

令和元年6月18日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10995

研究課題名(和文) 呼吸器誘発肺障害におけるaquaporinの役割

研究課題名(英文) Association between ventilator-induced lung injury and aquaporin channels.

研究代表者

石井 友理 (Ishii, Yuri)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：20649660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：人工呼吸器による換気量の増大は肺障害を引き起こすとされる。Aquaporin(AQP)は細胞膜で水を透過させる機能を持ち、肺障害との関連が指摘されている。Ratを用いて換気量の増大がAQPに影響するかを検証した。人工呼吸器によって換気量を増大させ肺障害を作成した。肺におけるAQP1,5のmRNAと蛋白発現を測定した。AQPのmRNA発現は換気量の増大に伴い減少する傾向があった。蛋白発現はAQP1で換気量増大に伴い増加し、AQP5で換気量増大に伴い減少する傾向にあった。呼吸器誘発肺障害とaquaporinとが関連している可能性が示唆された。肺障害の予防や治療にAQPの制御が重要であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、換気量増大に伴う肺障害(人工呼吸器誘発肺障害)がaquaporin(AQP)の発現に影響することが示された。人工呼吸器誘発肺障害は、重症呼吸不全における治療の合併症として重要である。この肺障害は致死的であるとともに医原性の肺障害とも考えられるため、治療による増悪因子の可能性があり予防や治療の解明が生命予後につながると期待される。今までウィルス性や化学性肺障害でのAQPとの関連は示されてきたが、呼吸器誘発肺障害との関連を示す研究は少ない。本研究により呼吸器誘発肺障害とAQPの関連を示したことで、予防や治療につながる研究の基礎を築くことが期待できると考える。

研究成果の概要(英文)：Mechanical ventilation with a high tidal volume (TV) induces lung injury. Aquaporins (AQP) are water-specific membrane channel proteins that may play roles in edema formation. We examined a rat model of ventilator-induced lung injury (VILI) to evaluate whether AQP was involved in lung pathophysiology. Rats were ventilated with normal or high-volume. After mandatory ventilation period, the harvested lung samples were analyzed the changes in transcription and protein expression of AQP1,5. The AQP1,5 transcription expression tended to decrease with the increase of TV. The AQP1 protein expression tended to increase with the increase of TV. The protein expression of AQP5 tended to decrease with high-volume groups. This study was suggested that VILI and AQP may be related by measurement of the protein level of AQP1 and AQP5. The control of AQP expression is considered important for prevention and treatment of lung injury.

研究分野：救急医学

キーワード：aquaporin 人工呼吸器誘発肺障害 リアルタイムRT-PCR ウェスタンブロットティング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

呼吸器誘発肺障害は、重症管理領域の診療で考慮から外せない合併症の1つである。この肺障害は難治性で致死性病態であるとともに、人工呼吸器によって引き起こされるため医原性の肺障害とも考えられる。発生機序は、過大な一回換気量による圧障害や肺組織の伸展と虚脱が繰り返されることによる肺実質の機械的傷害であると考えられている。(Gajic O et al. Crit Care Med. 2004 Sep; 32(9): 1817-24) ラットや犬で、一回換気量を約 40 ml/kg の過大な量で換気すると、過伸展した肺胞が毛細血管透過性を増加させて急速に肺水腫を形成する。血漿成分が肺の毛細管壁を超えて血管外漏出が起こり、間質の用量や圧の上昇を引き起こされる。この傷害によって起こる肺水腫が、呼吸器誘発肺障害の病態である。Aquaporin は細胞膜を形成する脂質二重膜において、負荷される圧に従って水を細胞内外両方向に通過させる水チャネルである。膀胱壁の伸展が水チャネルを活性化すると報告されていることから、呼吸器誘発性の肺伸展による障害の発生機序に aquaporin が関係する可能性が考えられた。

現在、哺乳類からは 13 種類の aquaporin (AQP 0 ~ AQP12) が迅速な水の移動が必要な腎臓や目、肺で発見されている。肺にはこのうち AQP1 と 3、4、5 が存在している。AQP1 は肺の内皮細胞から見つかり、AQP3 は気管上皮、AQP4 は気管と気管支上皮細胞、AQP5 はタイプ上皮細胞に見られた。AQP1 は HgCl<sub>2</sub> によって阻害され水チャネルとしての機能を失う。HgCl<sub>2</sub> は AQP5 も、おそらく AQP3 も阻害する。これらの水チャネルの中で呼吸器誘発肺障害について、過去の報告から AQP1 と 5 との関連性に注目した。これらは、肺の水浸透性に大きく関係していることが示されている。マウスを用いてアデノウイルスによる肺炎モデルを作成したところ、暴露の 7-14 日後に肺水分量増加とともに AQP1 と 5 の mRNA の発現が減少し、immunoblotting により両方の蛋白レベルも低下することが示され、肺水腫の形成に AQP の発現異常が関わりと報告されている。(Am J Respir. Cell Mol. Biol. 2000 22:34-44) 薬剤性肺障害モデルによる研究でも AQP5 が減少していると示されている。しかし、AQP1 と 4、5 のノックアウトマウスを用いた実験では、酸とチオウレアによる化学性肺障害に aquaporin が関わっていることは否定的であると示されている。

これまでに aquaporin と呼吸器誘発肺障害との関連を示した報告は少ない。人工呼吸による肺障害で aquaporin を阻害する HgCl<sub>2</sub> の影響を調べた研究では、血管漏出にのみ有意差が見られたが、肺水腫では明らかな差が示されていない。呼吸器誘発肺障害モデルにおいて肺障害の発症と aquaporin の関連を検証することで、その予防や治療につながる研究の基礎を築くことが期待できる。

### 2. 研究の目的

呼吸器誘発肺障害と aquaporin の関連性を解明し、その機能を制御することが人工呼吸による肺障害の発症予防や治療につながるかを検証することを目的とする。

### 3. 研究の方法

Wistar rat のオスを用いた。Rat を無作為に、人工呼吸器を行わない対照群として sham(n=4)、一回換気量 6 mL/kg、15 mL/kg、25 mL/kg の人工呼吸群(各 n=6)の 4 群に分けた。イソフルランによる吸入麻酔後に、メドミジン 0.375 mg/kg、ミダゾラム 2 mg/kg、ブトルファノール 2.5mg/kg の 3 種混合麻酔薬を腹腔内投与し、Rat に全身麻酔をかけた。対照群は、麻酔後に内頸静脈に留置したカテーテルから麻酔薬を静注し、深麻酔で犠死させた。人工呼吸群は、気管切開してポリエチレンチューブを挿入し人工呼吸器に装着した。割り付けたそれぞれの一回換気量で 80 回/分、4 時間の陽圧換気を行った。人工呼吸管理中は、内頸静脈に留置したカテーテルから適宜麻酔薬を追加投与し、麻酔を維持した。4 時間の陽圧換気後に麻酔薬を静注し、深麻酔で犠死させた。人工呼吸管理中の最高気道内圧を測定した。また、犠死後に肺組織を採取して、左肺の乾湿重量比を測定した。各群の肺組織から RNA を抽出して、リアルタイム PCR 解析により AQP1 と 5 の mRNA を定量した。さらに同じ手順で、rat を sham(n=2) 一回換気量 6 mL/kg、15 mL/kg、25 mL/kg の人工呼吸群(各 n=4)に分け、同動物モデルを作成した。採取した各群の肺組織から、ウェスタンブロット法を用いて AQP1 と AQP5 の蛋白発現レベルを測定した。

### 4. 研究成果

各群の人工呼吸器管理中の最高気道内圧(PIP)を測定した(図 1)。換気量の増大とともに、最高気道内圧も増大した。

次に各群から採取した肺の乾湿重量比(W/D weight ratio)を測定した(図 2)。一回換気量が増大するとともに肺の乾湿重量比も増大する傾向にあり、6mL/kg 群と 15mL/kg 群 ( $p < 0.05$ )、6mL/kg 群と 25mL/kg 群 ( $p < 0.01$ ) のそれぞれに統計学的有意差を認めた。

リアルタイム PCR による AQP1 と 5 の mRNA 定量測定では、AQP1 と 5 の発現は、換気量の増大

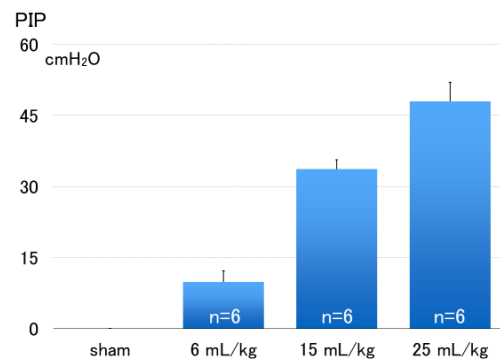


図 1 各群の最高気道内圧

に伴い減少する傾向にあった(図3)。AQP1は、Sham群と15ml/kg群( $p < 0.01$ )、Sham群と25ml/kg群( $p < 0.01$ )、6 mL/kg群と25 mL/kg群( $p < 0.05$ )、AQP5は、6 mL/kg群と15ml/kg群( $p < 0.05$ )、6 mL/kg群と25 mL/kg群( $p < 0.05$ )のそれぞれに有意差を認めた。

さらに、ウェスタンブロット法を用いた蛋白発現レベル測定では、AQP1の蛋白発現は換気量増大に伴い増加し、AQP5の蛋白発現は換気量増大に伴い減少する傾向にあった(図4)。AQP1は、6 mL/kg群と25 mL/kg群( $p < 0.05$ )、AQP5は、sham群と15ml/kg群( $p < 0.05$ )、sham群と25 mL/kg群( $p < 0.01$ )のそれぞれに有意差を認めた。

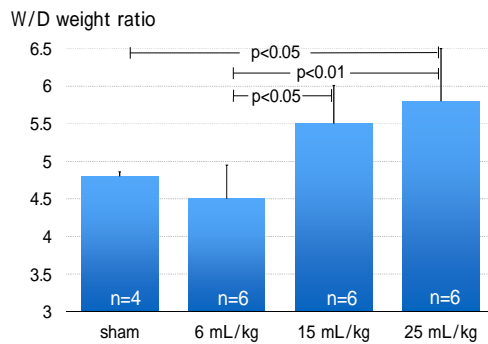


図2 各群の肺乾湿重量比

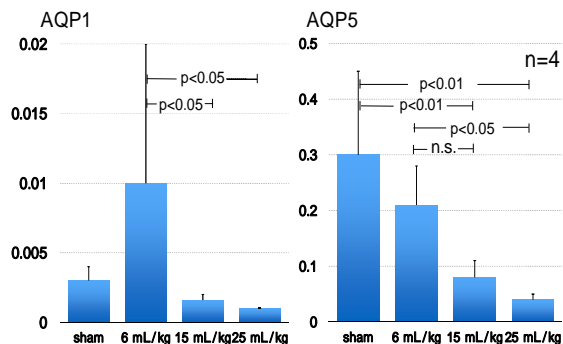


図3 AQP1とAQP5のリアルタイムPCR

(内部標準 GAPDH)

GAP: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

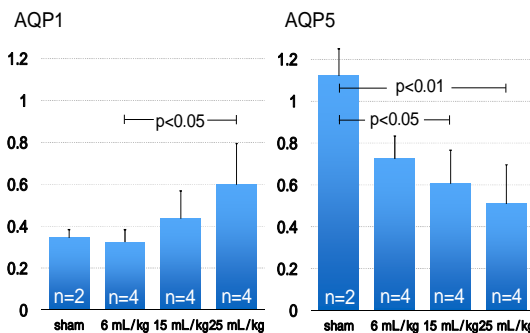


図4 AQP1とAQP5の蛋白発現レベル

本研究の動物実験モデルで、ratにおいて一回換気量の増大が急性肺障害を引き起こすことが示された。本モデルにおいて、呼吸器誘発肺障害を再現し得たと考える。また、AQP1とAQP5のmRNA定量測定と蛋白発現レベル測定により、呼吸器誘発肺障害とAQPとが関連している可能性が示唆された。呼吸器誘発肺障害とAQPとの関連を示した研究は少なく、本研究においてその関連をmRNA定量測定、蛋白発現レベル測定の双方で解析したことは、呼吸器誘発肺障害においてもAQPが重要な役割を果たしているという仮説を支持するものと考えられる。肺障害の予防や治療には、AQPの制御が重要であると考えられ、呼吸器誘発肺障害の発症においてもその制御の方法が予防や治療につながる可能性が示唆される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計4件)

Yuri Ishii, Shiro Mishima, Jun Oda. Association between ventilator-induced lung injury and aquaporin channels. 48<sup>th</sup> World Congress of Surgery (Poland), 2019.

石井友理, 三島史朗, 織田順. 呼吸器誘発肺障害における aquaporin の役割. 第46回 日本集中治療医学会学術集会 (京都). 2019.

石井友理, 三島史朗, 瀬戸口靖弘, 行岡哲男. 呼吸器誘発肺障害における aquaporin の役割. 第44回日本救急医学会総会・学術集会 (東京), 2016.

Yuri Ishii, Shiro Mishima, Yasuhiro Setoguchi, Tetsuo Yukioka. Association between ventilator-induced lung injury and aquaporin channels. 8<sup>th</sup> Asian Conference on Emergency Medicine (Taiwan), 2015.

〔図書〕(計0件)

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：三島 史朗  
ローマ字氏名：(MISHIMA, shiro)  
所属研究機関名：東京医科大学  
部局名：医学部  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：20260862

研究分担者氏名：瀬戸口 靖弘  
ローマ字氏名：(SETOGUCHI, yasuihiro)  
所属研究機関名：東京医科大学  
部局名：医学部  
職名：兼任教授  
研究者番号（8桁）：90206649

研究分担者氏名：園田 清次郎  
ローマ字氏名：(SONODA, seijihiro)  
所属研究機関名：東京医科大学  
部局名：医学部  
職名：講師  
研究者番号（8桁）：40226717

研究分担者氏名：坪井 良治  
ローマ字氏名：(TUBOI, ryoji)  
所属研究機関名：東京医科大学  
部局名：医学部  
職名：主任教授  
研究者番号（8桁）：70221421

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：前田 龍郎  
ローマ字氏名：(MAEDA, tatsuo)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。