

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09325

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は脳死患者に発症する肺障害発生機序解明に向け、in vitro肺細胞透過性評価系とin vivo脳死誘発肺水腫モデルラットを確立し、神経ペプチドY (NPY)の作用機序を検討することを目的とした。

海外製セルカルチャーインサートの入手困難に伴う気管支上皮細胞Calu-3を用いた肺上皮細胞透過性評価系の再構築は、Calu-3細胞単層のみの場合とマクロファージ様細胞との共培養の場合の両方で、LPS添加後に細胞透過性亢進作用を示す作製条件を見つけることができず、Calu-3細胞を用いての系構築を断念することにした。In vivoモデル系は脳死誘発後に肺水腫を発生するラット処置条件を見出した。

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において神経ペプチドY (NPY)の肺血管透過性亢進作用を見出している。本研究では、NPYの作用機序を解明するための評価系作製を試みたが、系を確立するには及ばなかった。しかしながら、in vivo脳死誘発肺水腫モデルラット作製方法習得など、研究自体は大きく前進した。今後の肺障害発生機序の解明研究により、脳死患者の肺障害予防法・治療法の開発が期待される。

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) in brain death patients, using in vitro cell permeability evaluation system of human bronchial epithelial Calu-3cell line and in vivo brain death-induced pulmonary edema rat model.

Due to difficulties in obtaining cell culture inserts made overseas, we tried to reconstruct a lung epithelial cell permeability evaluation system using Calu-3. Although we evaluated the effects of cytotoxic LPS on cell permeability increase both in Calu-3 cell monolayer alone and when co-cultured with macrophage-like cells, we could not find the appropriate culture conditions and decided to abandon the construction of the assay system using Calu-3 cells. On the other hand, in establishing in vivo model, we found the optimal rat treatment method that produced pulmonary edema after brain death induction.

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 神経ペプチドY 気管支上皮細胞 細胞透過性 ラット脳死モデル 脳死肺移植

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 が発生し、その血中および肺組織における神経ペプチド発現量に変化がおこっていることが示されている²⁾。

NPE は、交感神経興奮に伴う血管透過性亢進の典型的な病態であり、その発生機序は 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³⁾の 3 段階で考えられていた³⁾。そのような状況下において、研究代表者らのグループは、肺交感神経終末にカテコールアミンと共存する神経ペプチド Y (Neuropeptide Y: NPY) の Y3 パーシャルアンタゴニストが NPE の発生を抑制すること、NPE の水腫液中に NPY が高濃度に存在することを見出し、NPE の発生第 2 段階は血行動態の変化だけでなく、NPY を介した神経性調節による透過性亢進も深く関与していることを示した。しかしながら、その後の発生第 3 段階で 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り、一般的な肺水腫の透過性亢進機序との関連等についても不明なままとなっている。なお、急性呼吸窮迫症候群 (Acute Respiratory Distress Syndrome: ARDS) 等においては、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すこと、また細胞間隙複合体の燐酸化が細胞間隙の変形を引き起こして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ており⁴⁾、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は十分に考えられるところである。

また、研究代表者らのグループは、吸入麻酔薬の Isoflurane が肺の肺胞毛細血管内皮細胞、気管支粘膜、平滑筋などに血管内皮細胞増殖因子 (Vascular endothelial growth factor: VEGF) を誘導して、NPE を増悪させることを報告した⁵⁾。NPY が Y1 受容体や Y2 受容体を介して細胞増殖を誘導することが他の研究グループから報告されており、NPY が VEGF 発現を増強し、NPE の病態をより重篤化させている可能性も考えられうるが、この点についても未だ検証されてはいない。

以前の科学研究費助成事業研究では、正常ヒト肺微小血管内皮細胞 (Human Lung Microvascular Endothelial Cells: HMVEC-L) とヒト気管支上皮細胞株 Calu-3 を用いて *in vitro* 細胞透過性評価系を構築し、共にリポ多糖 (Lipopolysaccharide: LPS) 添加により細胞透過性が有意に亢進することでアッセイ系確立とした。両アッセイ系で NPY の細胞透過性亢進作用の有無を検討したが有意な作用は観察されなかった。しかしながら、肺胞内環境を想定し、ヒト単球由来細胞株 THP-1 に phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を添加してマクロファージ様に分化させた細胞に NPY を添加し、その培養液を Calu-3 細胞透過性評価系に供したところ、有意な細胞透過性亢進作用が見られた⁶⁾。

2. 研究の目的

本研究は、脳死患者に発症する肺障害発生機序を、NPY と VEGF との関連性から明らかにし、さらに肺障害の予防・治療法を開発することから、より多くの脳死肺移植を可能とすることを目的とした。具体的には、*in vitro* 肺細胞透過性評価系とラットを用いた *in vivo* 脳死誘発肺水腫モデル系で NPY や VEGF の作用機序を明らかにすることである。Calu-3 肺上皮細胞透過性評価系はすでに確立していたが、そこで使用していた海外製のセルカルチャーインサートが入手困難になり、他メーカーの同類品で系を再構築し、NPY の作用を再評価することになった。*In vivo* 脳死誘発肺水腫モデル系は、系構築の最初からのスタートとなった。

3. 研究の方法

(1) Calu-3 細胞透過性

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 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM、和光純薬) もしくは Roswell Park Memorial Institute (RPMI) -1640 (THP-1 との共培養時) 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) を添加したものをを用いた。THP-1 (JCRB 細胞バンク) は 10% FBS、抗生物質を含む RPMI-1640 で培養し、0.5 µM の PMA を添加してマクロファージに分化させた。被験物質には、NPY (ペプチド研究所) とアッセイ系確立を確認するための LPS (Sigma) を使用した。

ダブルチャンバー法による *in vitro* 肺上皮細胞モデル系は、セルカルチャーインサートがミリセル® (MERCK MILLIPORE) から ThinCerts™ (greiner bio-one) に変更となった。円筒の下部に 0.4 μm の孔を持つポリエチレンテレフタレート (PET) 膜のついたインサート内に Calu-3 を 1×10^5 cells/cm² または 2×10^5 cells/cm² で播種し、セルカルチャーインサート外側の 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。播種後、膜上の細胞単層の完全性をミリセル ERS-2 (MERCK MILLIPORE) 使用した電気抵抗測定により確認した。電気抵抗に変化が見られなくなったタイミングで、セルカルチャーインサート内に被験物質と 100 μg/mL のイソチオシアン酸フルオレセイン (FITC) で標識されたデキストラン (Sigma) を含む培地を、外側の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、電気抵抗が安定化した Calu-3 単層上に THP-1 を 1×10^5 cells/ml で播種し、PMA を添加して 2 日間培養した後に、上記同様被験物質と FITC-デキストランを含む培地の添加・培養を行った。培養終了後、電気抵抗の測定と共に、インサート外側のウェル中に移行した FITC-デキストラン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インサートを用いて透過性実験を行い、被験物質を添加していないコントロール群と比較し、細胞単層バリアの透過性を確認した。

(2) *In vivo* 脳死誘発肺水腫モデル

モデル作製には、Wistar 系雄性ラット (日本エスエルシー) を使用した。塩酸メドミジン + ミダゾラム + 酒石酸ブトルファノール混合液を使用してラットに麻酔をかけ、頭皮を切開して頭頂骨と片側の側頭骨を露出させ、側頭骨には脳波計 (EBA-100、ユニークメディカル) の電極を取り付け、矢状縫合の横に血栓除去用カテーテル (4Fr フォガティ動脈血栓除去カテーテル、エドワーズ) の挿入孔を作製した。さらに気管切開し、気管カニューレを挿入した。

ラット頭蓋内にバルーンカテーテルを挿入し、バルーン内に生理食塩水を注入することにより頭蓋内圧を上昇させ、脳幹部にヘルニアを起こすことにより作製した。非観血式血圧測定装置 (TK-370C、ブレインサイエンス・イデア) で血圧測定を行いながら、血栓除去用カテーテルを頭蓋内に挿入した。マイクロシリンジポンプ (エイコム) にセットしたガラス製シリンジ (ハミルトン) から 80 μl/min で 5 分間カテーテルに生理食塩水 (大塚製薬) を注入し、バルーンを加圧させることにより頭蓋内圧を上昇させ、脳幹部にヘルニアを起こすことにより作製した。自発呼吸の消失が観察されると同時に気管カニューレを人工呼吸器 (夏目製作所) に接続して、換気量 0.3 l/分、換気回数 80 回/分で換気を行った。気管支肺胞洗浄液 (Bronchoalveolar lavage fluid: BALF) は気管カニューレを通して採取した。

(3) 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* 肺上皮細胞モデル

In vitro 肺上皮細胞モデル系再構築に向けた最初の検討として、新たに導入したセルカルチャーインサート膜上で Calu-3 細胞が安定した単層を作製する培養条件の検討を行った。インサート内に Calu-3 を 1×10^5 cells/cm² または 2×10^5 cells/cm² で播種し、膜上に形成する細胞単層の電気抵抗値を ERS-2 で経時的に測定した。その結果、 2×10^5 cells/cm² の播種密度の方が安定した電気抵抗値を長く維持することを確認した。また、被験物質の評価は、播種 7 日目以降に行うのが適していると判断した (図 1 上段)。

次に、この Calu-3 播種条件で作製した細胞単層が、アッセイ系として適用可能か否かを探る目的で、細胞傷害性の LPS を 3、10、30 μg/ml の濃度で添加し、ERS-2 測定とインサート外側の FITC-デキストランの蛍光強度の測定を行った。LPS は FITC-デキストランと同時に細胞播種後 7 日目に添加し、翌日 (24 時間反応) と翌々日 (48 時間反応) に評価を行った。その結果、24 時間反応と 48 時間反応の両方において、細胞播種による有意なバリア機能の形成は見られたが、それに対する LPS の影響は 30 μg/ml という高濃度においても観察されなかった (図 1 下段)。この結果から、上記の実験スケジュールのままアッセイ系として適用することは不可と判断した。

その後、肺胞内環境を想定し、Calu-3 細胞単層とマクロファージ様細胞を共培養するアッセイ系作製を試みた。インサート内に Calu-3 を 2×10^5 cells/cm² の密度で播種して単層を形成した後 (播種 7 日後) に、THP-1 をインサート内に播種し、PMA を添加して 2 日間培養してマクロファージ様に分化させた。THP-1 播種細胞数は、ヒト肺胞内と同程度になるよう、単層を形成した Calu-3 細胞数の約 1/10 になるようにした。Calu-3 播種 9 日目 (THP-1 播種 2 日後) に 30 μg/ml LPS と FITC-デキストランをインサート内に添加し、48 時間後 (Calu-3 播種 11 日目) に評価を行った。その結果、Calu-3 単独の場合と同様に、有意なバリア機能の形成は見られたが、それに対する LPS の作用は見られず (図 2 上段)。共培養系のアッセイ系への適用も不可となった。なお、念のため、以前の我々の報告⁷⁾で脳死誘発肺水腫ラットモデルの BALF 中に見られた 1×10^{-7} M の濃度の NPY 添加についても同系で検討したが、NPY 添加 48 時間に有意な細胞透過性亢進作用は認められなかった。

以上の検討から、非常に強固なバリア機能を形成するヒト気管支上皮細胞株 Calu-3 細胞単層

で肺胞上皮細胞を模したアッセイ系を構築することは厳しいと考え、別の細胞で検討することにした。

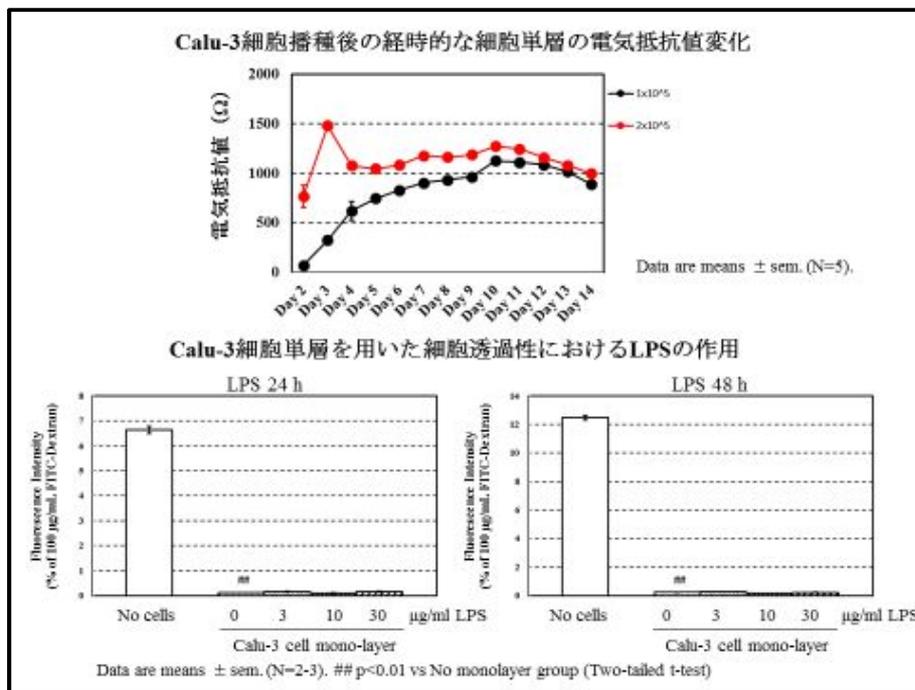


図 1 : Calu-3 細胞播種後の経時的な細胞単層の電気抵抗値変化 (上段) と Calu-3 細胞単層を用いた細胞透過性における LPS の作用 (下段)

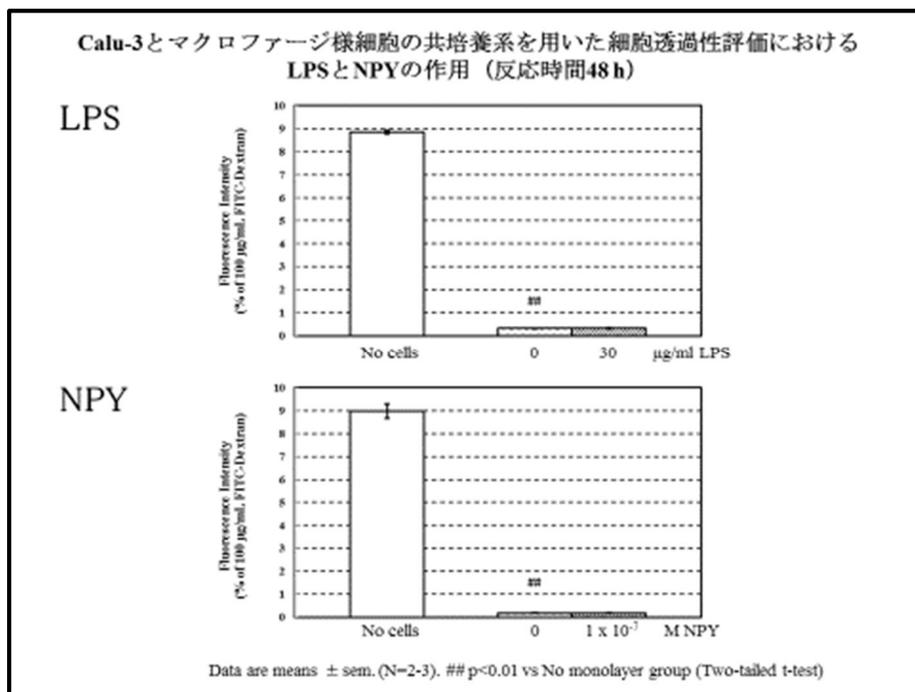


図 2 : Calu-3 とマクロファージ様細胞の共培養系を用いた細胞透過性評価における LPS (上段) と NPY (下段) の作用 (反応時間 48 h)

(2) *In vivo* 脳死誘発肺水腫モデル

In vivo 脳死誘発肺水腫モデルは、ラット頭蓋内にバルーンカテーテルを挿入し、バルーン内に生理食塩水を注入することで頭蓋内圧を上昇させ、脳幹部にヘルニアを起こして脳死を誘発して作製するが、体温管理や呼吸管理など、モデルの出来不出来を左右する注意点が多数あることを経験から学んだ (図 3)。研究期間内では、脳死誘発後に気管カニューレ逆流する肺水腫液を観察、採取するところまでのモデル作製手技を習得した。今後は、同モデル BALF 中の総蛋白を含む生化学的検査、摘出肺の Wet/Dry Ratio の測定法の確立、NPY 等の BALF 中濃度を測定する物質の選定、気管内薬物投与法の確立、肺傷害の組織学的解析法の確立などから、NPY や VEGF の作用検討に向けた評価法を決定する。

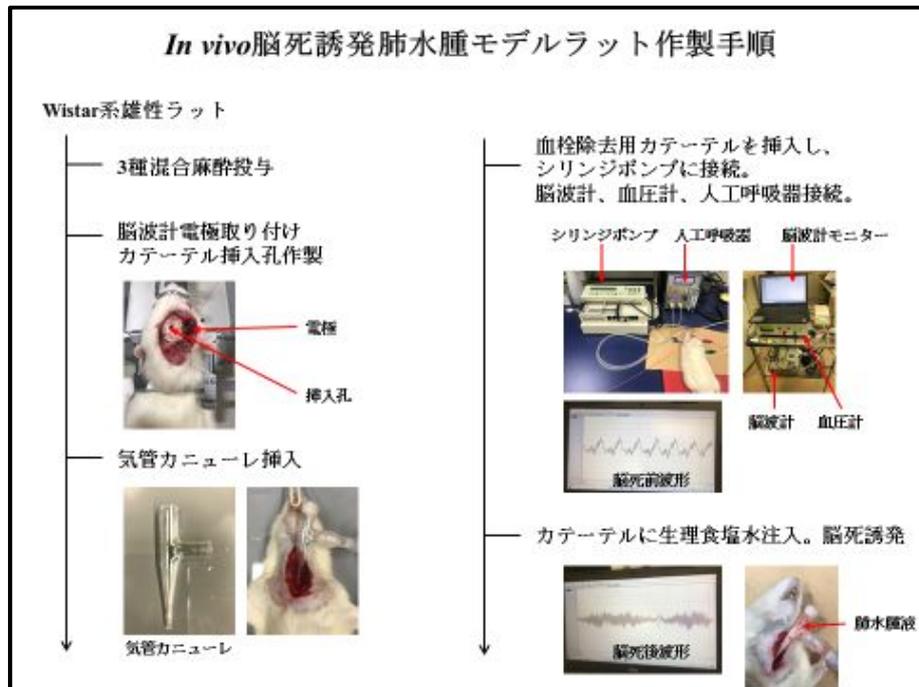


図3：In vivo脳死誘発肺水腫モデルラット作製手順

(3) 研究結果の考察および今後の検討課題

本研究において、Calu-3を用いた*in vitro*肺上皮細胞透過性評価系の確立はできなかった。試験系の妥当性を評価したLPSの濃度および反応時間は、他グループにより報告されたものと大差ないことから^{8,9)}、方法的には問題ないと考えている。以前の科学研究費助成事業研究において、セルカルチャーインサートにミリセル[®]を使用して作製したCalu-3細胞単層上に、マクロファージ様細胞にNPYを添加・反応した後の培養液を添加して、有意な細胞透過性亢進作用が見られた⁶⁾。セルカルチャーインサート変更でアッセイ系を失ったことで研究が後退した感はあるが、より生体肺胞内環境に近いアッセイ系を構築するためには、高濃度LPSに対しても保護作用を有するような強固なバリアを形成するヒト気管支上皮細胞株の使用は不適であると考えられた。すでに、ラット肺から2型肺胞上皮細胞を単離して1型肺胞上皮細胞に分化させる、正常初代細胞の使用やヒトの気管支上皮細胞16HBE14o₇を使用することを検討している。先の研究でNPYがマクロファージを介して作用している可能性を示した結果も考慮した最適な肺細胞透過性アッセイ系の早期確立とNPYやVEGFの作用機序解明を目指す。

*In vivo*脳死誘発肺水腫モデルについては、時間を要したが、安定して作製できる手技を習得した。同モデルBALF中の総蛋白を含む生化学的検査、摘出肺のWet/Dry Ratioの測定法の確立、NPY等のBALF中濃度を測定する物質の選定、気管内薬物投与法の確立、肺傷害の組織学的解析法の確立を試みる。これら検討の完了後には、脳死誘発肺傷害に対するNPY受容体アンタゴニストの抑制効果の有無を評価すると共に、他の抑制効果を有する薬剤の探索を行う。

<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) Kandatsu N, et al. Anesthesiology 2005; 102: 1182-9.
- 6) 西脇公俊. 科研費成果報告書(課題番号15K10510)
- 7) Hamdy O, et al. Exp Lung Res 2000; 26: 137-47.
- 8) Gong P, et al. J Biol Chem. 2008; 283: 13437-49.
- 9) Serikov VB, et al. J Endotoxin Res. 2004; 10: 55-65.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 孫堯、森厚詞、西脇公俊
2. 発表標題 Neuropeptide Y causes the increase in the lung epithelial cell permeability via macrophage stimulation.
3. 学会等名 日本麻酔科学会第66回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsushi MORI, Yao SUN, Kimitoshi NISHIWAKI
2. 発表標題 Increased lung epithelial cell permeability via macrophage stimulation caused by neuropeptide Y.
3. 学会等名 Anesthesiology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------