

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462767

研究課題名(和文)細胞環境改善による炎症性肺疾患発症の予防と病態改善のための研究

研究課題名(英文)Approach to inflammatory lung diseases by improving paracellular environment

研究代表者

藤島 清太郎 (FUJISHIMA, SEITARO)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：00173419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：1)ヒト血管内皮細胞を高濃度酸素に曝露すると、IL-8の発現が誘導され、TNF- $\alpha$ ・細菌内毒素の共存下でさらに増強されたことから、重症患者に対する高濃度酸素療法の有害性が改めて危惧された。また、この機序に核内パターン認識受容体の関与が示唆された。2)ヒトES細胞の肺胞上皮細胞への分化誘導促進法として、空気接触下培養が有効であることを確認した。3)我々が以前認めたIL-17欠損マウスにおける急性肺損傷増悪の機序として、樹状細胞やIL-12以外を介する機序の関与が示唆された。4)急性呼吸促迫症候群の肺局所サイトカインを網羅的に解析し、IL-1、IFN- $\gamma$ 、IL-17の病態への関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：1) We exposed human vascular endothelial cells to hyperoxia, and found the induction of interleukin-8 gene expression. This response was exacerbated under the co-incubation with tumor necrosis factor alpha or lipopolysaccharide, suggesting the exaggerated toxicity of hyperoxia in patients under critical condition. We further found the involvement of intracellular pattern-recognition receptors in this mechanism. 2) We found that differentiation of human embryonic stem cells into lung epithelial cells was facilitated by an air-liquid interface method. 3) We previously found the exaggerated bleomycin-induced acute lung injury in interleukin-17 deficient mice. By the current analysis, involvement of pathways not including dendritic cells or interleukin-12 were suggested. 4) We comprehensively analyzed lung cytokines in patients with acute respiratory distress syndrome, and found the involvement of interleukin-1beta, interferon-gamma, and interleukin-17.

研究分野：呼吸器集中治療

キーワード：炎症性肺疾患 ARDS 高濃度酸素

## 1. 研究開始当初の背景

生体が各種疾患、外傷・熱傷などの生体侵襲に暴露されると、全身性に非特異的炎症反応が惹起され、臨床的にはしばしば全身性炎症反応症候群(SIRS)の状態に陥る。加えて、この状況下ではしばしば免疫細胞の過剰反応性(priming)が生じており、感染などの二次的侵襲を契機に、多臓器機能不全(MODS)を高率に発症し、しばしば致命的なため、その予防と治療が喫緊の課題である。

我々は従来から高度侵襲、炎症性肺疾患病態下における炎症、抗炎症性反応を主にサイトカイン、ケモカインの面から研究し、様々な炎症性ケモカインの敗血症、急性呼吸促進症候群(ARDS)、炎症性肺疾患病態への関与を明らかにしてきた。近年では、一次刺激後の免疫機能変化が priming に関与しているとの仮説に基づき、熱傷負荷後の過剰炎症反応性を明らかにし、その制御が病態改善に有効であることを示した。また、高度侵襲後の IL-18 の低下とその少量補充による病態改善とその機序を解明した。さらに、新たな細胞反応性修飾因子として Th2 ケモカインである MDC/CCL22、TARC/CCL17、IL-17A も見いだし、各々の変動がもたらす細胞反応性の変化を明らかにした。

## 2. 研究の目的

本研究は、ARDS などの炎症性肺疾患病態下の免疫炎症・内分泌代謝関連因子や細胞機能を総合的に解析し、病的環境下における異常細胞反応性とこれをもたらす傍細胞環境の乱れを明らかにし、さらに異常細胞反応性を正常化する手法を検討することで、将来の炎症性肺疾患、特に ARDS に対する新規予防法、治療法の開発に繋げることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養系を用いた、異常細胞反応性獲得機序の解明と予防・治療法開発

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)、単球系細胞 MonoMac6 を各々の至適培地を用いて酸素濃度を変更可能な CO<sub>2</sub> インキュベータ内で培養した。この系において、酸素分圧を変動させ、集中治療下の傍細胞環境を再現し、細胞形態や、侵襲負荷に対する反応性などを解析した。侵襲負荷としては腫瘍壊死因子 α (TNFα) などの炎症性サイトカイン、細菌内毒素(LPS)などの pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)を用いた。

さらに培養細胞から、総 RNA を抽出し、逆転写酵素にて cDNA を合成後、リアルタイム PCR により、液性因子、パターン認識受容体などの免疫関連因子を含めた遺伝子発現を解析した。また蛋白質を ELISA 法で解析した。

### (2) ヒト ES 細胞から肺組織細胞の効率的分化誘導法の探索

当大学生理学教室、腎臓内分泌代謝内科と共同で、ヒトの ES 細胞の肺胞上皮細胞などへの効率的誘導手法を探索した。本研究では、マウス ES 細胞から肺胞上皮細胞への分化誘導で用いられる「Air-liquid interface 法」をヒト ES 細胞の分化誘導に応用した。分化誘導の確認には、surfactant protein C (SPC)、aquaporin-5 (AQ5)をマーカーとして用いた。

### (3) マウス炎症性肺疾患モデルを用いた、侵襲後の異常細胞反応性の解析

マウスをネブタール麻酔した後、マイクロスプレイヤーを用いて経気道的に 1~3 mg/kg Bleomycin 50~100 μL を噴霧投与した。その後7日後に屠殺し、肺を摘出し、主に免疫組織学的手法により検討した。複数の樹状細胞マーカーと複数の IL-12 抗体を用いて検討した。

### (4) 炎症性肺疾患患者における生理活性物質の解析

ARDS 患者の気管支肺胞洗浄液を用いて、免疫炎症関連生理活性物質をビーズアレイ法にて網羅的に解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞培養系を用いた、異常細胞反応性獲得機序の解明と予防・治療法開発

呼吸器内科と共同で、HUVEC を各種濃度の高濃度酸素曝露下で培養し、その影響を検討した。高濃度酸素曝露の方法としては、培養器内全体の酸素濃度調節を用いたが、90%以上の設定では曝露実験中に濃度がしばしば低下したため、培養器内に小チェンバーを設置して、チェンバー内部の酸素濃度を90%以上に維持する方法も試みた。また、培養液中ウシ胎児血清(FBS)濃度により高濃度酸素曝露への反応性が変化することを見いだし、FBS 濃度を調節することで、80~85%酸素曝露で、安定した結果を得ることができた。

HUVEC においては、高濃度酸素曝露のみでは炎症性サイトカイン IL-8 遺伝子の発現は僅かに誘導されたのみであるが、炎症性サイトカインである TNFα、PAMPs である LPS の共存により、発現が相乗的に誘導された。各種パターン認識受容体のうち、細胞内受容体である NOD1 は変動しなかったが、NOD2 が IL-8 と同様の発現変動を示すことを認めた。さらに siRNA による NOD2 の発現制御により、相乗効果は減弱した。

また、単球系培養細胞 MonoMac6 を用いて、同様の実験を行った。MonoMac6 においても、TNFα、LPS の共存下での高濃度酸素曝露により IL-8 の発現が誘導され、NOD2 発現も同様に誘導されたが、NOD2 の関与は不明であった。

### (2) ヒト ES 細胞から肺組織細胞の効率的分化誘導法の探索

分化誘導促進法として、空気曝露下で培養

する方法 (air-liquid interface 法) の効果を検討し、ヒト ES 細胞でも分化誘導促進効果を確認した。

### (3) マウス炎症性肺疾患モデルを用いた、侵襲後の異常細胞反応性の解析

我々は、IL-17 欠損マウス (東京大学医科学研究所より供与) において、ブレオマイシン (BLM) 誘発急性肺損傷 (ALI) が増悪することを以前の研究で見いだしている。本研究ではこの機序への Th1 サイトカインである IL-12 の関与を仮定し、主に検討を行った。

IL-12 は上皮細胞に加えて、一部のリンパ球様細胞に発現していたため、さらに樹状細胞マーカーを CD11c に変更し、免疫蛍光二重染色にて、樹状細胞における IL-12 発現を検討した。当初、IL-12 発現細胞数の増加傾向を認めしたが、繰り返し実験を行った結果、樹状細胞数、及び IL-12 発現樹状細胞数は、IL-17 欠損マウスで有意に変動していないとの結論に至った。本結果は、IL-17 欠損マウスにおける病態増悪への、樹状細胞や IL-12 以外を介する機序の関与を示唆するものである。

### (4) 炎症性肺疾患患者における生理活性物質の解析

ARDS 患者肺局所の複数サイトカインをビーズアレイ法であるバイオプレックスを用いて検討し、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-17 の高値を認めた。

#### 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 20 件)

Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, Kumar A, Sevransky JE, Sprung CL, Nunnally ME, Rochwerg B, Rubenfeld GD, Angus DC, Annane D, Beale RJ, Bellinghan GJ, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith C, De Backer DP, French CJ, Fujishima S, Gerlach H, Hidalgo JL, Hollenberg SM, Jones AE, Karnad DR, Kleinpell RM, Koh Y, Lisboa TC, Machado FR, Marini JJ, Marshall JC, Mazuski JE, McIntyre LA, McLean AS, Mehta S, Moreno RP, Myburgh J, Navalesi P, Nishida O, Osborn TM, Perner A, Plunkett CM, Ranieri M, Schorr CA, Seckel MA, Seymour CW, Shieh L, Shukri KA, Simpson SQ, Singer M, Thompson BT, Townsend SR, Van der Poll T, Vincent JL, Wiersinga WJ, Zimmerman JL, Dellinger RP. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. Crit Care Med、査読有、45(3)、2017、486-552  
DOI: 10.1097/CCM.0000000000002255  
Nakajima T, Nakamura H, Caroline A.

Owen CA, Yoshida S, Tsuduki K, Chubachi S, Shirahata T, Mashimo S, Nakamura M, Takahashi S, Minematsu N, Tateno H, Fujishima S, Asano K, Celli BR, Betsuyaku T. Plasma cathepsin S and cathepsin S/cystatin C ratios are potential biomarkers for COPD. Disease Marker、査読有、2016、2016、-

DOI: 10.1155/2016/4093870

Fujishima S. Organ dysfunction as a new standard for defining sepsis. Inflamm Regen、査読有、36、2016、-

DOI: 10.1186/s41232-016-0029-y

Fujishima S, Gando S, Saitoh D, Kushimoto S, Ogura H, Mayumi T, Takuma K, Kotani J, Yamashita N, Tsuruta R, Takeyama N, Shiraishi S, Araki T, Suzuki K, Ikeda H, Miki Y, Suzuki Y, Yamaguchi Y, Aikawa N, and Japanese Association for Acute Medicine Sepsis Registry (JAAM SR) Study Group. Infection site is predictive of outcome in acute lung injury associated with severe sepsis and septic shock. Respirology、査読有、21、2016、898-904  
DOI: 10.1111/resp.12769

西田修、小倉裕司、井上茂亮、射場敏明、今泉均、江木盛時、垣花泰之、久志本成樹、小谷穰治、貞広智仁、志馬伸朗、中川聡、中田孝明、布宮伸、林淑朗、藤島清太郎、升田好樹、松嶋麻子、松田直之、織田成人、田中裕、日本版敗血症診療ガイドライン 2016 作成特別委員会・日本版敗血症診療ガイドライン 2016 (J-SSCG2016)・日本集中治療医学会雑誌、査読有、24(Suppl. 2)、2017、S1-S232  
DOI: 10.3918/jsicm.24S0001

藤島清太郎・急性呼吸促迫症候群 (ARDS) の治療戦略・日本血液浄化学会雑誌、査読有、7(1)、2016、10-12

Hifumi T, Fujishima S, Abe T, Kiriu N, Inoue J, Kato H, Koido Y, Kawakita K, Kuroda Y, Sasaki J, Hori S. Prognostic factors of Streptococcus pneumonia infection in adults. Am J Emerg Med、査読有、34(2)、2015、202-6  
DOI: 10.1016/j.ajem.2015.10.025

Kushimoto S, Gando S, Saitoh D, Mayumi T, Ogura H, Fujishima S, Araki T, Ikeda H, Kotani J, Miki Y, Shiraishi S, Suzuki K, Suzuki Y, Takeyama N, Takuma K, Tsuruta R, Yamaguchi Y, Yamashita N, Aikawa N, Japanese Association for Acute Medicine Sepsis Registry (JAAMSR) Study Group. Impact of serum glucose levels on disease severity and outcome in patients with severe sepsis: an analysis from a multicenter, prospective survey of severe sepsis. Acute Medicine & Surgery、査読有、2、2015、21-28  
DOI: 10.1002/ams2.59

Ogawa R, Suzuki Y, Kagawa S, Masaki K, Fukunaga K, Yoshimura A, Fujishima S, Terashima T, Betsuyaku T, Asano K. Distinct effects of endogenous interleukin-23 on eosinophilic airway inflammation in response to different antigens. *Allergol Int*, 査読有、64 Suppl、2015、S24-9

DOI: 10.1016/j.alit.2015.04.005

藤島清太郎 . 急性呼吸促迫症候群 (ARDS); 疾患概念、診断基準と病態 . 救急医学、査読無、39、2015、649-53

藤島清太郎 . 急性呼吸促迫症候群 (ARDS) の病態生理 . 呼吸器内科、査読無、28(2)、2015、87-91

Fujishima S. Pathophysiology and biomarkers of acute respiratory distress syndrome. *J Intensive Care*、査読有、2、2014、32

DOI: 10.1186/2052-0492-2-32

Sasaki J, Matsumoto K, Fujishima S, Morita K, Hori S. Pharmacokinetics of a polyene antifungal agent, liposomal amphotericin B (L-AMB), in a severely burned patient. *J Chemother*、査読有、26(5)、2014、312-4

DOI: 10.1179/1973947813Y.0000000141

Nakamura M, Nakamura H, Minematsu N, Chubachi S, Miyazaki M, Yoshida S, Tsuduki K, Shirahata T, Mashimo S, Takahashi S, Nakajima T, Tateno H, Fujishima S, Betsuyaku T. Plasma cytokine profiles related to smoking-sensitivity and phenotypes of chronic obstructive pulmonary disease. *Biomarkers*、査読有、19(5)、2014、368-77

DOI: 10.3109/1354750X.2014.915342

Homma K, Hayashi K, Wakino S, Tokuyama H, Kanda T, Tatematsu S, Hasegawa K, Fujishima S, Hori S, Saruta T, Itoh H. Rho-kinase contributes to pressure-induced constriction of renal microvessels. *Keio J Med*、査読有、63(1)、2014、1-12

DOI: 10.2302/kjm.2013-0001-OA

Ogura H, Gando S, Saitoh D, Takeyama N, Kushimoto S, Fujishima S, Mayumi T, Araki T, Ikeda H, Kotani J, Miki Y, Shiraishi S, Suzuki K, Suzuki Y, Takuma K, Tsuruta R, Yamaguchi Y, Yamashita N, Aikawa N, the Japanese Association for Acute Medicine Sepsis Registry (JAAMSR) Study Group. Epidemiology of severe sepsis in Japanese intensive care units: a prospective multicenter study. *J Infect Chemother*、査読有、20(3)、2014、157-62

DOI: 10.1016/j.jiac.2013.07.006

Fujishima S, Gando S, Saitoh D, Mayumi T, Kushimoto S, Shiraishi S, Ogura H, Takuma K, Kotani J, Ikeda H, Yamashita N, Suzuki K, Tsuruta R, Takeyama N, Araki T, Suzuki

Y, Miki Y, Yamaguchi Y, Aikawa N, Japanese Association for Acute Medicine Sepsis Registry (JAAM SR) Study Group. A multicenter, prospective evaluation of quality of care and mortality in Japan based on the Surviving Sepsis Campaign guidelines. *J Infect Chemother*、査読有、20(2)、2014、115-120

DOI: 10.1016/j.jiac.2013.09.003

藤島清太郎 . ALI/ARDS の診断と治療 : バイオマーカー 呼吸器内科、査読無、25(3)、2014、204-11

藤島清太郎 . 急性呼吸促迫症候群 (ARDS) の病態と診断 . 最新医学、査読無、69、2014、1283-1290

藤島清太郎 . 急性呼吸促迫症候群 : 画像とバイオマーカーからの病態評価 . 日本呼吸ケア・リハビリテーション学会誌、査読有、24(2)、2014、220-7

[学会発表](計 10 件)

藤島清太郎 . 新ガイドラインに基づく敗血症と ARDS のマネジメント . 第 57 回日本呼吸器学会学術総会 2017 年 4 月 23 日 東京国際フォーラム(東京都・千代田区)

藤島清太郎 . 敗血症性 ARDS . 第 44 回日本集中治療医学会学術集会 企画セミナー22「敗血症と臓器不全」 2017 年 3 月 10 日 さっぽろ芸文館(北海道・札幌市)

藤島清太郎、今泉均、升田好樹、巽博臣、藤村直幸、井上茂亮、射場敏明、垣花泰之、久志本成樹、小谷穰治、貞弘智仁、志馬伸朗、中川聡、中田孝明、布宮伸、林淑朗、松田直之、松嶋麻子、江木盛時、小倉裕司、西田修、織田成人、田中裕 . 成人敗血症患者に対する副腎皮質ステロイド投与について . 第 44 回日本救急医学会総会・学術集会シンポジウム 1「日本版敗血症診療ガイドライン 2016」 2016 年 11 月 17 日 グランドプリンスホテル新高輪(東京都・港区)

藤島清太郎 . ALI/ARDS に対する多施設共同前向き観察研究 . 第 43 回日本救急医学会総会・学術集会シンポジウム 5 2015 年 10 月 22 日 東京国際フォーラム(東京都・千代田区)

藤島清太郎 . 敗血症性 ARDS に対する治療戦略 . 第 26 回日本急性血液浄化学会学術集会シンポジウム 3「日本版敗血症ガイドラインを考察する」 2015 年 10 月 9 日 京王プラザホテル(東京都・新宿区)

藤島清太郎 . 新たな ARDS 診断基準と最近の知見 . 第 24 回日本集中治療医学会関東甲信越地方会ミニレクチャー4 2015 年 8 月 29 日 京王プラザホテル(東京都・新宿区)

藤島清太郎、丸藤 哲、齋藤大蔵、真弓

俊彦、久志本成樹、白石振一郎、小倉裕司、田熊清継、小谷穰治、池田弘人、山下典雄、鈴木幸一郎、鶴田良介、武山直志、荒木恒敏、鈴木泰、三木靖雄、山口芳裕、相川直樹。重症敗血症と Surviving Sepsis Campaign Guidelines 第 37 回日本血栓止血学会学術集会 日本血栓止血学会・日本救急医学会ジョイントシンポジウム「重症敗血症と DIC」 2015 年 5 月 22 日 甲府市総合市民会館(山梨県・甲府市)

中野泰、藤島清太郎、宮庄拓、田坂定智、橋本悟、長谷川直樹、別役智子。ALI/ARDS 患者肺局所サイトカインの網羅的解析による病態評価の試み。第 55 回日本呼吸器学会学術講演会 シンポジウム 4「ARDS の多面的評価」 2015 年 4 月 17 日 東京国際フォーラム(東京都・千代田区)

藤島清太郎。敗血症バンドル遵守率と死亡率による診療の質の評価。第 27 回日本外科感染症学会総会学術集会 シンポジウム 7「日本救急医学会 Sepsis Registry から見た本邦の敗血症診療の現況」 2014 年 12 月 5 日 東京コンファレンスセンター・有明(東京都・江東区)

藤島清太郎。救急診療の場で遭遇する感染症の特徴。第 42 回日本救急医学会総会・学術集会 / 第 193 回 ICD 講習会 2014 年 10 月 30 日 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

〔図書〕(計 3 件)

藤島清太郎 他、中山書店、救急集中治療アドバンス 重症患者における炎症と凝固・線溶系反応 全身性炎症性反応症候群(SIRS)の定義と診断、2017、16-21、320 頁

藤島清太郎、南江堂、呼吸器疾患最新の治療 2016-2018 酸素療法の適応と投与方法、2016、114-116、494 頁

藤島清太郎、総合医学社、呼吸器疾患診療最新ガイドライン 肺循環に起因する肺疾患：肺水腫、2014、158-164、395 頁

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤島 清太郎 (Fujishima Seitaro)  
慶應義塾大学・医学部・准教授  
研究者番号：00173419

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )