

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：2021～2023

課題番号：21K16575

研究課題名（和文）「制御されたネクロシス」を標的とした人工呼吸誘導性臓器障害の予防法開発に向けて

研究課題名（英文）Basic research to prevent ventilator-induced organ failure targeting "regulated necrosis".

研究代表者

玉田 尚（TAMADA, Nao）

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：70439181

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、人工呼吸によるARDS肺胞上皮細胞死の「制御されたネクロシス」増強から遠隔臓器障害惹起と悪循環形成までの流れを検証し、「制御されたネクロシス」の阻害剤が肺と遠隔臓器障害を抑制するかを検討することであった。高容量換気がARDS肺において低容量肺保護換気よりもネクロシスをさらに進行させ肺傷害を増強することは明らかにしたが、高容量換気が「制御されたネクロシス」を増強するかについては、実行因子が低容量保護換気との比較で有意差を認めなかったため、人工呼吸開始前の「制御されたネクロシス」を標的とした阻害剤が肺と遠隔臓器の障害を抑制するかを検討するまでに至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ARDS肺において高容量換気が肺胞上皮細胞のネクロシスは進行させるものの、「制御されたネクロシス」の関与を証明できなかったため課題が残る結果となったが、別経路でネクロシスを進行させている可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to investigate whether artificial ventilation enhances the "regulated necrosis" of alveolar epithelial cell death in ARDS and induces distant organ damage and dysfunction. Furthermore, the aim was to examine whether inhibitors targeting "regulated necrosis" would suppress damage to the lungs and distant organs. High tidal volume ventilation induces apoptosis in alveolar epithelial cells in healthy lungs, but necrosis in alveolar epithelial cells in ARDS lungs. High tidal volume ventilation further promoted necrosis of alveolar epithelial cells and enhances lung injury than low tidal volume ventilation in ARDS lungs. However, high tidal volume ventilation did not further enhance "regulated necrosis." Therefore, we have been unable to examine whether inhibitors targeting "regulated necrosis" suppress damage to the lungs and distant organs.

研究分野：救急医学・集中治療医学

キーワード：ARDS VILI ネクロシス アポトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人工呼吸はARDS患者の救命に欠かせない一方、肺組織を傷害し、さらに全身の遠隔臓器障害を惹起する“諸刃の剣”でもある。低容量肺保護換気の推奨により、以前ほどの弊害は生じなくなったが、全身臓器への侵襲があることを動物実験、臨床研究とも示している。

これまでの研究で、高容量換気などの侵襲的な人工呼吸による機械的刺激などが肺の炎症細胞や肺胞上皮細胞を活性化し、サイトカインを産生することが明らかとなっている (Tremblay LN, et al. Crit Care Med. 2002)。また、高容量換気が FasL-Fas 経路を介したアポトーシスを遠隔臓器に誘導していることも報告されている (Imai Y, et al. JAMA. 2003)。さらには低容量肺保護換気が高容量換気に比して血中のサイトカイン濃度や臓器不全合併が有意に低下した ARMA study から、人工呼吸で傷害された肺から放出されたサイトカインにより、肺および遠隔臓器障害が惹起される可能性が指摘されている (The acute respiratory distress syndrome network. N Engl J Med. 2000)。しかしながら現在まで、抗炎症療法は思うような効果を挙げられていない。そこで炎症そのものを一概に抑えるのではなく、炎症による組織傷害がさらに炎症を増幅して傷害が過大となる、「炎症の悪循環プロセス」を制御することを考えた。

ネクローシスを伴う組織傷害では細胞膜の破綻に伴い HMGB-1 や mitDNA などの DAMPs 放出により炎症を増幅するため、上記の悪循環プロセスに関与している可能性がある。ネクローシスはアポトーシスとは異なり制御不可能な細胞死と考えられてきたが、近年、特定の分子機構により実行される「制御されたネクローシス」の存在が報告され、これを標的とした治療介入の可能性がでてきた。「制御されたネクローシス」に対するさまざまな阻害剤も開発されており (Conrad, et al. Nat Rev Drug Discov. 2016)、ヒトARDSに対する治療応用も期待される。人工呼吸はARDSだけでなく、重症患者、手術患者等多くの患者に使用されており、それに伴う臓器障害の予防法の開発は非常に大きな意義を持つと考えられる。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究は人工呼吸によるARDS肺胞上皮細胞死の「制御されたネクローシス」増強から遠隔臓器障害惹起と悪循環形成までの流れを検証したうえで、人工呼吸開始前の「制御されたネクローシス」を標的とした阻害剤が肺と遠隔臓器の障害を抑制するかを検討し、その介入標的としての概念実証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ARDS 下人工呼吸モデルにおける肺胞上皮細胞の「制御されたネクローシス」の解析

肺炎に伴うARDSに近いとされるLPS経気管投与ARDSモデルをC57BL6Jマウスで作製したモデルに人工呼吸を施行することで実際の臨床に近い状況を作りだし、「制御されたネクローシス」を介して人工呼吸が肺胞上皮細胞傷害をさらに増強するか検討した。

人工呼吸がARDS肺組織に与える傷害の評価

LPS (25 μ g) 経気管投与で24時間後に人工呼吸を6時間施行し、動脈血液ガス分析や気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の炎症性メディエーター (好中球数, MPO, RAGE, TNF- α 等) やタンパク濃度の定量を行うことで肺傷害の程度を評価した。人工呼吸は、(a)低容量肺保護換気群 (LTV: 1回換気量 10 ml/kg, PEEP 5 cmH₂O, リクルートメント操作あり)、(b)高容量換気群 (HTV: 1回換気量 40 ml/kg, PEEP 0 cmH₂O, リクルートメント操作なし) に分け、呼吸器条件の違いによる肺傷害の増強程度を評価した。尚、1回換気量の設定であるが、ヒトとマウスの特性の違いを考慮し、上記の設定とした (Wilson MR, et al. Crit Care Med. 2012)。

人工呼吸が肺胞上皮細胞のネクローシスに与える影響の評価

呼吸器条件の違いによる肺胞上皮細胞のネクローシスの修飾増強程度を明らかにするために、BALF中のサイトケラチン18 (CK18) フラグメントの定量を行った。CK18は上皮細胞を構成する骨格タンパクで、アポトーシスでは分断されるが、ネクローシスでは分断されず、そのまま細胞外に放出される。ELISAにより、分断されたフラグメントはM30として、そのままのCK18はM65として検出されることから、これらの比を見ることでアポトーシス、ネクローシスのどちらが誘導されているか判断できる。

人工呼吸の「制御されたネクローシス」の増強効果の評価

人工呼吸が増強する肺胞上皮細胞のネクローシスが「制御されたネクローシス」によるものかを探るべく、細胞死研究においてその解明が進んでいる、ネクロプトーシス、パイロプトーシスに対象を絞り、肺組織中のそれらの実行タンパク (ネクロプトーシス: MLKL, パイロプトーシス: N-GSDMD) のウエスタンブロッティング (WB) による定量を行った。

(2) 人工呼吸で増強された「制御されたネクローシス」による肺・遠隔臓器障害の検討

人工呼吸により増強された「制御されたネクローシス」により、肺胞上皮細胞から放出されたDAMPsが肺や遠隔臓器に障害を引き起こすのかどうかを検討する計画を立てたが、以下に示す結果より実行できなかった。

(3)制御されたネクローシスに対する介入による臓器障害抑制効果の検討

(1)で同定した「制御されたネクローシス」に対する阻害剤を人工呼吸 ARDS マウスに人工呼吸開始前に経気管的に投与し、上記(1),(2)の方法を用いて、人工呼吸により増強される肺および遠隔臓器障害を予防できるのかを明らかにする計画を立てたが、以下に示す結果より実行できなかった。

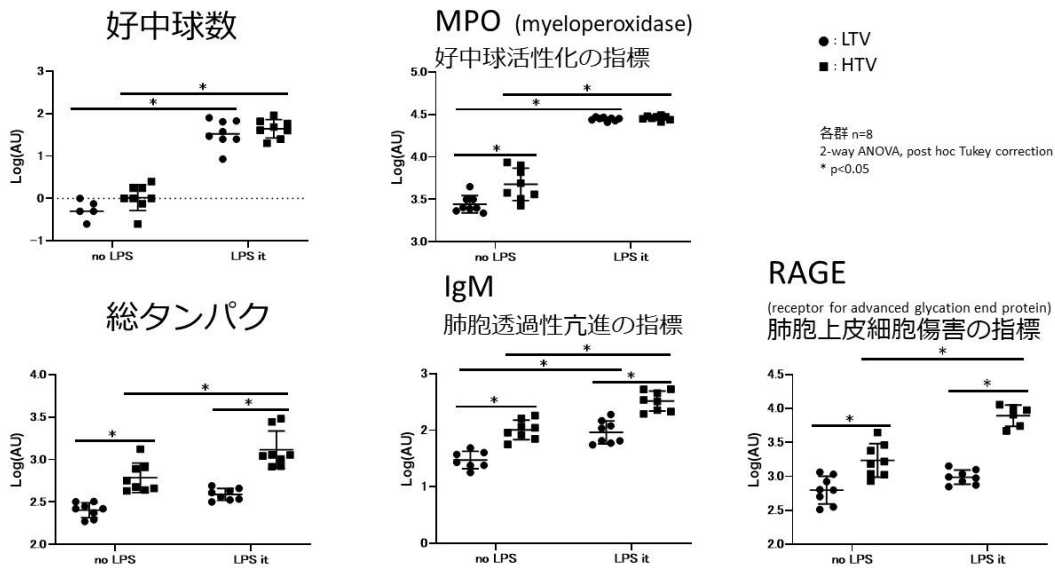
4. 研究成果

(1)ARDS 下人工呼吸モデルにおける肺胞上皮細胞の「制御されたネクローシス」の解析

人工呼吸が ARDS 肺組織に与える傷害の評価

BALF 中の炎症性メディエーターの推移であるが、好中球数や好中球活性を示す MPO は、LPS の投与により上昇するが、人工呼吸条件で修飾されなかった。しかしながら、肺胞上皮細胞傷害の指標である RAGE や、肺胞透過性亢進の指標であるタンパク、IgM は LTV に比べ HTV で有意に上昇していた。また、HTV は LPS による傷害を増強した。以上より、HTV は肺に対して傷害を与えるが、ARDS における傷害をさらに増悪させることが示唆された。

研究成果 (1) - ① 人工呼吸がARDS肺組織に与える傷害

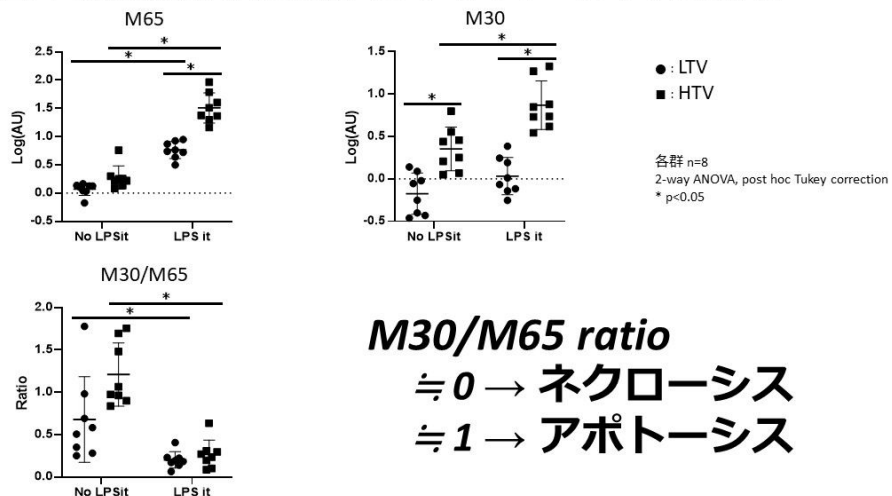


人工呼吸が肺胞上皮細胞のネクローシスに与える影響の評価

BALF 中の CK18 フラグメントの定量であるが、全細胞死の指標となる M65 は LPS 非投与下では、LTV と HTV で有意な変化はなかったが、LPS 投与下では、HTV において有意に M65 が上昇し、LPS による傷害を増強させた。一方、アポトーシスの指標となる M30 は LPS 投与、非投与にかかわらず HTV にて有意に上昇した。M30/M65 は 1 に近づくにつれ、細胞死の中心がアポトーシスであること示すが、HTV は LPS 非投与下では、アポトーシスを誘導するが、LPS 投与下ではネクローシスを誘導した。HTV が元々の肺の状態により、異なった細胞死を誘導することが示唆された。

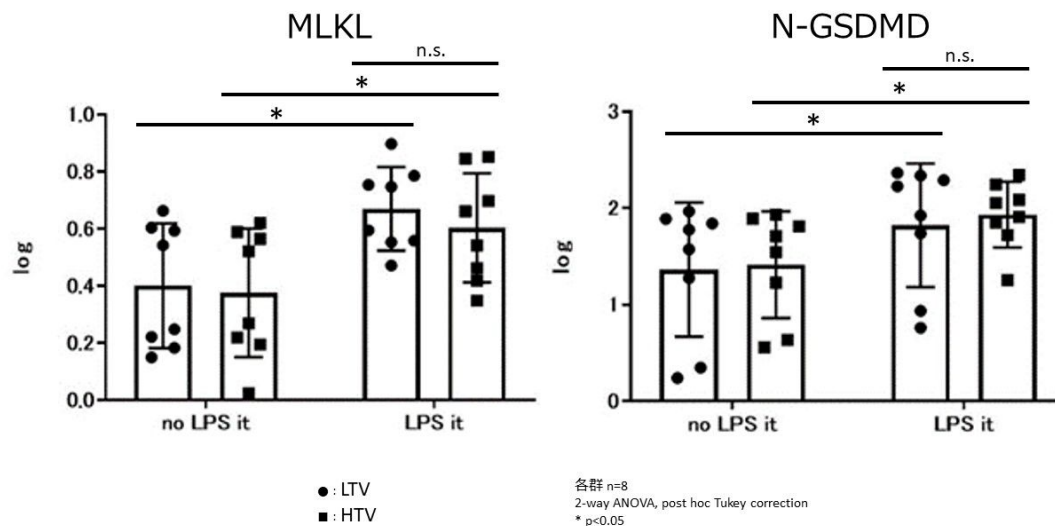
研究成果 (1) - ② 人工呼吸が肺胞上皮細胞のネクローシスに与える影響

高容量換気はARDS肺にネクローシスを誘導



人工呼吸の「制御されたネクローシス」の増強効果の評価
 MLKL, N-GSDMD の WB による定量だが, LPS 非投与群に対して LPS 投与群では有意に両者とも増加していたが, LTV と HTV の間では, LPS 投与に関わらず有意差は認めなかった。

研究成果 (1) - ③人工呼吸と「制御されたネクローシス」の関係



ARDS 肺において, 低容量肺保護換気と比較し高容量換気はネクローシスを増強することは見いだせたが, 「制御されたネクローシス」が誘導され肺傷害が増強されることについては予想と異なる結果となってしまった。研究代表者の研究計画能力, 遂行能力不足も相まって, 別方法によるさらなる検討が行えないまま, 研究期間が終了してしまった。しかしながら, 高容量換気が「制御されたネクローシス」を介さない経路で ARDS においてネクローシスを進行させている可能性が示唆されたことから, その解明が必要だと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tojo Kentaro, Yamamoto Natsuhiko, Tamada Nao, Mihara Takahiro, Abe Miyo, Nishii Mototsugu, Takeuchi Ichiro, Goto Takahisa	4. 巻 26
2. 論文標題 Early alveolar epithelial cell necrosis is a potential driver of COVID-19-induced acute respiratory distress syndrome	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105748 ~ 105748
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2022.105748	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 東條 健太郎, 山本 夏啓, 玉田 尚, 水原 敬洋, 阿部 美蓉, 後藤 隆久
2. 発表標題 COVID-19によるARDSにおける肺胞上皮細胞死機構と抗DAMPs治療の可能性の検討
3. 学会等名 第49回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------