDSにおける肺胞上皮細胞死は主にネクロシスで生じ、アポトーシスの寄与は相対的に小さい可能性があること、またネクロシスにはプログラムされたネクロシスの一型であるネクロプトーシスが関与していることを明らかにした。また、ARDSに対する人工呼吸は肺胞上皮細胞のネクロプトーシスを含むネクロシスを増悪させる可能性があることを明らかにした。肺胞上皮細胞のネクロプトーシスはARDSの治療標的として有望であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重症呼吸不全を引き起こし、致死率の高いARDSにおける肺胞上皮細胞傷害のメカニズムとしては主にアポトーシスに主眼をおいた研究が行われてきた。しかしながら本研究の成果により、アポトーシスよりもむしろネクロシスが病態に寄与している可能性が示され、また制御可能なプログラムされたネクロプトーシスが肺胞上皮細胞死を引き起こしていることが示唆された。本研究の成果はネクロプトーシスを含むネクロシスがARDSに対する有望な治療標的であることを示しており、ネクロプトーシスを標的としたARDS治療法開発に向けたさらなる研究を加速させるものである。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we have demonstrated that necrosis rather than apoptosis is a predominant form of alveolar epithelial cell death in LPS-induced experimental ARDS, and that necroptosis, a form of regulated necrosis, is involved in the alveolar epithelial cell death. Moreover, we have shown that mechanical ventilation with high tidal volume augments alveolar epithelial necrosis activating necroptotic pathway. These results suggest that the alveolar epithelial cell necroptosis is a promising therapeutic target for ARDS.

研究分野：集中治療医学

キーワード：ARDS 細胞死 ネクロシス アポトーシス ネクロプトーシス 臓器障害

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性呼吸促進症候群 (Acute Respiratory Distress Syndrome: ARDS) における肺胞上皮細胞の細胞死は肺胞バリアーの破綻による肺水腫の形成、炎症性メディエーターの全身への波及を引き起こし、さらには線維化を含む肺のリモデリングにつながると考えられている。細胞死のメカニズムはアポトーシスとネクローシスの二つに大きく分けられるが、ARDS においては FasL/Fas 系を介したアポトーシスが主に注目されて来た。しかしながら、近年、受動的な細胞死と考えられていたネクローシスにおいても、「プログラムされたネクローシス」の存在が報告され、治療のための介入対象となる可能性をもつことが明らかになってきた。プログラムされたネクローシスの代表的な経路としては RIP キナーゼ(RIPK)から MLKL のリン酸化に至るネクロプトーシス、mitochondrial permeability transition pore(MPTP)を介した MPTP 関連ネクローシス、PARP を介した parthanatos 等が知られており、それぞれが ARDS を含む様々な疾患に関わっている可能性が示唆されている。

アポトーシスは“きれいな細胞死”とも呼ばれ、細胞死を契機に炎症や周囲の組織の傷害を引き起こすことはないと考えられている。一方、ネクローシスにおいては細胞から炎症を引き起こす HMGB-1 やミトコンドリア DNA などの DAMPs が放出される。従って、ネクローシスは ARDS における肺胞バリアーの破綻のみならず、ARDS の自己増幅的な増悪、さらには全身性炎症及び多臓器不全を引き起こす可能性があり、プログラムされたネクローシスはアポトーシス以上に有効な治療ターゲットとなる可能性を持っている。しかしながら、ARDS における肺胞上皮細胞死において、アポトーシス、ネクローシスのそれぞれのタイプの細胞死がどの程度、寄与しているのかは報告されておらず、プログラムされたネクローシスの関与についてもわかっていない点が多い。

2. 研究の目的

以上を踏まえ本研究では、LPS 誘導性 ARDS モデルマウスの肺胞上皮細胞死においてアポトーシス、ネクローシスそれぞれのタイプの細胞死がどの程度寄与しているのかを明らかにするとともに、どのようなタイプのプログラムされたネクローシスが関与しているのかを明らかにすることことを当初の目標とした。また、LPS 誘導性 ARDS モデル単独では遠隔臓器への影響がほとんど見られなかったことから、LPS 誘導性 ARDS マウスに対して人工呼吸を加えた LPS+人工呼吸誘導性肺傷害 (Ventilator-Induced Lung Injury: VILI) モデルを作成し、LPS 誘導性 ARDS+VILI が肺胞上皮細胞の細胞死のパターンや、プログラムされたネクローシスにどのような影響を与えるのか、また遠隔臓器障害にどのような影響が生じるのかについて検討を行うこととした。

3. 研究の方法

3-1 LPS 誘導性 ARDS モデルマウスにおける肺胞上皮細胞死機構の解析

全身麻酔下に 10 週齢の C57BL6J マウスに対して LPS (E.coli, O111B4, 0.5mg/mL) 50 μ L を経気管投与することで、ARDS モデルを作成した。また、肺胞上皮細胞死が主にネクローシスによって引き起こされる塩酸気管内投与モデル、主にアポトーシスによって引き起こされる高濃度酸素暴露モデルを作成した。それぞれのモデルにおいて、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の好中球数、タンパク濃度、IgM 濃度、MPO 濃度、肺胞上皮細胞傷害マーカーである RAGE 濃度を測定し、肺傷害の程度を評価した。

肺胞上皮細胞死にアポトーシス、ネクローシスそれぞれがどの程度寄与しているのかを明らかにするために、BALF 中の上皮細胞全細胞死マーカーサイトケラチン (CK) 18-M65 及び上皮細胞アポトーシスマーカー CK18-M30 抗原の濃度を ELISA 法にて測定し、上皮細胞死に占めるアポトーシスの割合 (CK18-M30/CK18-M65 比) を計算した。

また、主にネクローシスにより細胞膜が破綻した細胞を検出するために、ARDS モデルマウスにヨウ化プロピジウム (PI) を腹腔内投与した上で、肺の凍結切片を作成し、PI 陽性細胞数を計測した。また、アポトーシスした細胞を検出するために、TUNEL 染色を行い、陽性細胞数を計測した。

次に、細胞死の機構についてさらに詳細な検討を行うために、Necrosis RT2 Profiler PCR Array kit (Qiagen Sciences) を用いて、プログラムされたネクローシスに関わる遺伝子群の発現について検討を行った。さらに有意に変化していた遺伝子群について Metascape (<http://metascape.org/>) を用いて Gene Ontology 解析を行い、どのようなプログラムされたネクローシスが関与しているのかについて検討を行った。

3-2 in vitro における LPS 活性化好中球による肺胞上皮細胞傷害死機構の解析

マウスの腹腔内にカゼインを投与し、腹腔内の遊走細胞を採取。Histopaque を用いて好中球を単離した。マウス肺胞上皮細胞株 MLE12 細胞の培養系に単離した好中球および LPS を添加し、一定時間培養後に細胞死を評価した。細胞死は細胞の Viability に加えて、Annexin-V/7AAD 染色を用いたフローサイトメトリー解析によりアポトーシスとネクローシスを判別した。さらに、アポトーシス、プログラムされたネクローシスに対する阻害剤を投与することで、細胞死が抑制されるか検討を行った。

3-3 LPS 誘導性 ARDS + VILI モデルマウスにおける肺胞上皮細胞死及び遠隔臓器障害への影響

LPS 誘導性 ARDS モデルマウスに対して、全身麻酔下をかけた上で、自発呼吸、もしくは高容量換気（一回換気量 40mL/kg）での人工呼吸管理を行うことで Ventilator-Induced Lung Injury (VILI)による傷害を引き起こした。これらのモデル動物に加え、健常動物の BALF を採取し、肺傷害の程度を評価するとともに、上記と同様に CK18-M65 及び CK18-M30 抗原の濃度を ELISA 法にて測定し、上皮細胞死へのアポトーシス、ネクローシスそれぞれの寄与について検討を行った。また、プログラムされたネクローシスの一型であるネクロプトーシスの実行因子である、RIPK3, MLKL の肺組織中濃度をウェスタンブロット法にて測定した。さらに、肝障害マーカー（血中 AST, ALT 濃度）及び腎障害マーカー（血中クレアチニン濃度）を定量した。

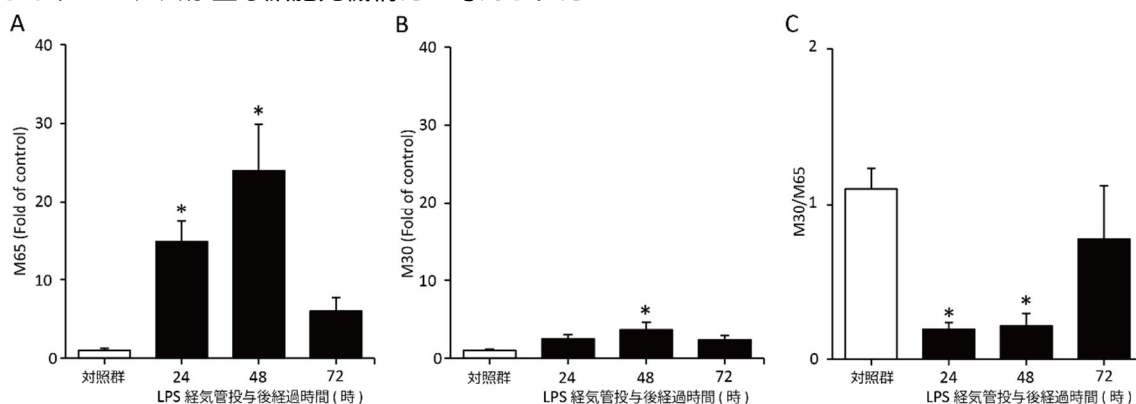
4. 研究成果

4-1 LPS 誘導性 ARDS モデルマウスにおける肺胞上皮細胞死機構の解析

LPS 誘導性 ARDS モデルマウスにおいて BALF 中の好中球数、タンパク濃度、IgM 濃度、MPO 濃度に加え、肺胞上皮細胞障害マーカーである RAGE の増加を認めた。また、LPS 投与 48 時間後のタイミングにおいて、動脈血酸素飽和度の低下を認めた。以上から、LPS 気管内投与により、実際の ARDS 患者の急性炎症期を模したモデルが構築できていると考えられた。

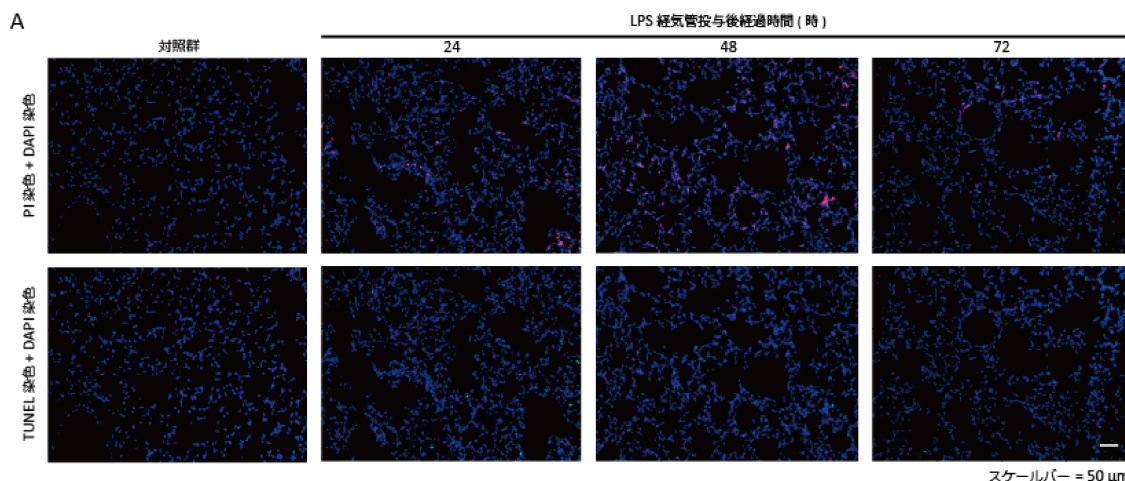
次に、ネクローシス、アポトーシスそれぞれが肺胞上皮細胞死にどの程度寄与しているかを BALF 中の CK18-M65, CK18-M30 の測定、及びネクローシス細胞を検出する PI 標識、アポトーシス細胞を検出する TUNEL 染色によって解析した。最初にそれぞれ、主にネクローシス、あるいはアポトーシスにより細胞死を引き起こすことがすでにわかっている塩酸気管内投与モデル、高濃度酸素暴露肺傷害モデルにおいて上記マーカーの妥当性を検証した。結果として、塩酸気管内投与モデルでは CK18-M30/M65 比が小さく、PI 標識陽性細胞が増加、高濃度酸素暴露モデルでは CK18-M30/M65 比は 1 に近く、TUNEL 陽性細胞が増加したことからこれらのマーカーによって、肺胞上皮細胞のネクローシス、アポトーシスをそれぞれ弁別することが可能であることが示された。

これを踏まえ、LPS 誘導性 ARDS モデルにおける CK18-M65, M30 濃度を測定したところ、健常動物と比較して両者ともに有意な増加がみられたものの、M30/M65 比が小さかったことからネクローシスが主な細胞死機構だと考えられた。



LPS 誘導性肺傷害モデル動物(n=6)の BALF 中の CK18-M65 および-M30。(A) M65 (B) M30 (C) *P<0.05 (対照群との比較)

また、PI 標識、TUNEL 染色の結果においても PI 陽性細胞がより増加しており、ネクローシスが主な細胞死機構であることが確かめられた。



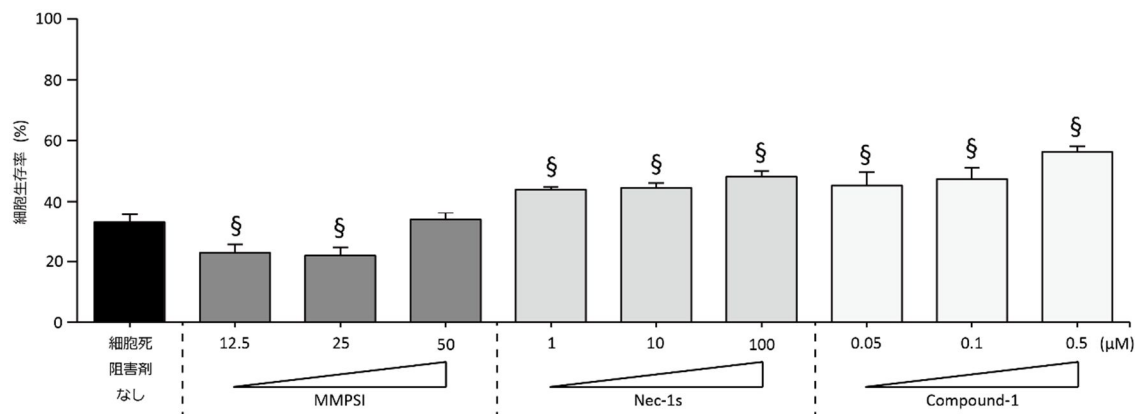
スケールバー = 50 μm

上記を踏まえ、Necrosis RT2 Profiler PCR Array kit (Qiagen Sciences)によって有意に変化していた遺伝子群について Metascape を用いて Gene Ontology 解析を行ったところ、ネクロプトーシスに関わる遺伝子群の発現が有意に変化していることが明らかになった。

4-2 in vitro における LPS 活性化好中球による肺胞上皮細胞傷害死機構の解析

上記動物モデルを模した、LPS 活性化好中球により傷害された肺胞上皮の細胞死機構について検討を行った。Annexin-V/7AAD 染色を用いたフローサイトメトリーでの死細胞解析の結果、早期アポトーシス細胞と比較して細胞膜が破綻したネクローシス/晩期アポトーシス細胞の増加がより多く見られた。このことから in vitro 細胞傷害系においても動物モデルと同じようなパターンでの細胞死が生じていることが示唆された。

次に、アポトーシスおよびネクロプトーシスの阻害剤により in vitro 傷害系での細胞死を抑制できるか検討を行った。アポトーシスを抑制する caspase-3, 7 の阻害剤 MMPSI では細胞死が抑制されず、むしろ細胞生存率の低下がみられた。一方、ネクロプトーシスに関わる RIPK1 阻害剤 Nec-1s, MLKL 阻害剤 Compound-1 は有意に細胞生存率を向上させた。以上の結果から、LPS 誘導性 ARDS における肺胞上皮細胞死にはネクロプトーシスが寄与している可能性が示された。



好中球・LPS 誘導性肺胞上皮細胞損傷モデルに対する各種細胞死阻害薬の効果
§ P<0.05 (細胞死阻害薬を含まない群との比較)

4-3 LPS 誘導性 ARDS + VILI モデルマウスにおける肺胞上皮細胞死及び遠隔臓器障害への影響

LPS 誘導性 ARDS モデルに対して高容量換気を行った際の肺胞上皮細胞死機構および遠隔臓器障害への影響について検討を行った。高容量換気を行うことで BALF 中のタンパク濃度、IgM 濃度、RAGE 濃度が有意に増加したことから、肺胞上皮細胞およびそれによって構成される肺胞バリアの傷害が増悪したと考えられた。

このモデルにおいて BALF 中の CK18-M65, M30 濃度を測定したところ、高容量換気により両者が有意に増加したが、M30/M65 比が 1 よりも小さかったことからネクローシス優位な細胞死が増加することが示された。さらにネクロプトーシスに関わる RIPK3, MLKL タンパク量をウェスタンブロット法で測定したところ、どちらも高容量換気によって優位に増加することが確かめられた。以上から、高容量換気は LPS 誘導性 ARDS モデルにおける肺胞上皮細胞のネクローシスを増悪させ、さらにそのネクローシスにはプログラムネクローシスの一型であるネクロプトーシスが関与していることが示唆された。

さらに、肝障害マーカーである AST, ALT および腎障害マーカーであるクレアチニンの血中濃度が高容量換気をされた動物で増加する傾向がみられた。しかしながら、高容量換気により血圧低下が見られたことから、必ずしも高容量換気が肺への傷害を介して遠隔臓器障害を引き起こしているのかについては確定的な結論が得られなかった。

以上のように LPS 誘導性 ARDS 及びそれに対する高容量換気がネクロプトーシスを含むネクローシス主体の細胞死を引き起こすことを明らかにし、論文発表を行った。今後、ARDS におけるネクロプトーシスに対する介入が肺傷害およびさらに遠隔臓器障害に対する治療シーズになりうるのかさらなる検討が必要だと考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Tamada Nao, Tojo Kentaro, Yazawa Takuya, Goto Takahisa. Necrosis rather than apoptosis is the dominant form of alveolar epithelial cell death in lipopolysaccharide-induced experimental acute respiratory distress syndrome model. Shock. (査読あり) 54(1):128-139, 2020.

<https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001425>

玉田尚, 東條健太郎 . 肺胞上皮細胞死からみた ARDS . 臨床麻酔(招請総説)(44)4: 535-544. 2020 .

[学会発表] (計 3 件)

玉田尚, 東條健太郎, 後藤隆久 . ARDS における肺胞上皮細胞死はアポトーシス or ネクローシス? -LPS 誘導性 ARDS モデルを用いた検討-」第 46 回日本集中治療医学会学術集会, (優秀演題賞受賞) 2019 .

Tamada N, Tojo K, Goto T. Necrosis rather than apoptosis is the dominant type of alveolar epithelial cell death in LPS-induced experimental ARDS. 39th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine, 2019.

鶴雄斗, 玉田尚, 東條健太郎, 後藤隆久 . 高容量換気は ARDS における肺胞上皮細胞ネクローシスを増強する . 第 47 回日本集中治療医学会学術集会 , 2020 .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tamada Nao, Tojo Kentaro, Yazawa Takuya, Goto Takahisa	4. 巻 54
2. 論文標題 Necrosis Rather Than Apoptosis is the Dominant form of Alveolar Epithelial Cell Death in Lipopolysaccharide-Induced Experimental Acute Respiratory Distress Syndrome Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Shock	6. 最初と最後の頁 128-139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001425	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 玉田尚, 東條健太郎	4. 巻 44
2. 論文標題 肺胞上皮細胞死からみたARDS	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床麻酔	6. 最初と最後の頁 535-544
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 玉田尚, 東條健太郎, 後藤隆久
2. 発表標題 ARDS における肺胞上皮細胞死はアポトーシス or ネクローシス?: LPS 誘導性 ARDS モデルを用いた検討
3. 学会等名 第46回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Nao Tamada, Kentaro Tojo, Takahisa Goto
2. 発表標題 Necrosis, rather than apoptosis, is the dominant type of alveolar epithelial cell death in LPS-induced experimental ARDS
3. 学会等名 39th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 鶴雄斗, 玉田尚, 東條健太郎, 後藤隆久
2. 発表標題 高容量換気はARDSにおける肺胞上皮細胞ネクロシスを増強する
3. 学会等名 第47回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----