

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861731

研究課題名(和文) PEEPによる人工呼吸誘発肺障害抑制メカニズムの機序解明

研究課題名(英文) Suppression of IL-6 gene and protein expression by PEEP-like stretching of human pulmonary artery endothelial cells

研究代表者

小林 こず恵 (KOBAYASHI, KOZUE)

北里大学・医療衛生学部・助教

研究者番号：60448975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：人工呼吸誘発肺傷害(VILI)の予防を最終目標とし、肺動脈血管内皮細胞を用いて伸展実験(過伸展模擬ひずみ+PEEP)を行い、伸展とIL-6遺伝子発現量あるいはIL-6タンパク質産生量の時系列計測を行った。PEEPを加えることによって肺の過伸展時のIL-6タンパク質産生量、IL-6遺伝子発現を抑制できる可能性がある。さらに、このときのPEEPは実ひずみを減らすことでIL-6タンパク質産生量、IL-6遺伝子発現を減少させたこと、PEEP自体にIL-6タンパク質産生量、IL-6遺伝子発現の抑制効果の2つの役割があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The time courses of interleukin (IL)-6 gene expression and protein production were examined in human pulmonary artery endothelial cells (HPAECs) subjected to stretching comprising excessive elongation and slight elongation (excessive plus PEEP-like stretching). The findings that the peak value of IL-6 gene expression induced by excessive plus PEEP-like stretching was lower than that induced by excessive stretching, and that expression of the protein was suppressed by excessive plus PEEP-like stretching, suggest that PEEP-like stretching reduces IL-6 gene expression and that the small degree of IL-6 gene induction is insufficient for synthesis of IL-6 protein. Thus, PEEP-like cyclic stretching suppresses the expression of both the IL-6 gene and protein.

研究分野：細胞情報工学

キーワード：VILI 遺伝子発現解析 伸展刺激 PEEP

1. 研究開始当初の背景

呼吸器疾患や開胸手術などの後に人工呼吸器を装着した患者で呼吸状態が悪化するケースがある。人工呼吸下の病態は患者に大きく依存するので、現在、最適な人工呼吸の設定が困難な場合がある。人工呼吸下の病態は個々の患者に大きく依存するので、現在、最適な人工呼吸の設定が困難な場合がある。

人工呼吸は呼吸器疾患治療および麻酔下あるいは術後の呼吸管理にきわめて有用であるが、人工呼吸による肺の過伸展(過膨張)が、肺障害(ventilator-induced lung injury: VILI)を起こす場合があることがわかっている。Slutsky ら(Slutsky et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med, 1998)は、人工呼吸が肺障害を引き起こすだけでなく、全身性に臓器障害をもたらすという biotrauma 理論を唱えた。この理論によれば、人工呼吸による刺激によって、肺で炎症性サイトカインなど様々な物質が産生、活性化され、肺だけではなく全身の臓器までもが炎症反応を起こし、多臓器不全に陥る。また Ranajeri ら(Ranajeri et al., JAMA, 2000)は、人工呼吸(PEEP [呼吸終末陽圧人工呼吸]併用)がサイトカイン濃度や患者の生存率に影響すると報告している。VILI を生じた患者の死亡率は最近までは 40~60%と非常に高かったが、ここ数年で 30~40%に減少しており、これは人工呼吸法の改善および多臓器不全(敗血症)の治療の向上によるものと思われる。しかし、依然としてその機序は明らかではない。

VILI を防ぐことは、人工呼吸からの早期離脱を促進させ、原疾患の予後良好が望める。これは ICU や救急病棟の病床利用率(ベッド回転率)の向上、患者を迅速に受け入れる体制に貢献し、臨床においてきわめて大きい意義があると考えられる。この VILI の全体像が遺伝子レベルで解明されれば、人工呼吸開始から離脱の過程で、肺障害に関連する遺伝子発現傾向、および、それに起因するサイトカインの産生量変化を監視することで、状況に対応した人工呼吸の設定が可能になると期待される。

VILI の先行研究では、肺胞上皮細胞に炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  (腫瘍壊死因子)と伸展刺激を加えた実験で、炎症反応関連遺伝子の発現が、dos Santos ら(dos Santos et al., Physiol. Genomics, 2004)によって報告されている。また Konstantin ら(Konstantin et al., Am. J. Physiol., 2003)は、肺動脈血管内皮細胞に大小 2 種類の伸展刺激を与え、Rho, proteinase-activated receptor (PAR-2), アポトーシス関与遺伝子が、大きい伸展のときに有意に発現することを示し、伸展の大きさに添加した薬剤の効果と伸展刺激に対する細胞の防御機能が調

節されることを報告している。さらに Copland ら(Copland et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med, 2003, 2004, J. Cell. Phys., 2007)は、ラットを使用した in vitro, in vivo 実験で、高一回換気量の人工呼吸に反応する遺伝子発現変化は早い段階で起こること、胎児ラットの上皮細胞で伸展による初期応答遺伝子発現の伝達経路について報告している。しかし、これらの研究では網羅的に遺伝子発現解析が行われているものは少数で、特定の遺伝子群の発現変化に注目している。また遺伝子発現データの詳細も公表されていない。

一方、すでに Webb ら(Webb et al., Am. Rev. Respir. Dis., 1974)によって PEEP は肺障害を予防または減少させるという重要な役割があると報告している。Tremblay ら(Tremblay et al., J Clin Invest, 1997)はラットの実験で、Ranajeri らは臨床データから、人工呼吸(低一回換気量, 高 PEEP)では、炎症性メディエーター(サイトカイン)はより低値を示し、これが多臓器不全の発生を抑え、その結果患者の生存率改善に關与すると報告しているが、依然としてこの機序も明らかではない。また、臨床において、PEEP は肺の虚脱予防という位置づけで用いられることが主で、肺障害抑制の役割で使用された報告は少ない。

研究代表者はこれまでに、培養細胞伸展装置によって、コラーゲン被覆シリコン膜の培養プレート上で培養された肺胞動脈内皮細胞に伸展刺激を加えてひずみを生じさせ、シリコン膜のひずみと細胞のひずみが一致することを確認した(生体医工学、47 巻 5 号 464-469, 2009)。さらに、H23-24 年度科学研究費若手研究(B)の助成を受けて以下の ~ の研究を行った。培養細胞に過伸展模擬ひずみを加えた実験による炎症性物質産生(IL-6)と遺伝子発現解析(マイクロアレイ、リアルタイム RT-PCR)の時系列解析の結果から、過伸展刺激起因の障害は急性期に生じることを示唆した(International Journal of Molecular Medicine, 30: 509-513, 2012)。また、この結果から、機械的伸展から IL-6 タンパク質産生に至る経路として、伸展刺激による細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度変化を起点に IL-6 タンパク質産生に至る候補経路を示唆した。臨床において VILI の危険性を減らすとされている PEEP を模擬したひずみを用いた予備実験も行い、過伸展模擬ひずみに PEEP を加えると、細胞の IL-6 タンパク質産生量は過伸展模擬ひずみ単独の場合よりも減少することが示された。つまり、PEEP を加えることによって肺の過伸展時の IL-6 産生を抑制できる可能性がある(仮説)。

## 2. 研究の目的

VALI メカニズムの解明と VALI を予防する人工呼吸の設定を最終目標とし、本研究では *in vitro* の培養細胞伸展システムを用いて、機械的伸展が肺動脈血管内皮細胞に与える影響を明らかにする。遺伝子発現及びサイトカイン産生の時系列解析によって、機械的伸展からサイトカイン産生に至るシグナル伝達経路を同定し、人工呼吸が肺障害を引き起こす過程の遺伝子発現経路を予測する。

(1) 研究背景の仮説を検証するため、肺動脈血管内皮細胞を用いて伸展実験(過伸展模擬ひずみ+PEEP)を行い、伸展と IL-6 遺伝子発現量あるいは IL-6 タンパク質産生量を時系列的に計測する。

(2) 伸展された細胞から抽出した total RNA に対して網羅的遺伝子発現解析を行い、発現量が変化した遺伝子と発現量が変化した遺伝子を含むパスウェイを探索する。

(3) 上記の結果に基づいて、人工呼吸によって肺損傷にいたるパスウェイの中で PEEP によって変化するパスウェイを明らかにする。

網羅的遺伝子発現解析を用いて、伸展刺激と PEEP の肺細胞に及ぼす影響を統合的に研究することは独創的である。また、臨床において、肺の虚脱予防で用いられる PEEP を、PEEP 自体が肺障害を抑制する視点に着目して研究を行うことは新規性がある。伸展と PEEP に関する伝達経路において炎症性物質産生につながる伝達経路が見つかれば、対症療法ではなく肺障害に至る前段階で投薬や呼吸管理による肺障害発症の予防(原因療法)が可能となる、さらに投薬等を用いることなく、PEEP を含む人工呼吸の設定だけで、VALI を防ぐことが可能になると期待される。そして結果として人工呼吸からの早期離脱を促進させ、原疾患治療が期待できる。

## 3. 研究の方法

(1) 研究全般にわたる実験条件

細胞播種：肺動脈血管内皮細胞を、コラーゲン被覆シリコン膜の培養プレート上の、細胞が設定どおりにひずむ範囲に播種し、増殖させる。この手法を用いた、VALI に関する伸展実験の報告がないので、本研究独自の実験手法となる。肺動脈血管内皮細胞は、肺での炎症性物質を肺のみにとどめるという重要な役割を果たしている、入手可能なセルラインの肺細胞で唯一、正常細胞由来の培養細胞である(肺胞上皮細胞は癌由来細胞)。伸展装置で設定したひずみと等しいひずみが細胞に生じるという理由で選択した。

病理的(過伸展)人工呼吸模擬ひずみ(ひずみ 20%)：Tschumperin ら (Tschumperin et al., *Am. Rev. Respir. Care.*, 2002) は、伸展率 17~22%の伸展を負荷して得られる 37~50%の細胞表面積の増大が、細胞死の原因となることを示している。これを受けて、Konstadin ら (Konstadin et al., *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2003) は、

5%と 18%の伸展刺激を負荷し、Shikata ら (Shikata et al., *Exp. Cell Res.*, 2005) は、伸展刺激なしと 18%伸展刺激負荷を行い、両方の研究ともそれぞれ伸展率 15%を超える機械的伸展を病的伸展と位置づけている。研究代表者も、肺全体を一つの球体と単純化して考え、呼吸時の体積、面積および長さの変化について肺気量分画から検討し、生理的伸展を 5~10%、病的伸展を 20%とした。さらに、研究で使用する培養細胞伸展装置の最大伸展率は 20%であることから、病的な人工呼吸を伸展率(ひずみ) 20%で模擬した。

PEEP 模擬ひずみ(3~5%ひずみ)：肺の圧力と体積の関係(圧量曲線)と臨床の PEEP 初期設定値から PEEP に相当する量(体積)を算出し、の病的な人工呼吸模擬ひずみと同様の方法で PEEP ひずみを検討し、PEEP 模擬ひずみを 3~5%とした。

より、本研究では、病的(過伸展)人工呼吸を伸展率(ひずみ) 20%、PEEP をひずみ 3%と 5%で、PCV (pressure control ventilation) を方形波で模擬する。伸展の繰り返し周期 15 回/分は平均的な人工呼吸回数に相当する(図 1)。また、シリコン膜の培養プレート上の、細胞は、膜面内のいずれの方向にも均一にひずむ(図 2)。

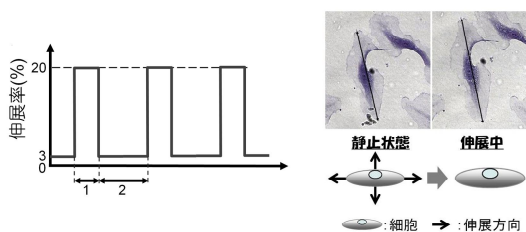


図 1. 伸展刺激波形

図 2. 細胞のひずみ

(2) 肺動脈血管内皮細胞を用いて伸展実験(過伸展模擬ひずみ+PEEP)を行い、伸展と IL-6 遺伝子発現量あるいは IL-6 タンパク質産生量を時系列的に計測。

伸展装置に培養プレートを装着し、(a) 過伸展+PEEP 模擬伸展(ひずみ 20%+PEEP3%または 5%)、(b) 15%と 17%の単独模擬伸展をそれぞれ加える。IL-6 タンパク質測定実験では、ひずみを 12 時間負荷、遺伝子発現実験では、3 時間負荷する。

伸展実験中の一定時刻(0, 1, 3, 6, 12 時間後)で採取した細胞培養液上清から IL-6 たんぱく質を定量する。また伸展後の一定時刻(0, 5, 10, 30 分, 1, 3 時間後)で total RNA を抽出して、IL-6 遺伝子発現の変化を計測する。

得られた実験結果(a)と過伸展模擬ひずみ単独の結果を比較し、過伸展模擬ひずみに PEEP を加えると IL-6 の遺伝子発現量あるいは IL-6 たんぱく質産生量の増加を抑制することを確認する。実験結果(b)から、15%と 17%の単独伸展刺激が、使用する細胞(肺動脈血管内皮細胞)にとって、生理的伸展または病的伸展のどちらに相当するか検討

する。15%と17%の単独伸展刺激が生理的伸展であれば、PEEPの役割は実ひずみを減らすこと、病理的伸展であればPEEP自体に抑制効果があると言える。

(3)伸展された細胞から抽出した total RNA に対して網羅的遺伝子発現解析を行い、発現量が変化した遺伝子と発現量が変化した遺伝子を含むパスウェイを探索。

(2)の過伸展模擬ひずみ+PEEP 実験で、IL-6 遺伝子発現量あるいは IL-6 タンパク質産生量が減少する結果が確認されれば、PEEP が VILI に関係する遺伝子の発現を抑制、または発現パターンを変化(遅延)させる可能性がある。したがって、PEEP+過膨張模擬伸展実験における網羅的遺伝子発現解析(マイクロアレイ、リアルタイム RT-PCR)を行う。

(4)研究の方法(2),(3)の結果を検討して、PEEPが影響する伸展刺激から炎症性物質産生につながるパスウェイを検索し、さらに候補経路のキーポイントとなる遺伝子の予測を行い、人工呼吸によって VILI に至る過程を明らかにする。

#### 4. 研究成果

(1)肺動脈血管内皮細胞を用いて伸展実験(過伸展模擬ひずみ+PEEP)を行い、伸展と IL-6 遺伝子発現量あるいは IL-6 タンパク質産生量を時系列的解析

培養細胞に過伸展模擬ひずみ+PEEP 模擬ひずみを加えた実験による IL-6 タンパク質産生量の時系列解析の結果から、過伸展模擬ひずみを与えた細胞の IL-6 タンパク質産生量は3時間以降で、コントロールの細胞の IL-6 タンパク質産生量より有意に増加し、ひずみを与えた細胞の IL-6 タンパク質産生量は3時間でピークだったのに対し(図 3a)、過伸展模擬ひずみに PEEP を加えると IL-6 タンパク質産生量は過伸展模擬ひずみ単独の場合よりも減少することが示された(図 3b)。また、実ひずみ伸展模擬ひずみ(15%、17%)を加えると一部の伸展条件の時、ひずみを与えた細胞の IL-6 タンパク質産生量にピークが現れた(図 3c)。さらに、IL-6 タンパク質産生量増加分について評価すると、実ひずみの大きさが小さいと IL-6 タンパク質産生量が減少した(図 4a-d)。

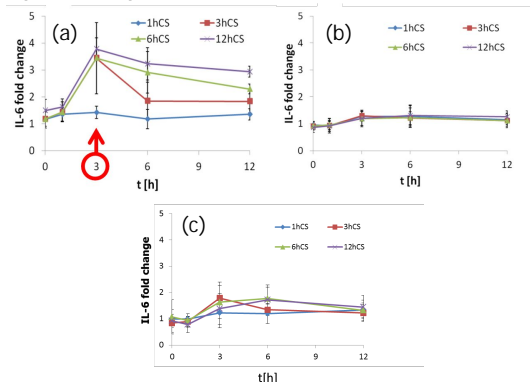


図 3 . IL-6 タンパク質産生の変化率の時系列変化

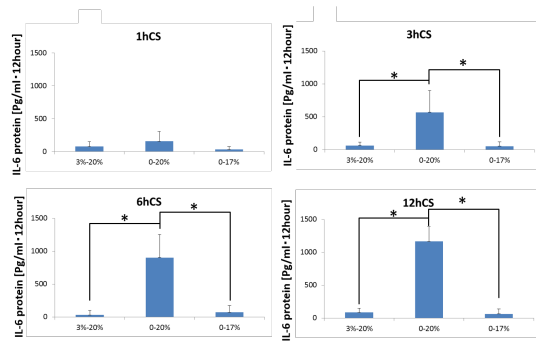


図 4 . IL-6 タンパク質産生量

過伸展模擬伸展+PEEP ひずみを与えた細胞では実ひずみの大きさを減少させた、ひずみを完全に戻さないこの2つの効果によって、IL-6 タンパク質産生量が過伸展単独模擬ひずみより減少した。PEEP 模擬伸展が伸展による細胞への刺激を軽減している可能性が考えられる。

つぎに、培養細胞に過伸展模擬ひずみ+PEEP 模擬ひずみを加えた実験による IL-6 遺伝子発現の時系列解析の結果から、過伸展模擬ひずみ+PEEP 模擬ひずみ、過伸展模擬ひずみ単独どちらのひずみを与えた場合でも、IL-6 遺伝子発現のピークは刺激開始 30 分だった。過伸展模擬ひずみ+PEEP ひずみを与えた細胞の IL-6 遺伝子発現は、過伸展模擬ひずみを与えた細胞の IL-6 遺伝子発現よりも少なかった(図 5)。

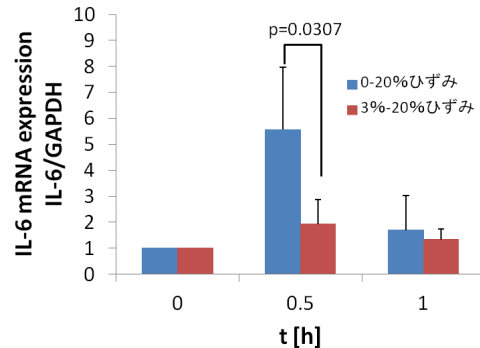


図 5 . 細胞の IL-6 遺伝子発現

以上の結果より、細胞に与えた最大のひずみは同じであっても、ひずみを完全に元に戻さずにある程度細胞を引っ張ったままにした状態で周期的な伸展を与えたさせた方が、細胞への刺激が少なかったことを示す。臨床で肺機能が低下しているときに人工呼吸に PEEP を併用することは、肺の虚脱だけでなく、炎症も抑えるので、理にかなっているといえる。

(2)伸展された細胞から抽出した total RNA に対して網羅的遺伝子発現解析を行い、発現量が変化した遺伝子と発現量が変化した遺伝子を含むパスウェイを探索。

伸展された細胞から抽出した total RNA に対して網羅的遺伝子発現解析を行い、発現量

が変化した遺伝子と発現量が変化した遺伝子を検索したが、大きく発現量が変化した遺伝子の数が少なく、またその遺伝子が機械的伸展から IL-6 タンパク質産生に至る経路に関連する遺伝子であるか確認するまでにはいかなかった。つまり、機械的伸展から IL-6 タンパク質産生に至る経路は遺伝子だけでなく、経路の中には、リン酸化や、メチル化など他の機構が関連して成り立っている可能性がある。そのため、今後は、リン酸化やメチル化などを視野にいれて機械的伸展から IL-6 タンパク質産生に至る候補経路の検索をする必要がある。

#### 5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 小林こず恵, 稲岡秀検, 小久保謙一, 根武谷吾, 小林弘祐, 熊谷寛. PEEP 模擬伸展が肺動脈血管内皮細胞の IL-6 遺伝子発現とタンパク質産生に与える影響 (第 22 回バイオフィジオロジー研究会, 2014.2.21-22, KKR ホテル 金沢 (石川県、金沢市))

(2) Kobayashi K, Inaoka H, Kokubo K, Kobayashi H. Effects of PEEP-like cyclic stretching on the IL-6 gene and protein production in normal human pulmonary artery endothelial cells *in vitro*. (The 19th Congress of Asian Pacific Society of Respiriology (APSR), 2014.11.13-16, Bali, Indonesia)

#### 6 . 研究組織

(1)研究代表者

小林 こず恵 (KOBAYASHI, KOZUE)

北里大学・医療衛生学部・助教

研究者番号：60448975