

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月30日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590854

研究課題名（和文）LPS プライミング後 LPS、BLM 再投与肺損傷の病態解析

研究課題名（英文）The pathophysiology of intratracheal LPS or BLM lung injury mice model after LPS-priming

研究代表者

津島 健司（TSUSHIMA KENJI）

信州大学・医学部・委嘱講師

研究者番号：60372512

研究成果の概要（和文）：LPS 肺損傷モデルマウスを用いて、LPS プライミングの病態に関して検討した。プライミングマウスでは IL-10 の産生亢進が見られ、肺胞マクロファージを消失させると、効果はなくなった。炎症性サイトカインである TNF- α の産生低下と IL-10 産生亢進も見られなくなることから、LPS プライミングを受けた肺胞マクロファージが、肺損傷からの修復に重要な働きを持っていた。IL-10 ノックアウトマウスでは、LPS プライミング効果は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：To examine potential roles for alveolar macrophages (AM) in the priming response in model of acute lung injury (ALI), primed WT mice were treated with C12MDP-liposome (depleted primed AM) on day -3 followed by IT. By day 5, the non-depleted primed group exhibited reduced bronchoalveolar lavage (BAL) protein and BAL cells compared to depleted primed AM group. Lung histology revealed nearly complete resolution of injury on day 5 in non-AM-depleted primed group; interstitial thickening and lung consolidation persisted in the AM-depleted primed group. Flow cytometry revealed that at day 0 over 90% of AMs were depleted in the C12MDP-liposome treated group. BAL tumor necrosis factor- α was lower on day 1 and was higher on day 5 in depleted primed AM group compared to non-depleted primed AM group while BAL IL-10 was higher in non-depleted primed AM group on day 1 after LPS. In contrast to primed WT mice, IL-10-null mice did not exhibit accelerated resolution of lung injury with priming. These studies implicate AM-derived IL-10 in the accelerated resolution of ALI produced by LPS priming. Definition of mechanisms related to priming could provide important insights into potential new therapies for ALI.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
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：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：LPS 肺損傷、LPS プライミング、ブレオマイシン

1. 研究開始当初の背景

Acute lung injury/acute respiratory

distress syndrome (ALI/ARDS) の病態に関し

での知見は、マウスモデルをもとにして、多くのことが得られてきている。しかし、臨床の現場として、Randomized controlled trial (RCT) による十分な evidence を獲得した治療法は、2000年にARDS NETWORKがN Engl J Med に発表した Low tidal volume strategy しか出てきていない。現実的に臨床では肺保護的な呼吸管理や原因疾患に対する治療を行い、肺損傷が自然に収束するのを見守るほかないのが現状で、積極的なアプローチをするような薬剤は今のところ見られない。日本では、好中球エラスターゼ阻害薬（商品名エラスポール）が、上記患者に対して保険適応とされているが、ヨーロッパにおけるRCTにて、有意差を得ることができなかつたため、世界的に認められた薬剤という範疇にはいたっていない。

最近のアメリカ統計では年間約190,000名の新たなALI/ARDS患者が見られ、その死亡者数は74,500名となっている。病院内での死亡率は、ALIは38.5%、ARDSにおいては41.1%となっている。その原因は、直接的な障害〔肺炎〕と間接的な障害〔敗血症〕とに大きく分けられ、発症の基本病態は異にしている。動物モデルをもとにして、急性期の病態に関して、つまり、ALI/ARDSの患者はなぜ、肺炎や敗血症から肺損傷へと進行してしまったのかに関しては多くの知見が与えられているが、修復へと至る本質的に大事な決定因子は何かに関しての治験はわずかしかない。炎症からの修復は、単なる炎症産物や因子からの開放ではなく、好中球のアポトーシス、間質や肺胞構造の再構築、肺胞内へと浸出した浮腫液の再吸収、そして急性期に生じたさまざまなシグナルから来る応答など (Ware, 2000) おそらくは、プログラムされたひとつの過程が存在していると申請者は信じている。

2. 研究の目的

エンドトキシン (LPS) プライミング後の LPS 気管内再投与肺損傷モデルの肺胞マクロファージ、樹状細胞の subtype に着目して病態を解明する。LPS プライミング後の肺胞マクロファージ耐性は、Toll like receptor (TLR) に関して検討がなされてきた。われわれは、LPS 後、肺胞マクロファージが naïve な状態とは異なる subtype を示すことに着目し、肺胞マクロファージ、樹状細胞の相互作用や抗炎症性サイトカイン産生と関連させて検討する。また、LPS プライミングがブレオマイシン (BLM) 肺損傷にも有効であることを示し、将来的に、当院にて、がん患者に施行している樹状細胞免疫療法を急性肺損傷ないしは特発性肺線維症急性増悪患者へ応用したい。

3. 研究の方法

C57BL/6 マウスに対して、ペントバルビタール麻酔下に day -8 に 50・L の LPS (2.5・g/・1) (LPS プライミング群) あるいは同量の滅菌水 (非プライミング群) をコントロールとして気管内投与する。day 0 に、LPS (2.5・g/・1) を再度気管内投与し、day 1, day 3, day 5 で、マウスを解剖し、肺胞洗浄液 (BAL)、肺組織を得る。炎症評価の指標として、肺組織学的所見、BAL 内の総細胞数、分画、総蛋白、TNF・、TGF・、MIP-2、Mac1、IL12、IL10 を測定し、両群を比較する。BAL は、好中球アポトーシス (Annexin V-7AAD)、好中球、肺胞マクロファージ活性酸素 (ROS) (DCF 法) や肺胞マクロファージ (F4/80, CD11c, CD11b) あるいは樹状細胞 (F4/80, CD11c) の subtype をフローサイトメトリーにより検討する。

肺胞マクロファージの機能解析には、サイトカインの産生能、ROS そして貪食能を確認する。肺組織は HE 染色や免疫染色だけでな

く、western blot にも利用する。特に、アポトーシス関連蛋白である caspase family や内皮細胞のアポトーシス、ICAM1、トロモボモジュリンの発現との関連を検討する。これを、各 d1, d3, d5 そして d0 の BAL 細胞分画に関して、上記の FACS を使用して病態を把握する。とくに、LPS プライミング後の肺病態を把握する上で重要なのは、d0 の肺内の状態であるとおもわれる。これに関しては、マクロファージおよびリンパ球の subtype に関して検討を行い、非プライミング群と変化があるようならば、各 subpopulation の肺胞マクロファージ細胞を sorting で回収し、in vitro で LPS 刺激を行うことで産生する炎症性サイトカイン(TNF \cdot , IL1 \cdot , IL12)そして抗炎症性サイトカイン(TGF \cdot , IL10)を測定する。トロンボモジュリンや HMGB1 などの発現および LPS のトロンボモジュリンの結合の違いに変化が生じているかにつき western blot により解析をおこなう。

肺胞マクロファージにおいては、樹状細胞も含まれてくるため、その subtype の解析には注意を要する。現時点では、樹状細胞に関して多くの治験が得られており、その同定法は複雑なのでわれわれは古典的な鑑別方法である CD11c, CD11b, HLA Class II, F4/80, B220 を用いる。

4. 研究成果

LPS プライミングを受けたマウスは、LPS による気管内再投与刺激に対して、肺損傷からの回復が通常マウスに比べて早期に認められ(図 1、2)、また、高濃度 LPS に対して抵抗性を示すことが知られているが、その機序はいまだ不明である。われわれは炎症を惹起する肺胞マクロファージの subtype に着目してその機序を明らかにしようとした。

LPS プライミング群に LPS 気管内再投与した所見で、マウス肺胞洗浄液のマクロファージ

は CD11b^{high}CD11c^{high}, CD11b^{low}CD11c^{high}, CD11b^{high}CD11c^{low} という subtype を示した。Naïve な状態では CD11b^{low}CD11c^{high} が主な population である。このように、LPS プライミング後にもマクロファージの subtype が異なっていた。また、LPS 再投与による BAL 中好中球のアポトーシスはプライミングで亢進していた。この現象を説明するために多くのノックアウトマウスを使用して、その理由を探した。その結果、IL10 ノックアウトマウスでは LPS によるプライミングが認められないため IL10 が関与する可能性がわかった(図 3)。この肺胞マクロファージをクロドロネイトにより LPS 再投与前に肺内よりなくすると、プライミングの効果は消失した(図 4、5)。ここの細胞が持つサイトカインを確認するとプライミング群は IL10 の産生が亢進し、TNF α の産生低下を示した(図 6)。

IL10 ノックアウトマウスを使用すると、やはり LPS プライミング現象は認められなかった(図 7)。BAL 中好中球のアポトーシスはプライミング群、非プライミング群で差を認めず、ある subtype 群の肺胞マクロファージから IL10 が産生亢進され、IL10 産生肺胞マクロファージが肺損傷の収束に関与している可能性が分かった。

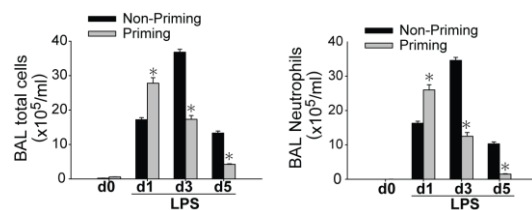


図 1

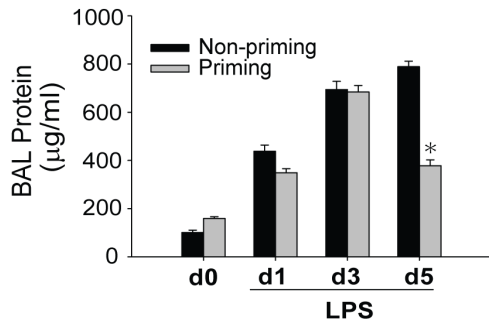


図 2

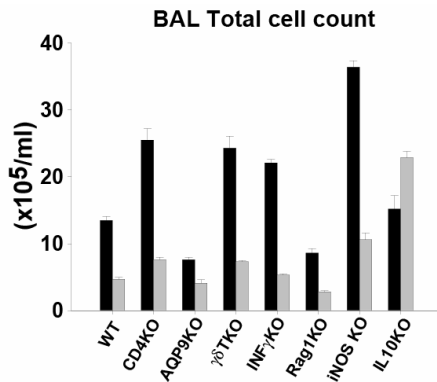
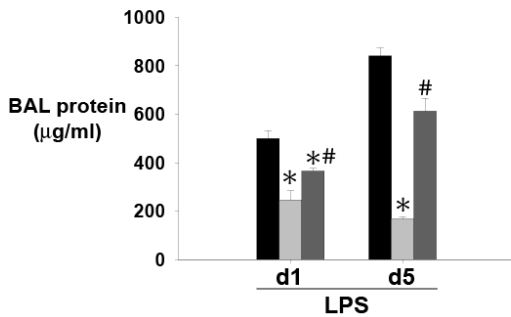


図 3



■ Non-primed
 ■ Primed LPS+Non-depleted AMs
 ■ Primed LPS+Depleted AMs

図 4

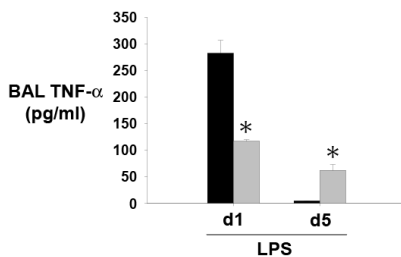


図 5

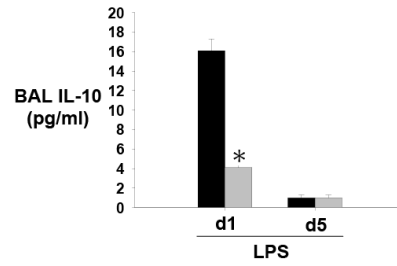


図 6

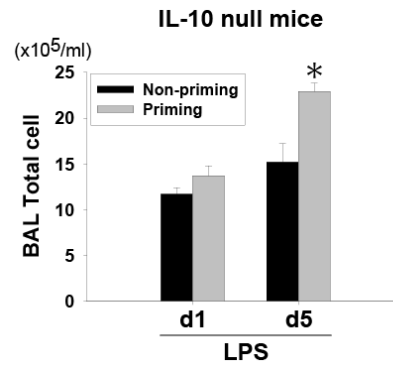


図 7

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 10 件)

(1) Komatsu Y, Yamamoto H, Tsushima K, et al. Increased interleukin-8 in epithelial lining fluid of collapsed lungs during one-lung ventilation for thoracotomy. *Inflammation*. 2012;35:1844-1850. 査読あり doi: 10.1007/s10753-012-9505-y.

(2) Kobayashi T, Koizumi T, Agatsuma T, Yasuo M, Tsushima K, et al. A phase II trial of erlotinib in patients with EGFR wild-type advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2012;69:1241-1246. 査読あり doi: 10.1007/s00280-012-1831-0.

(3) Yokoyama T, Tsushima K, Yamamoto H, Koizumi T, Kubo K. Potential benefits of early continuous positive pressure ventilation in patients with rapidly progressive interstitial pneumonia.

Respirology. 2012;17:315-321. 査読あり
doi: 10.1111/j.1440-1843.2011.02051.x.

(4) Tsushima K, D' Alessio F, et al.
Resolution of experimental lung injury by
monocyte-derived inducible nitric oxide
synthase. J Immunol. 2012;189:2234-2245.
査読あり doi: 10.4049/jimmunol.

(5) Tsushima K, Yokoyama T, et al. Elevated
IgG4 Levels in Patients Demonstrating
Sarcoidosis-Like Radiologic Findings.
Medicine (Baltimore). 2011;90(3):194-200.
査読あり
doi:10.1097/MD.0b013e31821ce0c8.

(6) Yamamoto H, Suzuki T, Yasuo M,
Kobayashi O, Tsushima K, et al.
IgG4-Related Pleural Disease Diagnosed by
a Re-Evaluation of Chronic Bilateral
Pleuritis in a Patient Who Experienced
Occasional Acute Left Bacterial Pleuritis.
Intern Med. 査読あり 2011;50:893-7.

(7) Tanabe T, Kanoh S, Tsushima K, et al.
Clarithromycin Inhibits
Interleukin-13-Induced Goblet Cell
Hyperplasia in Human Airway Cells. Am J
Respir Cell Mol Biol. 2011 Jun 3. 1075-1083.
査読あり doi: 10.1165/rcmb.2010-03270C

(8) Matsubara M, Koizumi T, Ushiki A,
Yokoyama T, Yasuo M, Tsushima K, et al. An
assessment by In Situ Hybridization method
for pathogens of severe respiratory
infection. 査読あり Shinshu Med J 2011;
59: 223-8.

(9) Kobayashi T, Koizumi T, Yasuo M,
Tsushima K, et al. Phase II trial of
biweekly paclitaxel and gemcitabine as
second-line chemotherapy for non-small
cell lung cancer previously treated with
platinum-based chemotherapy. 査読あり

Shinshu Med J 2011; 59: 411-8.

[学会発表] (計 5 件)

- ① Tsushima K, et al. Elevated IgG4 levels
in patients demonstrating
sarcoidosis-like radiological
findings. American Thoracic Society
2012. 5. 21. San Francisco. USA
- ② 津島健司 第 3 回セミナー ALI/ARDS
抗凝固療法 日本集中治療医学会 関東
甲信越地方会 2010. 8. 28. 東京
- ③ 津島健司 Occupational lung disease
in Japan: Hypersensitivity
pneumonitis due to mushroom spores 箱
根呼吸討論会 2010. 6. 14. 千葉
- ④ Tsushima K, et al. L-10 produced by
alveolar macrophages plays a critical
role in accelerated resolution of lung
injury by LPS priming. American
Thoracic Society, 2010, May 18, New
Orleans. USA.
- ⑤ 津島健司 シンポジウム ALI/ARDS 薬物
療法の嚴重と将来 抗凝固療法 日本呼
吸器学会 2010. 4. 24. 京都

[図書] (計 3 件)

- ① 津島健司 病気と薬 パーフェクトブッ
ク 池田宇一 横田千津子 大越教夫編
気管支拡張症・びまん性汎細気管支炎
南山堂 2012; P350-354
- ② 横山俊樹、津島健司 徹底ガイド DIC
のすべて 総合医学社 2010;
P1542-1546
- ③ 津島健司 最新 ARDS のすべて 医歯薬出
版株式会社 2010; P13-P18, P319-322

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津島 健司 (TSUSHIMA KENJI)
信州大学・医学部・委嘱講師
研究者番号: 60372512

(2)研究分担者

横山 俊樹 (YOKOYAMA TOSHIKI)

信州大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20467161

(3)連携研究者

()

研究者番号：