

機関番号：22701

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008 ~2010

課題番号：20390459

研究課題名 (和文) 急性肺損傷の細胞内シグナルパスウェイ／遺伝子ネットワーク解析と治療に向けた研究

研究課題名 (英文) Analysis of Intra-cellular signaling pathway and gene network in acute lung injury as for therapeutic strategy.

研究代表者

倉橋 清泰 (KURAHASHI KIYOYASU)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：50234539

研究成果の概要 (和文)：マウスの肺上皮の培養細胞を用いた研究で、FasL と LPS が炎症の誘発に相乗的に作用することが明らかとなった。一方、FasL により増加したカスパーゼ 3/7 活性は、LPS の同時作用により抑制されることがわかった。これら 2 つのシグナリングパスウェイに何らかの接点があることが示唆された。次に ARDS の極期として起こる肺線維化に対して keratinocyte growth factor (KGF) の遺伝子導入をすると肺の線維化を抑制し死亡率等を低下することが証明された。ARDS の治療の可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Lung fibrosis following ARDS has high morbidity and mortality. We thought that investigation on the mechanism on lung fibrosis and key molecules causing fibrosis should be of benefit to ARDS treatments. Giving bleomycin continuously using an osmotic pump implanted subcutaneously, we created pulmonary fibrosis on rats. Eight days after the administration of bleomycin when lung fibrosis occurs, rats were given keratinocyte growth factor (KGF) expressing adenovirus vector intratracheally. The treatment group expressed attenuated pulmonary fibrosis, oxygenation impairment, and mortality. Transforming growth factor (TGF)-beta that increased in lungs after the administration of bleomycin was reduced with KGF vector administration, which suggested the importance of TNF-beta on pulmonary fibrosis. These observations suggested the lung protective effects of epithelial growth factor on ARDS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2009 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
総計	11,700,000	3,510,000	15,210,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：FasL, エンドトキシン, 肺障害, アポトーシス, サイトカイン, トール様受容体, keratinocyte growth factor, transforming growth factor-beta, 肺線維化

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、緑膿菌肺炎、高濃度酸素肺傷害、全身性炎症症候群に伴う ventilator induced lung injury (VILI) 等の研究を行い肺傷害の機序と治療法を研究してきた。最近

開発した肺上皮増殖因子の遺伝子治療において実験動物の肺傷害の予防と生存率の改善を示したが、その分子生物学的機序は未だ不明な点が多い。本研究の主要な目的は、急性肺損傷の発症メカニズムを細胞レベルで

明らかにし、その発症の予防および治療において鍵となる分子ターゲットを見いだすことにある。

急性肺損傷 (acute lung injury, ALI) ・急性呼吸窮迫症候群 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) は、急激に発症する高度の肺微少血管透過性亢進を初期の病態として、肺胞腔内、肺間質への滲出液貯留による著しい低酸素血症を示す疾患群であり、治療困難で死亡率が高い。また、その原因疾患には誤嚥、感染性肺炎、肺挫傷、有毒ガスの吸入、溺水など肺が一次損傷部位であるものに加え、敗血症、薬物中毒、多発外傷、大量輸血後、急性膵炎などの間接的な要因でも発症するため、罹患者数も多い。最近の米国の統計でも年間 20 万人が罹患し、8 万人余が死亡している(1)。しかしながら、現在までに本症候群に対する有効な治療法はない。

臓器障害の基本単位である細胞の死には necrosis と apoptosis がある。肺損傷において、necrosis は主に機械的な shear stress によって発生するといわれている。傷害肺に人工呼吸を行う際に、肺や気道の拡張の度合いが異なるため、過剰な圧のかかる肺部分が生じる。かかる肺部分の細胞はその過剰な stress により necrosis に至る(2)が、このような形態の傷害は VILI とも呼ばれている。米国で行われた大規模な臨床研究で、一回換気量を制限することにより VILI を減少させ、ARDS に伴う肺傷害を軽減し死亡率を低下させることが示された(3)。一方、apoptosis の発生機序は複雑である。apoptosis の発生には、従来 Fas/FasL を介した細胞内伝達経路が重要であると考えられてきた。現在でもこの経路は apoptosis の主要な経路のひとつであるが、最近の研究で他の経路の関与、あるいは Fas/FasL の経路と他の経路との相互作用の可能性が示唆されている(4-6)。このことは即ち、Fas/FasL の経路を遮断しただけでは、apoptosis を完全に防ぐことができないということを意味しており、実験系を考える際にも治療法を検討するうえでも重要な情報を与える。特に注目すべきは、可溶性 (s)FasL の投与により炎症性サイトカインが産生されるという報告である(7)。さらに最近では、グラム陰性菌の毒素エンドトキシン (LPS) の特異的受容体である toll-like receptor (TLR)-4 と Fas/FasL の経路が細胞内の伝達経路でクロスオーバーしていることを示唆する報告がなされ(8)、これらは以前申請者らが細菌性肺炎モデルにおいて、抗炎症性サイトカイン (IL-10) が肺傷害を軽減するとした研究(9-10)とも合致する。

[参考文献]

1. Rubenfeld GD, et al. Incidence and

outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med.* 353:1685-93, 2005.

2. Dryfuss D, et al. High inflation pressure pulmonary edema. Respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis.* 137:1159-64, 1988.

3. ARDSNet Group. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 342:1301-08, 2000.

4. Kuwano K, et al. Signal transduction pathways of apoptosis and inflammation induced by the tumor necrosis factor receptor family. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 22:147-9, 2000.

5. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature (Lond.).* 407:770-6, 2000.

6. Wang R, et al. Fas-induced apoptosis of alveolar epithelial cells requires ANGIOII generation and receptor interaction. *Am J Physiol.* 277:L1245-50, 1999.

7. Park DR, et al. Fas (CD95) induces pro-inflammatory cytokine responses by human monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Immunol.* 170:6209-16, 2003.

8. Ma Y, et al. Fas ligation on macrophages enhances IL-1R1-Toll-like receptor 4 signaling and promotes chronic inflammation. *Nat Immunol.* 5:380, -387, 2004.

9. Sawa T, Kurahashi K, et al. IL-10 improves lung injury and survival in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Immunol.* 159:2858-2866, 1997.

10. Kurahashi K, et al. Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Clin Invest.* 104(6):743-50, 1999.

2. 研究の目的

以上の検討を背景に本研究では、申請者らが現在まで行ってきた緑膿菌肺炎に伴う肺傷害や ARDS に関連する研究をさらに発展させ、かつより特異的な分子機能を研究するために、FasL 及び LPS の暴露によって、気道上皮細胞表面のリセプター (Fas 及び TLR4/MD-2) や、細胞内アダプター蛋白 (MyD88; Fas-associated death domain, FADD)、さらに下流の各種キナーゼの発現の増減と、最終的な apoptosis やサイトカイン産生の程度を比較検討する。そのなかで、apoptosis の発生に関与する重要な標的分子

を選び出す。

特に本研究では、Fas を介した経路と TLR4/MD-2/CD14 を介した経路との相互作用に着目する。現段階では、図 1 の模式図で示した通り、Fas 受容体の細胞内ドメインに直接結合する FADD には、TLR4 の経路を抑制する作用があることが推論されるが、これにとどまらずに、さらにその下流にある分子にも着目する。

責任分子が同定されたら、次にそれらを siRNA を用いて knock down あるいは、以前から用いているベクターを用いた方法で遺伝子導入を行い、その効果をそれぞれ apoptosis やサイトカインを指標に再度確認する。これら一連のプロセスを経て、責任分子の役割を明らかにし、治療の標的を決定する。

3. 研究の方法

肺上皮細胞の cell line である LA-4 (CCL-196, ATCC)、MLE 12 (CRL-2110, ATCC) のモノレイヤーに Fas のリガンドである anti-mouse CD95 clone Jo2 (554254, BD Biosciences) および LPS (E. coli O111:B4, List Biological Laboratories) を暴露させる。positive control としては、マクロファージの cell line である RAW 264.7 (TIB-71, ATCC) を用いる。それぞれの dose や暴露時間を変化させて、最も適した条件をみつける。結果の検討は、caspase-3 の活性化、Annexin V アッセイ、細胞の生死 (Alamar Blue アッセイ)、各種サイトカインの定量 (ELISA) 等で行う。

既に予備実験において、上記肺上皮細胞の cell line が LPS の暴露によってサイトカイン (KC) を産生しないことが確かめられた。調査の結果、正常の気道上皮は TLR4 を発現していない可能性が示唆された (Monick MM, et al. J Biol Chem. 278:53035-44, 2003; Suzuki M, et al. Infect Immun. 71:3503-11, 2003; Tsutsumi-Ishii Y, et al. J Immunol. 170:4226-36, 2003)。そこで、これらの知見に基づき各種物質で細胞を刺激し、細胞表面の TLR4 の発現を flow cytometry で現在確認中である。また、これらの肺上皮細胞に CD14 は発現していることが確認されたので、TLR4 と MD-2 を遺伝子導入することも検討中である。何れかの方法で FasL と LPS の双方に反応する細胞を作成し、実験を遂行する。Apoptosis/サイトカイン産生が確認された系で、同様に LPS and/or Jo2 を暴露し、シグナル細胞活性 ELISA キット (コスモバイオ) を用いて各種シグナル伝達物質の定量を行う。

次いで、適正な条件のもと、in vivo の実験に移る。週齢 8 (20-25 g) の雄性マウス

(BALB/c) をケタミンとキシラジンで麻酔後に仰臥位で傾斜をつけた台に固定し、声門を直視下に Jo2 (マウスの FasL) and/or LPS を注入する (control 群も含めて 4 群; Jo2 の control は isotype-matched control Ab, LPS の control は PBS)。Jo2 および LPS の投与量、暴露時間等は in vitro の結果を参照に決定する。一定時間経過後、深麻酔下に血液を採取し、一方の肺で肺胞洗浄 (BAL)、他方で組織採取を行う。別の一群では flexiVent で呼吸機能検査を行う。BAL 回収液は、細胞数 (比) 計測後、 -80°C で冷凍保存し、後の測定に供す。取り出した肺は、histology 用にホルマリン固定し、一部は RNA 採取用に急速凍結する。さらに別の一群では、ラジオアイソトープでラベルしたアルブミンを同時に肺に注入し、血液中のアイソトープカウントから、肺の障害の程度を定量する。

保存した検体は一部次の C. で遺伝子プロファイリングに用いるが、一部はここで ELISA (各種サイトカインの定量及びシグナル伝達物質の定量) に用いる。

C57BL6 マウスの皮下に bleomycin 120 mg/kg を浸透圧ポンプを用いて持続注入する。線維化の起こり始める 7 日目に KGF を発現するアデノウイルスを気道内投与する。8 週目までの生存率、2・4・8 週目の肺組織像、血液ガス分析、呼吸機能検査、肺組織/血漿中の生化学的分析で KGF の効果を評価する。

4. 研究成果

マウス肺上皮細胞の cell line、MLE15 のモノレイヤーに FasL および LPS を暴露させたところ、LPS 単独により MLE15 からの IL-6、MIP-2、および KC 産生が増加した。FasL もその作用は LPS よりも弱いながら認められた。LPS と FasL を MLE15 に同時に作用させると、サイトカイン産生が相乗的に増加した。

一方、アポトーシス誘導の細胞内経路にあるカスパーゼ 3/7 活性は、FasL により増加したが、LPS にはその作用がなかった。さらに、FasL と LPS を同時に作用させると、LPS は FasL により増加するカスパーゼ 3/7 活性を抑制する作用があることがわかった。これらのことから、TLR4 と Fas との細胞内シグナルパスウェイに何らかの関連があることが示唆された。別のマウス肺上皮細胞の cell line である MLE12 に LPS を暴露した場合、MLE15 に比べて 100 倍近く高い濃度の LPS に暴露してはじめて MLE15 と同程度のサイトカインを産生した。この違いを検討するため、細胞表面の Toll like receptor 4 (TLR4) を調べたところ、MLE15 は陽性であったが、MLE12 は陰性であった。

そこで、MLE12 に TLR4 を遺伝子導入し、同様に LPS に暴露したところ、この細胞は

MLE15 に匹敵する感受性を獲得していた。以上より、肺上皮細胞の LPS 感受性は、細胞膜表面の TLR4 の有無に依存することが示唆された。

KGF の遺伝子導入をすると肺の線維化や肺酸素化能の悪化、死亡率等を軽減することが証明された。また、肺線維化の過程で transforming growth factor (TGF)-beta が肺内で増加すること、KGF の発現により TGF-beta が減少することから、この分子が肺線維化に重要な役割を演じていることが示唆された。以上より、ARDS における気道上皮細胞増殖因子による肺保護作用の可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Kurahashi K: Therapeutic strategy for acute respiratory distress syndrome: recent understanding of the pathophysiology of the disease. J Anesth. 25:155-6, 2011.

2. Sakamoto S, Yazawa T, Baba Y, Sato H, Kanegae Y, Hirai T, Saito I, Goto T, Kurahashi K: Keratinocyte growth factor gene transduction ameliorates pulmonary fibrosis induced by bleomycin in mice. Am J Respir Cell Mol Biol. 2011 (*in press*).

3. 倉橋 清泰: ARDS の治療. 麻酔. 2011 (*in press*).

[学会発表] (計 1 件)

1. 倉橋 清泰: ARDS の病態と治療. 日本麻酔科学会総会. 2010/6/3. 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉橋 清泰 (KURAHASHI KIYOYASU)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：50234539

(2) 研究分担者

矢澤 卓也 (YAZAWA TAKUYA)

横浜市立大学・医学研究科・准教授

研究者番号：50251054

平井 豊博 (HIRAI TOYOHIRO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：20359805

馬場 靖子 (BABA YASUKO)

横浜市立大学・市民総合医療センター・

助教

研究者番号：20359805

(3) 連携研究者

鐘ヶ江 裕美 (KANEGAE YUMI)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：80251453