

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K18361

研究課題名（和文）ARDSの喫煙・炎症因子関連分子メカニズムの解明と新規治療法の確立

研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanisms related to smoking and inflammatory factors in ARDS and establishment of novel therapeutic strategies

研究代表者

小川 史洋（OGAWA, Fumihiro）

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：80383610

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）：根本的治療法が確立されていない急性呼吸窮迫症候群（ARDS）と喫煙習慣との関連につきヒト気道上皮細胞（BCs）およびLPS誘発ARDS動物モデルを用いて、その鍵となる因子・シグナルを解析した。in vivoでは炎症細胞浸潤や間質炎症性変化を含め滲出期ARDSに相当する所見が認められた。タンパク質レベルにおいて、LPS群でCXADRを含め肺胞破壊マーカーの発現増加を認めた。喫煙modelでは血管内皮Glycocalyxの剥離、血管透過性亢進、ARDS増悪につながる可能性が示唆された。in vitro modelでは、濃度依存的にCXADR発現の増加よりARDSとの関連が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身性炎症性反応によって生じる呼吸窮迫症候群（ARDS）は致死性疾患の代表であり、その根本的治療も確立されていない。重症新型コロナウイルス感染症に関してもARDS増悪による死亡症例が問題となった。様々な全身性炎症性疾患が結果的に生じ、命を奪うARDSに対して、この研究がその根本治療の確立の一助となり、ターゲットを絞った治療確立に今後繋がっていくことができれば学術的・社会的にも非常に意義がある研究であると考えられる。今回の研究期間ではまだ最終的な結果に繋がらなかったが、さらなる研究において早急にこの結果が公表できれば多くの命を救うことが可能であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Acute respiratory distress syndrome (ARDS) has no firm fundamental treatment has been established and symptomatic therapy is currently used. In this study, we analyzed the key factors and signals of ARDS using human airway epithelial basal cells (BCs), an experimental animal model of ARDS, which are thought to be involved in inflammation. In addition, we aim to establish an innovative and fundamental treatment for ARDS in relation to smoking habit, which is an exacerbating factor for respiratory disease.

In vivo, the study revealed findings corresponding to exudative ARDS. At the protein level, increased expression of CXADR and expression of alveolar destruction markers was observed.

In vitro model of LPS administration to BCs cultures, CXADR expression increased in a concentration-dependent manner in the LPS-treated group, suggesting an association between LPS-induced inflammation and ARDS and CXADR.

研究分野：救急集中治療

キーワード：ARDS ヒト気道上皮細胞 LPS コクサッキーAデノウイルス受容体 喫煙関連呼吸器疾患

## 1. 研究開始当初の背景

急性呼吸促迫症候群 (acute respiratory distress syndrome、ARDS) は、種々の原因や基礎傷病に続発して急性発症する低酸素血症であり、救急領域においても遭遇することが多く、これまで40年間余りにわたり疫学的研究・病因の解明など臨床研究および基礎研究が世界中で行われてきたが、いまだ不明な点が多く、確立した治療がない。ARDSの本態は、肺胞領域の非特異的炎症による透過性亢進型肺水腫であり、時期により**滲出期**、**増殖期**、**線維化期**と分類(図1)されており、広範な肺損傷がその特徴とされる。その原因として、薬剤・感染症・大量輸血などによって肺胞領域に生じた好中球主体の非特異的過剰炎症反応に起因する死亡率の非常に高い呼吸障害である。これには、**喫煙習慣がARDSをより惹起するという臨床報告が近年報告されている**(Farzad Moazed et al. Am J Respir Crit Care Med. 2022)。また、昨今の**新型コロナウイルス感染症(COVID-19)**においても肺障害の本態はこのARDSを呈している。

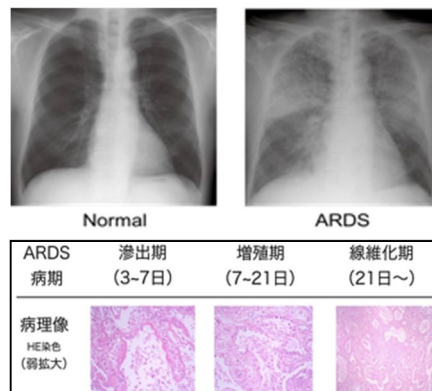


図1 ARDSの胸部レントゲン像と組織分類

現在まで、敗血症、ウイルス性肺炎、術後ARDSのようにARDSの原疾患ごとに分類し、コルチコステロイドの効果を評価した無作為化比較試験(Ruan et al. Critical Care. 2014.)が存在するが、明確な結論は出ていない。また重症ARDSを血管透過性亢進に代表される発症早期と線維化を中心とした後期に分類し、コルチコステロイドの炎症抑制・線維化抑制に対する効果を検討した研究(Lewis SR et al. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2019.)でも、議論の分かれる結論となっている。このように、これまでの病因や病期による臨床的な分類を基にした研究では劇的な予後の改善に繋がっていない。

## 2. 研究の目的

救急領域・集中治療領域において全身炎症症候群(SIRS)によって生じる肺胞領域の非特異的炎症による透過性亢進型肺水腫を病態とする治療法の確立されておらず、対症療法のみで治療をされている急性呼吸窮迫症候群(ARDS)に対する**革新的根本的治療法の確立**を目標とする。

## 3. 研究の方法

### (1) LPS気道内投与による滲出期ARDSマウスモデルでの検討

8-10週齢(体重20-23g)のマウスにLPS 1mg/kg 100  $\mu$ lを経気道投与し、滲出期ARDSモデルを作成し、48時間後心臓穿刺による採血後犠牲死させ、肺検体の分子生物学的アプローチ(PCR, Western blot, ELISAなど)を行う。また、採取したRNAよりRNA sequenceやマルチプレックスアレイを行い、LPS誘導ARDS発症に伴う関連分子を同定する。さらに、病理検体については、光学顕微鏡及び電子顕微鏡(TEM, SEM)を用いた形態学的評価を行い、血管透過性に関連している正常状態では**血管内皮表面に存在するGlycocalyx**の評価、及び免疫組織染色などの評価を行う。Naïve群、Vehicle群(PBS 100  $\mu$ l 経気道投与群)との比較検討を行う。

### (2) 喫煙マウスモデルへのLPS気道内投与によるARDSへの影響の検討

8-10週齢(体重20-23g)のマウスにCigarette Smoke Extract(CSE)を満たしたOsmotic Pump(Alzet 2006)を腹腔内に留置し、6週間曝露し、上記実験1の比較検討を行う。

### (3) CXADR KOマウスを用いた滲出期ARDSマウスモデルの検討

8-10 週齢 (体重 20-23g) の CXADR KO (CXADR/CreER) マウスを用いて上記実験 1,2 同様に Naïve 群、Vehicle 群との比較検討を行う。

### (4) 気道上皮基底細胞を用いた滲出期ARDSモデル作成

24 well transwell (Corning® Cat# 003413) を用い気道上皮基底細胞 (basal cell, Lonza CC-2540s, Large airway basal cell) を ALI で培養し、気道 mimic model を作成する。ALI は培養開始後 14 日目で気道上皮に mimic されるため、ALI 作成 14 日目に LPS を培養液に溶解し、48 時間 ALI で培養を行う。ALI の培養液は、STEMCELL Technology® PneumaCult™-ALI Medium を用いて Protocol 通りの交換を行う (STEMCELL Technology®)。LPS 曝露 48 時間後実体顕微鏡での表面上での変化を観察する。培養液は全て回収し、培養液中のタンパク分析などを行う。また、ALI で培養した検体については、Transwell ごとホルマリン固定の後 transmembrane staining を行うことによって Vehicle 群・LPS 群の形態的・免疫組織学的比較・評価を行う。さらに、回収した細胞の遺伝子的評価及び生化学的評価を行い、採取した RNA より RNA sequence やマルチプレックスアレイを行い、関連分子を同定する。それに関連する Signaling を検証する。

### (5) 気道上皮基底細胞滲出期ARDSモデルと喫煙との関連

上記同様 ALI を確立し、培養 Day5 より 5% CSE を培養液に溶解する。ALI 作成 14 日目より LPS を培養液に溶解し、LPS 投与後 48 時間後の評価を行う。検討方法は実験 4 と同様に行う。

### (6) Silence RNA CXADRを用いた滲出期ARDS in vitroモデルと喫煙との関連の検討

Silence RNA CXADR を BCs に transfection を行い、CXADR を knockdown した BCs を用いて ALI を作成し、上記実験 4,5 と比較検討を行う。

以上の in vivo, in vitro の研究により、ARDS と CXADR との関連、ARDS と喫煙習慣との関連を多角的に検討することによって、病態を理解し、関連する signaling pathway/Cytokines により ARDS に対する革命的治療アプローチをし、死亡率の低下・予後の改善を目指す。

## 4. 研究成果

- (1) in vivo 滲出期 ARDS model における LPS 気道内単独投与 48 時間後の肺の病理学的評価および Western blot にて炎症性因子の解析を行った。PBS 群には炎症細胞浸潤や間質の炎症性変化や壁肥厚、肺胞内の浸出液貯留などは認められなかったが、LPS 群では滲出期 ARDS に相当する所見が認められた (図 2A)。
- (2) Western blot による CXADR および肺胞破壊マーカーでの ARDS の評価においても PBS と比較し、LPS 群で CXADR を含め各種マーカーの発現増加を認めた (図 2B)。以上より LPS 誘発 ARDS には CXADR が関与していることがわかった。
- (3) in vivo 滲出期 ARDS model における LPS 気道内単独投与における脾臓および骨髄の免疫細胞の CXADR 発現を Western blot で検討した結果、肺組織同様、脾臓・骨髄においても PBS 群と比較し、LPS 誘発 ARDS 群で CXADR 発現増加を認めた。以上より局所組織の CXADR 発現増加だけでなく、全身免疫細胞において発現が増加していることがわかった (図 3)。

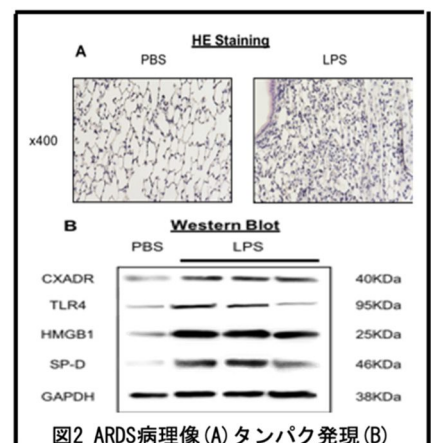


図2 ARDS病理像(A) タンパク発現(B)

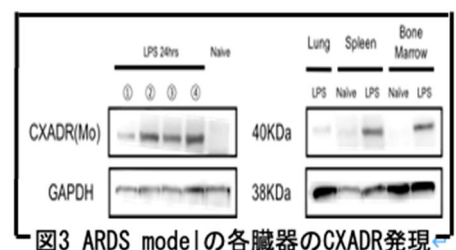


図3 ARDS modelの各臓器のCXADR発現

(4) ARDS in vitro modelとしてBCsを用いたPlastic cultureにおけるLPS投与において、vehicle群・PBS群と比較し、LPS投与群で濃度依存的にCXADR発現は増加しており、気道上皮細胞へのLPSによる炎症の惹起とARDSとCXADRとの関連が示唆された(図4)。

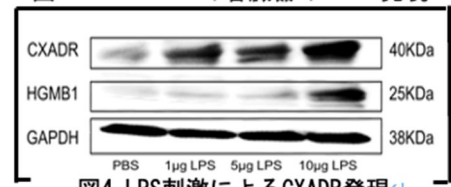


図4 LPS刺激によるCXADR発現

(5) in vivoにおけるosmotic pumpを用いたCSEによるsmoking model (CSE群)において、投与4週間・6週間後の肺の病理学的評価をしたところ、vehicle群と比較し、CSE群の肺実質の破壊像及び炎症性変化(H.E.染色, 図5A)とCXADR発現の増加(CXADR染色)を確認できた(図5B)。さらに、走査型電子顕微鏡(SEM)で血管内皮のGlycocalyxを観察したところ、CSE modelではGlycocalyxが剥離しており(図5C)、喫煙による慢性炎症により血管透過性亢進し、ARDS増悪につながる可能性が示唆された。

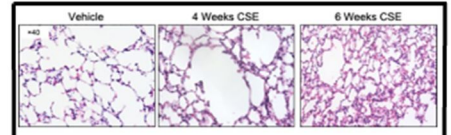


図5A CSE modelの病理像(H.E.染色)

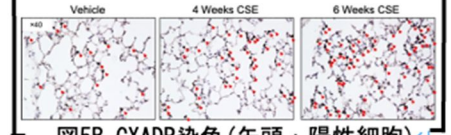


図5B CXADR染色(矢頭: 陽性細胞)

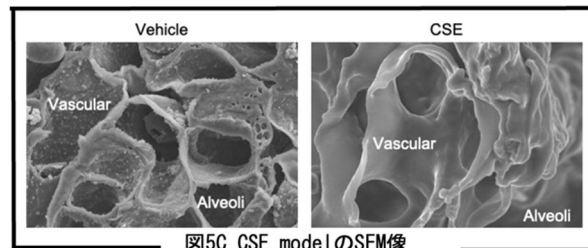


図5C CSE modelのSEM像

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ogawa Fumihiko, Oi Yasufumi, Honzawa Hiroshi, Misawa Naho, Takeda Tomoaki, Kikuchi Yushi, Fukui Ryosuke, Tanaka Katsushi, Kano Daiki, Kato Hideaki, Abe Takeru, Takeuchi Ichiro	4. 巻 17
2. 論文標題 Severity predictors of COVID-19 in SARS-CoV-2 variant, delta and omicron period; single center study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0273134	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Ogawa Fumihiko, Oi Yasufumi, Nakajima Kento, Matsumura Reo, Nakagawa Tomoki, Miyagawa Takao, Sakai Kazuya, Saji Ryo, Taniguchi Hayato, Takahashi Kohei, Abe Takeru, Iwashita Masayuki, Nishii Mototsugu, Takeuchi Ichiro	4. 巻 19
2. 論文標題 Temporal change in Syndecan-1 as a therapeutic target and a biomarker for the severity classification of COVID-19	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Thrombosis Journal	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12959-021-00308-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Ogawa Fumihiko, Kato Hideaki, Nakajima Kento, Nakagawa Tomoki, Matsumura Reo, Oi Yasufumi, Sakai Kazuya, Uchiyama Munehito, Ohyama Yutaro, Abe Takeru, Takeuchi Ichiro	4. 巻 18
2. 論文標題 Therapeutic strategy for severe COVID-19 pneumonia from clinical experience	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Inflammation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/2058739220961591	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Ogawa Fumihiko, Oi Yasufumi, Nakajima Kento, Matsumura Reo, Nakagawa Tomoki, Miyagawa Takao, Abe Takeru, Takeuchi Ichiro	4. 巻 19
2. 論文標題 An evaluation of venous thromboembolism by whole-body enhanced CT scan for critical COVID-19 pneumonia with markedly rises of coagulopathy related factors: a case series study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Thrombosis Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12959-021-00280-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小川史洋
2. 発表標題 Elucidation of the Molecular Mechanism Related to Inflammatory Factors and Smoking, and Estimate of Revolutionary New Treatment for ARDS.
3. 学会等名 第48回日本救急医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石川智紀、小川史洋
2. 発表標題 Establishment of the Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) Model with Lipopolysaccharide (LPS).
3. 学会等名 日本救急医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川史洋, 竹内一郎
2. 発表標題 COVID-19重症例の呼吸管理と感染対策
3. 学会等名 第42回日本呼吸療法学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fumihiko Ogawa
2. 発表標題 Temporal change in Syndecan-1 as a therapeutic target and a biomarker for the severity classification of COVID-19
3. 学会等名 ATS2022, San Francisco, US (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 小川史洋	4. 発行年 2020年
2. 出版社 MEDICAL VIEW	5. 総ページ数 268
3. 書名 ICU輸液が見えるグリコカリックスアトラス	

1. 著者名 小川史洋	4. 発行年 2024年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 278
3. 書名 呼吸器診療エッセンシャル「急性間質性肺炎,ARDS」	

〔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
---------	---------