

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591801

研究課題名(和文) 交感神経興奮に伴う肺血管透過性亢進機序の解明とARDS治療法の開発  
 研究課題名(英文) The mechanism of the increase of pulmonary endothelial cell permeability induced by the increased sympathetic tone and development of the new therapy for ARDS.

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

研究成果の概要(和文)：NPYの血管内皮細胞透過性亢進作用を、正常ヒト肺動脈内皮細胞の単層培養における、Transendothelial FITC-labeled albumin permeabilityの測定から検討した。NPY濃度10段階(0,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-1}$ , 1,  $10\mu\text{g/ml}$ )に対する透過性はコントロールを100%としてそれぞれ(100, 101, 102, 169, 173, 163, 172, 220, 229, 226%)であり、NPYはヒト肺血管内皮細胞の透過性を濃度依存性に亢進させた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanism of the increase of pulmonary endothelial cell permeability induced by the NPY, using transendothelial FITC-labeled albumin permeability assay.

The incubation culture plates were comprised of 2 chambers, the upper chamber utilized a porous membrane and the lower used a 24-well micro plate. HPAEC (Human Pulmonary Artery Endothelial Cells) were seeded in the intercell for 2W. The permeability of the endothelial cell monolayer was assessed by measuring the concentration of FITC-labeled albumin from the upper to the lower chamber for 60minutes. The permeability at each NPY conditions were expressed as % compared to the control condition (no NPY) at 100%. The permeability at NPY 0,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-1}$ , 1,  $10\mu\text{g/ml}$  were 100, 101, 102, 169, 173, 163, 172, 220, 229, 226% respectively. These results showed that NPY increased the permeability of the HPAEC monolayer in dose-dependent manner.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：NPY, ARDS, 肺血管透過性、肺水腫、交感神経

## 1. 研究開始当初の背景

最近まで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る神経原生肺水腫発生の機序は、

(1) くも膜下出血などの中枢神経系異常に引き続く著明な交感神経系の興奮  
(2) 引き続く血行動態変化(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障害  
(3) 透過性亢進型肺水腫発生の3段階で考えられていた(West JBらによる論文多数)。しかし我々は、neuropeptide Y: NPY(肺交感神経終末にカテコールアミンと共存) Y3 partial antagonistが神経原性肺水腫の発生を抑制すること、および神経原性肺水腫の水腫液中にNPYがELISA法によって高濃度に検出されたこと等から、第2段階には単に血行動態変化だけでなく、NPYを介した神経性調節による透過性亢進の機序も深く関与していることを明らかにしてきた。しかし、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、未だ不明であった。さらに一般的な肺水腫の透過性亢進機序との関連等も不明であった。一方、呼吸窮迫症候群(以下ARDS)等において、トロンビンが、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し、また細胞間隙複合体(adherens junction complex)の燐酸化が細胞間隙の変形を引き起こし、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た(Am J Physiol 284:L972-L980, 2003)。従って、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が十分に考えられる。さらにARDS等においても、その血管透過性亢進にNPYが関与している可能性も充分考えられる。上記機序による血管透過性亢進に関して、神経原性肺水腫やNPYとの関連においては研究がなされておらず、我々が唯一の研究グループである。

また、近年、NPYが、Y1, Y2受容体を介して細胞増殖を誘発させることが他の研究グループから報告されており、血管透過性と深く関連する可能性も示唆されている。

これまでの研究成果

神経付き肺灌流標本において、交感神経の電気刺激が肺血管透過性の亢進を惹起し、その透過性亢進は $\alpha$ ブロッカーやカテコールアミン枯渇剤であるreserpineによっても完全には消失しないことを示した(Am. Rev. Resp. Dis. 145: 685-92, 1992)。そこで、交感神経をはじめ自律神経系などに存在するsubstance Pを含めたペプチド性神経伝達物質について血管透過性を亢

進させる候補を検討した結果、交感神経終末にノルエピネフリンと共存するneuropeptide Y (NPY)が強い透過性の亢進を惹起させることが分かり、NPYの肺血管透過性亢進作用を世界で初めて実証し、この分野で世界をリードしてきた(Eur. J. Pharmacol. 259: 227-30, 1994.; Eur. J. Pharmacol. 296: 297-305, 1996)。

さらに、6個のNPY受容体サブタイプのうち、Y<sub>3</sub>-受容体が関与することも示した。そこで、実際に肺水腫モデルで水腫液中のNPY含有量を測定してみたところ、特に第4脳室内にフィブリンを投与すると生じる神経原性肺水腫(Am. Rev. Resp. Dis. 140: 652-8, 1989)では明らかに高濃度のNPYがELISA法により検出された(Critical Care Medicine 29: 1222-1228, 2001)。中枢神経系でのNOの神経原性肺水腫発生に対する重要な役割について、左側迷走神経切断が2週間後に同側の孤束核におけるbNOSを増加させて、神経原性肺水腫の発生を抑制した可能性を示し(Auton Neurosci. 29;102(1-2):1-7, 2002)、また第4脳室内に投与されたL-glutamateと神経原性肺水腫発生機序との関連を報告した(Eur J Pharmacol 24;499(3):257-63, 2004)。以上についての判りやすい総説として、和文の著書を分担執筆した(別冊医学の歩み ARDSのすべて 医歯薬出版社 P182-186, 2004、SIRSの病態と治療 I ALI/ARDS 医薬ジャーナル社 P220-226, 2004)。

フィブリン肺水腫の発生が全身麻酔薬の種類によって修飾されることを報告した(Anesthesiology 102(6):1182-9, 2005)。さらに、ラット大動脈内皮細胞培養株単層においてNPYは低酸素状態で透過性を亢進させることを明らかとし(Am J Physiol Heart Circ Physiol 286(3):H1027-33, 2004)、細胞レベルでの血管透過性機序解明の実験に着手した。

## 2. 研究の目的

ヒトの肺血管内皮細胞の単層培養を用いて、Transendothelial FITC-labeled albumin permeabilityの測定を用いて、NPYの透過性に対する作用を細胞レベルで検討する。

NPYの細胞増殖作用を、NPY-Y3以外の受容体アゴニストであるPeptide YY(PYY)、NPY-Y3受容体アンタゴニストであるNPY(18-36)を用いて、NPY-Y3受容体を介したものであるかどうかを通常の酸素状態と低酸素状態で検討する。(血管透過性亢進はNPY-Y3受容体を介した反応であるので) さらに、その細胞内伝達系を解明し、ARDSにおける透過性亢

進ならびに細胞増殖との関連を明らかにする。

### 3. 研究の方法

ヒトの肺血管内皮細胞の単層培養を用いて、Transendothelial FITC-labeled albumin permeability の測定から、NPY の肺血管内皮細胞透過性に対する影響を調べる。

#### ■細胞種■

正常ヒト肺動脈内皮細胞  
(Normal Human Pulmonary Artery Endothelial Cells : HPAEC)

#### ■培養法■

細胞を起こす (細胞数: 約  $2 \times 10^5$  個/8ml/10cm シャーレ)

↓  
インキュベーター内で培養 (37 度, CO<sub>2</sub> 5%)

↓  
2-3 日に 1 回培養液を交換

↓  
(事前に継代用のインターセルを 24 穴プレートにセットし、セル内にコラーゲンタイプ IV50  $\mu$ l をコーティングし、2-3 日乾燥させておく)

↓  
1 週間後 細胞が十分に増殖した後、細胞数カウント

↓  
継代 (細胞数: 約  $4 \times 10^5$  個/400  $\mu$ l/インターセル) になるよう調整

↓  
インキュベーター内で培養 (37 度, CO<sub>2</sub> 5%)

↓  
2-3 日に 1 回培養液を交換

↓  
2 週間後 薬剤添加, Alb 透過性測定を行う  
■添加薬剤■ Neuropeptide Y (略称: NPY)  
(Human, Rat, Mouse)

■測定試薬■ Albumin, 標識 Albumin  
NPY 原液を超純水で段階希釈し、異なる濃度の希釈液を作成

(原液: 200  $\mu$ g/ml, 希釈液濃度:  $10^{-3}/10^{-2}/10^{-1}/1/10 \mu$ g/ml)

#### ■測定法■

インターセル内の培養液を除去

↓  
1%の標識 Alb 270  $\mu$ l をセル内に添加

↓  
1%の Alb 1000  $\mu$ l をセル外に添加

↓  
コントロール用の超純水, NPY 希釈液 30  $\mu$ l を各々上槽に添加

↓  
インキュベーター内で 60 分間透過

↓  
60 分後 セル外の液を 100  $\mu$ l とり、5 倍に超純水で希釈

↓  
上記溶液を 96 穴プレートに 200  $\mu$ l ずつ注入  
↓  
蛍光プレートリーダーにて標識 Alb 吸光度を測定 波長 492nm

### 4. 研究成果

NPY 濃度	透過性 (%)
0	100
$10^{-7} \mu$ g/ml	101
$10^{-6} \mu$ g/ml	102
$10^{-5} \mu$ g/ml	169
$10^{-4} \mu$ g/ml	173
$10^{-3} \mu$ g/ml	163
$10^{-2} \mu$ g/ml	172
$10^{-1} \mu$ g/ml	220
1 $\mu$ g/ml	229
10 $\mu$ g/ml	226

この結果から、NPY は、ヒト肺血管内皮細胞の透過性を濃度依存性に亢進させることが判明した。神経原性肺水腫の発症メカニズムとして、NPY が肺血管内皮細胞に直接作用してその透過性を亢進させることが、一つの作用機序として推察された。

### 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 西脇公俊、島田康弘: 神経原性肺水腫と神経性肺血管透過性調節. 別冊・医学のあゆみ 最新 ARDS のすべて P200-205, 2010 査読有

② 西脇公俊: 綜説 神経原性肺水腫. 現代医学、56(3):469-475, 2009 査読有

③ 西脇公俊、石川直久: 神経原性肺水腫. 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ 呼吸器症候群 (第 2 版) その他の呼吸器疾患を含めて II、9:234-239, 2009 査読有

[学会発表] (計 3 件)

① 鈴木章悟、江間義朗、金碧年、西脇公俊、島田康弘: ヒト肺動脈内皮細胞単層膜のアルブミン透過性に対する麻酔薬の影響、日本麻酔科学会 2008. 6. 12 横浜

②Ema Y, Suzuki S, Nan Y, Nishiwaki K, Shimada Y: The mechanism of the isoflurane-induced increase of Endothelial cell permeability. Annual meeting of American Society of Anesthesiologists 2008.10.20 Orland USA

③Suzuki S, Nan Y-S, Ema Y, Nishiwaki K, Shimada Y : Effects of isoflurane, sevoflurane and propofol on monolayer permeability in HPAECs. Annual meeting of American Society of Anesthesiologists 2008.10.20 Orland USA

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西脇 公俊 (NISHIWAKI KIMITOSHI)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：10189326

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし