

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590932

研究課題名（和文）：エンドトキシン起因性肺損傷におけるTLR遺伝子発現

研究課題名（英文）：TLR gene expression in endotoxin-induced lung injury

研究代表者

岩崎 吉伸（IWASAKI YOSHINOBU）

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：00203373

研究成果の概要（和文）：ラットを用いた実験的エンドトキシン惹起肺損傷において肺胞上皮TLR4の遺伝子発現・蛋白発現が亢進し、肺胞上皮細胞のアポトーシスが誘導された。さらに、可溶性CD14は、肺胞上皮細胞のTLR4による活性化を増強した。また、可溶性CD14を不活化することにより肺胞上皮細胞障害を抑制された。

研究成果の概要（英文）：In the experimental model of endotoxin-induced acute lung injury using rats, TLR4 gene and protein expression were found followed by apoptosis of alveolar epithelia. Soluble CD14 accelerated apoptosis of alveolar epithelia by activating TLR4. Inactivation of soluble CD14 reduced alveolar epithelial damage.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：TLR、エンドトキシン、肺損傷、CD14、肺胞上皮、アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 自然免疫による生体防御のメカニズムとして、TLRファミリーは極めて重要である。TLRファミリー分子は病原体に特異的な構成成分を認識するための必須の受容体であり、TLRシグナルは炎症に関わる遺伝子の発現を誘導し、免疫応答に重要な役割を果たしている。

(2) これまで、敗血症性急性肺損傷では、CD14陽性細胞である単球・マクロファージにおいては、エンドトキシンが細胞表面のTLR4

と結合し、その後活性化され、IL-1、IL-6、IL-8、TNF-alpha等の炎症性サイトカインを大量に産生し、そのため肺血管内皮障害が引き起こされることが報告されている。

(3) 一方、急性肺損傷の発症には、血管内皮障害のみならず肺胞上皮の障害が重要であることが示されている。しかし、急性肺損傷の発症においてCD14の発現がみられない肺胞上皮におけるTLR遺伝子発現・シグナル伝達についての実験結果の報告はない。

## 2. 研究の目的

Toll-like receptor (TLR)は外界からの病原体の侵入を特異的に認識し、その後の免疫応答・生体防御に重要な役割を果たす。敗血症性急性肺損傷では、TLR4が菌体成分であるエンドトキシン(Lipopolysaccharide、以下LPS)を認識することにより、過剰な全身性炎症反応が引き起こされる。LPSは、肝臓またはヒトII型肺胞上皮細胞でのLPS-binding protein(LBP)産生を誘導し、直ちにLPSと結合する。LPS-LBP complexは、マクロファージ、単球の細胞膜に発現しているCD14と結合することにより細胞を活性化する。活性化されたマクロファージや単球は、TNF、IL-1、IL-6、IL-8、好中球遊走因子を産生し、全身性の炎症を引き起こす。一方、CD14の発現のみられない肺胞上皮に対する作用については不明である。そこで、LPS惹起肺損傷における可溶性CD14の役割を検討するために以下のことがらについて検討した。

(1)LPS惹起肺損傷における肺胞上皮におけるTLR4の遺伝子発現・蛋白発現について検討した。さらに、肺胞上皮のアポトーシスについても検討した。

(2)次に可溶性CD14を不活化することにより肺胞上皮細胞のTLR4の遺伝子発現、蛋白発現に与える影響について検討し、その結果、肺胞上皮細胞のアポトーシスに及ぼす変化についても調べた。

## 3. 研究の方法

LPSによる肺障害マウスの作成

(1)LPSを気管内投与し、肺障害マウスモデルを作成する。LPS投与24時間後に以下の項目を検討した。

検討項目

①TLR4遺伝子および蛋白発現のLPSによる影響

摘出肺の肺胞上皮のみをMicrodissection法を用いて、肺胞上皮細胞TLR遺伝子発現・蛋白発現を検討するために、Real Time RT-PCR法、Northern Blot法、免疫組織染色を実施した。

②組織学的検討

肺損傷と肺胞上皮のアポトーシスの関係を検討するためTUNEL染色を行った。

③肺血管透過性

肺血管透過性を<sup>131</sup>Iで標識したアルブミンを静脈内投与し、血管内から気管支肺胞洗浄液中への漏出量を測定した。

④TLRシグナリングアッセイ

マウス肺からII型肺胞上皮細胞を分離培養し、LPS添加後、蛍光酵素遺伝子に結合したNFκB反応領域(IL-8プロモータ)を用いてシグナリングを測定し、機能的影響を検証する。

⑤肺胞マクロファージの活性化と炎症性サイトカイン

マウス肺の気管支肺胞洗浄を行ない、洗浄液中のマクロファージを単離し、LPS添加6時間後に上清中のTNFをELISAで測定し、LPSによりTNFが誘導されることを検証する。

⑥アポトーシス

Bax、Bcl-2、p21、p53をRT-PCR法にて測定し、Baxを介した肺胞上皮細胞のアポトーシス誘導を検証する。

(2)抗CD14抗体のLPS惹起肺水腫に及ぼす影響

LPSによる肺障害マウスの作成

LPSを気管内投与し、肺障害マウスモデルを作成する。LPS投与直後に抗CD14抗体を気管内、または静脈内に投与し、24時間後に以下の項目を検討する。

①TLR4遺伝子および蛋白発現の影響

摘出肺を用いて、抗CD14抗体の肺胞上皮細胞TLR遺伝子発現・蛋白発現に及ぼす影響をMicrodissection法を用いて、Real Time RT-PCR法、Northern Blot法、免疫組織染色により検討した。

②組織学的検討

抗CD14抗体の肺胞上皮細胞のアポトーシスに及ぼす影響をTUNEL染色にて検討した。

③肺血管透過性

肺血管透過性を<sup>131</sup>Iで標識したアルブミンの血管内から気管支肺胞洗浄液中への漏出量を指標にして、抗CD14抗体の肺血管透過性に及ぼす影響を検討した。

④TLRシグナリングアッセイ

マウス肺からII型肺胞上皮細胞を分離培養

し、LPS添加後に、さらに抗CD14抗体を添加し、蛍光酵素遺伝子に結合したNFκB反応領域(IL-8プロモータ)を用いてシグナリングを測定した。

⑤肺胞マクロファージの活性化と炎症性サイトカイン

マウス肺の気管支肺胞洗浄を行ない、洗浄液中のマクロファージを単離し、LPS添加直後に抗CD14抗体、抗TLR4抗体を添加し、抗CD14抗体、抗TLR4抗体のTNF産生に及ぼす影響を検討した。

⑥Bax、Bcl-2、p21、p53をRT-PCR法にて測定し、Baxを介した肺胞上皮細胞のアポトーシス誘導に対する抗CD14抗体の及ぼす影響を検討した。

#### 4. 研究成果

(1)LPSによる肺障害マウスの作成

LPSを気管内投与し、肺障害マウスモデルを作成し、24時間後に以下の項目を検討した。TLR4遺伝子および蛋白発現のLPSによる影響  
摘出肺を用いて、肺胞上皮細胞TLR遺伝子発現・蛋白質発現をReal Time RT-PCR法、Northern Blot法、免疫組織染色を検討したところ、LPSにより著しく亢進した。

組織学的検討

肺障害をTUNEL染色にて肺胞上皮細胞のアポトーシスが確認された。

肺血管透過性

肺血管透過性を<sup>131</sup>Iで標識したアルブミンの血管内から気管支肺胞洗浄液中に漏出した量で肺血管透過性亢進を確認した。

TLRシグナリングアッセイ

マウス肺からII型肺胞上皮細胞を分離培養し、LPS添加後、蛍光酵素遺伝子に結合したNFκB反応領域(IL-8プロモータ)を用いてシグナリングを測定したところ増強していることが確認された。

肺胞マクロファージの活性化と炎症性サイトカイン

マウス肺の気管支肺胞洗浄を行ない、洗浄液

中のマクロファージを単離し、LPS添加6時間後に上清中のTNFをELISAで測定したところ、TNFの誘導がみられた。

アポトーシス

Bax、Bcl-2、p21、p53をRT-PCR法にて測定し、Baxを介して肺胞上皮細胞がアポトーシスを誘導されていることが確認された。

(2)LPSによる肺障害マウスの作成と抗CD抗体の影響

LPSを気管内投与し、肺障害マウスモデルを作成する。24時間後に以下の項目を検討した。TLR4遺伝子および蛋白発現の影響

LPSを気管内に投与し、24時間後に肺を摘出し、肺胞上皮細胞のTLR遺伝子発現、蛋白発現を検討したところ、いずれも亢進した。抗CD14抗体をLPS投与直後に投与するとは違法上皮細胞のTLR遺伝子発現、蛋白発現が抑制された。このことから、肺胞上皮細胞のTLR遺伝子発現は、可溶性CD14を介して促進されることが示唆された。

組織学的検討

LPSを気管内に投与し、24時間後に肺を摘出し、TUNEL染色を用いて、肺胞上皮細胞のアポトーシスを検討した。LPSの気管内投与により、肺胞上皮細胞にアポトーシスがみられた。抗CD14抗体をLPS気管内投与直後に投与し、肺胞上皮細胞のアポトーシスに及ぼす影響を検討した。抗CD14抗体の投与により、肺胞上皮細胞のアポトーシスは軽減した。このことから、LPSによる肺胞上皮のアポトーシスには可溶性CD14が関与することが考えられた。

肺血管透過性

LPS気管内投与24時間後に<sup>131</sup>Iで標識したアルブミンを静注し、1時間後に気管支肺胞洗浄を行い、1時間で血管内から気管支肺胞洗浄液中に漏出したアルブミン量で肺血管透過性を検討した。LPS投与により肺血管透過

性は亢進し、抗CD14抗体により抑制された。以上のことから、LPS 投与により可溶性 CD14 が増加する。CD14 は肺胞上皮の TLR を介してアポトーシスを誘導し、そのため肺血管から肺胞腔内への透過性が亢進すると考えられた。この障害は抗 CD14 抗体により、抑制された。

#### TLRシグナリングアッセイ

マウス肺からII型肺胞上皮細胞を分離培養し、LPS添加後、蛍光酵素遺伝子に結合したNFκB反応領域(IL-8プロモータ)を用いてTLRシグナリングを測定したところ、LPS添加24時間後に亢進がみられた。

#### 肺胞マクロファージの活性化と炎症性サイトカイン

マウス肺の気管支肺胞洗浄を行ない、洗浄液中のマクロファージを単離し、LPS添加6時間後に上清中のTNFをELISAで測定したところ、LPS添加により上清中のTNFが増加した。

#### アポトーシス

マウス肺から II 型肺胞上皮細胞を分離培養し、気管支肺胞洗浄液から回収したマクロファージを加え、Coculture した。培養液中に LPS を添加し、24 時間後に Bax、Bcl-2、p21、p53 を RT-PCR 法にて測定したところ、Bax を介した肺胞上皮細胞のアポトーシスが誘導された。

### 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 7 件)

- ① OHSAWA RUMI, MIYAZAKI HIROAKI, NIISATO NAOMI, SHIOZAKI ATSUSHI, IWASAKI YOSHINOBU, OTSUJI EIGO, MARUNAKA YOSHINORI, Intracellular Chloride Regulates Cell Proliferation Through the Activation of Stress-Activated Protein Kinases in MKN28 Human Gastric Cancer Cells Journal of Cellular Physiology, 査読有, 223, 2010,

764-770.

- ② HIRAOKA KENJI, MIYAZAKI HIROAKI, NIISATO NAOMI, IWASAKI YOSHINOBU, KAWAUCHI AKIHIRO, MIKI TSUNEHARU, MARUNAKA YOSHINORI, Chloride Ion Modulates Cell Proliferation of Human Androgen-Independent Prostatic Cancer Cell, Cellular Physiology, 査読有, 25, 2010, 379-388.
- ③ YAMADA TAKAO, TAKEMURA YOSHIKAZUMI, NIISATO NAOMI, MITSUYAMA E, IWASAKI YOSHINOBU Action of N-acetylated ambroxol derivatives on secretion of chloride ions in human airway epithelia, 査読有, 380, 2009, 586-590.
- ④ ASANO JUNJI, NIISATO NAOMI, NAKAJIMA KEN-ICHI, MIYAZAKI HIROAKI, YASUDA MAKOTO, IWASAKI YOSHINOBU, HAMA TAKEMITSU, DEJIMA KENJI, MARUNAKA YOSHINORI, Quercetin Stimulates Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> Cotransport via PTK-Dependent Mechanism in Human Airway Epithelium, 査読有, 41, 2009, 688-695.
- ⑤ HIRAMATSU ATSUSHI, IWASAKI YOSHINOBU, KOYAMA YASUNORI, TAMIYA NOBUYO, HOSOGI SHIGEKUNI, NAKANISHI MASAKI, K OHNO YOSHITOMO, UEDA MIKIO, ARIMOTO TAICHIRO, MARUNAKA YOSHINORI, Phase II trial of weekly gemcitabine and split-dose cisplatin for advanced non-small-cell lung cancer. Jpn J Clin Oncol, 査読有, 39(12): 779-83, 2009.
- ⑥ HOSOGI SHIGEKUNI, IWASAKI YOSHINOBU, YAMADA TAKAHIRO, KOMATANI-TAMIYA NOBUYO, HIRAMATSU ATSUSHI, KOHNO YOSHITOMO, UEDA MIKIO, ARIMOTO TAICHIRO, MARUNAKA YOSHINORI, Effect of inducible nitric oxide synthase on apoptosis in Candida-induced acute lung injury, 査読有, 29, 2008, 257-266.
- ⑦ MIYAZAKI HIROAKI, SHIOZAKI ATSUSHI, NIISATO NAOMI, OHSAWA RUMI, ITOI H, UEDA Y, OTSUJI EIGO, YAMAGISHI HISAKAZU, IWASAKI YOSHINOBU, NAKANO T, NAKAHARI TAKASHI, MARUNAKA YOSHINORI, Chloride ions control the G1/S cell-cycle checkpoint by regulating the expression of p21 through a p53-independent pathway in human gastric cancer cells, 査読有, 366, 2008, 7

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

岩崎 吉伸 (IWASAKI YOSHINOBU)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号: 00203373

(2)研究分担者

丸中 良典 (MARUNAKA YOSHINORI)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：00127036

新里 直美 (NIISATO NAOMI)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：00237645

有本 太一郎 (ARIMOTO TAICHIRO)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：30457865

上田 幹雄 (UEDA MIKIO)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：40457966

細木 誠之 (HOSOGI SHIGEKUNI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：30433254