

令和 2 年 9 月 15 日現在

機関番号：82412

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11582

研究課題名(和文) ARDSに伴う肺胞上皮細胞死はアポトーシスなのか、ネクローシスなのか？

研究課題名(英文) Types of alveolar epithelial cell death during ARDS

研究代表者

内本 一宏 (Uchimoto, Kazuhiro)

埼玉県立小児医療センター (臨床研究部)・集中治療科・医長

研究者番号：50710951

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)：本研究の目的は、「ARDS患者における肺胞上皮細胞死にネクローシス、アポトーシスそれぞれがどれだけ寄与しているのかをCK18-M30、M65という上皮細胞の細胞死タイプ特異的マーカーを用いて明らかにすること」であった。ARDS動物モデルを用いて肺胞上皮細胞死マーカーとしての妥当性を検証することができた。しかしながら、実際のARDS患者における肺胞上皮細胞死パターンを明らかにするには至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によってARDSにおいてBALF中のCK18-M30、およびM65が肺胞上皮細胞死のタイプ特異的なマーカーになりうることが示唆された。しかしながら、実際のARDS患者での検証には至らず、課題が残る結果となった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project was investigating the relative contribution of necrosis and apoptosis for the alveolar epithelial cell death in ARDS patients, utilizing CK18-M30 and M65 as markers. We have confirmed the validity of these markers using animal models. However, we could not investigate about the types of alveolar epithelial cell death in human ARDS patients.

研究分野：集中治療医学

キーワード：ARDS 人工呼吸 細胞死 ネクローシス 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

ARDS において肺胞上皮細胞の細胞死は肺胞バリアーの破綻,さらには線維化を伴うリモデリングを引き起こす。細胞死のメカニズムはアポトーシスとネクローシスに大別されるが,ARDS においては患者の肺胞洗浄液中にアポトーシスを引き起こす Fas リガンドが増加しており,また,動物モデルにおいて肺胞上皮細胞のアポトーシスが認められることから,アポトーシスが重要な役割を果たすと考えられてきた。一方で,近年,受動的で制御不能な細胞死と考えられていたネクローシスにおいて,ネクロプトーシスを始めとする“制御されたネクローシス”の存在が発見された。ARDS 動物モデルにおいても“制御されたネクローシス”が生じていることが報告されて始めており,“制御されたネクローシス”がアポトーシスに加えて ARDS における肺胞上皮細胞死を引き起こす重要なメカニズムの一つであると考えられるようになってきている。

このようにアポトーシスのみならず,ネクローシスが ARDS の病態に寄与しており,しかも制御可能,つまり治療ターゲットになる可能性が示唆されているが,ヒト ARDS 患者の肺胞上皮細胞死においてアポトーシス,ネクローシスどちらが優位であるのか,またそれぞれの細胞死が病態の重症度にどの程度影響しているのかということとは不明である。これを明らかにすることは ARDS において肺胞上皮細胞のアポトーシス,ネクローシスのいずれがより有効な治療ターゲットになるのかを知るために極めて重要だと考えられる。

ARDS 患者における肺胞上皮の細胞死のタイプを知るためには,血液中のアポトーシス及びネクローシス特異的なマーカーが必要となる。現時点で最も知られている肺胞上皮細胞傷害マーカーは型肺胞上皮細胞特異的タンパクの sRAGE であるが,どのタイプの細胞死と関連して放出されるのかはわかっていない。一方で,肺胞上皮特異的ではないものの,上皮細胞の細胞死に伴い放出されるサイトケラチン 18 (CK18)の断片化を分析することで細胞死がネクローシスなのかアポトーシスなのか区別できることが知られている。ネクローシスにおいてはフルレングスの CK18 が放出されるのに対して,アポトーシスではカスパーゼによって CK18 が断片化され(図 2),これらを測定する ELISA 系として上皮細胞の全細胞死の指標として全ての CK18 を検出する M65,アポトーシスの指標として断片化された CK18 のみを検出する M30 が開発されている。血液中の M30 と M65 が肺移植後のグラフト不全の患者で増加することが最近報告され(Hasihimoto et al. AJRCCM. 2016),肺胞上皮細胞の細胞死を,メカニズム特異的に反映するマーカーとして期待されている。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ,本研究の目的は,「ARDS 患者における肺胞上皮細胞死にネクローシス,アポトーシスそれぞれがどれだけ寄与しているのかを CK18-M30, M65 という上皮細胞の細胞死タイプ特異的マーカーを用いて明らかにすること」であった。

最初に,ARDS モデルマウスを用いて CK18-M30, M65 のマーカーの妥当性を検証した上で,実際の患者サンプルを収集し,研究を進める予定であったが,患者サンプルの収集には至らなかった。

3. 研究の方法

(1) マウス ARDS モデルにおける CK18-M30, M65 マーカーの妥当性の検討

肺胞上皮細胞死が主にネクローシスで生じる塩酸気管内投与モデル,アポトーシスで生じると考えられる高濃度酸素暴露モデル,臨床的な直接性 ARDS を反映していると考えられる LPS 気管内投与モデルにおいて気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の CK18-M65, M30 濃度を測定し,その妥当性を検討した。また,LPS 気管内投与モデルに加え,肝臓等の肺以外の臓器障害を生じる LPS 腹腔内投与モデルにおいて血漿中の CK18-M30, M65 濃度を測定し,血漿中の CK18-M30, M65 が肺以外の臓器障害の影響を受けるのか検討を行った。

(2) マウス ARDS モデルに対する高容量換気が CK18-M30, M65 に与える影響の検討

人工呼吸が肺上皮細胞死に与える影響を CK18-M30, M65 によって測定できるのかを明らかにするために,LPS 誘導性 ARDS モデルマウスに対して高容量換気を行い,BALF 中の CK18-M30, M65 に与える影響を検討した。

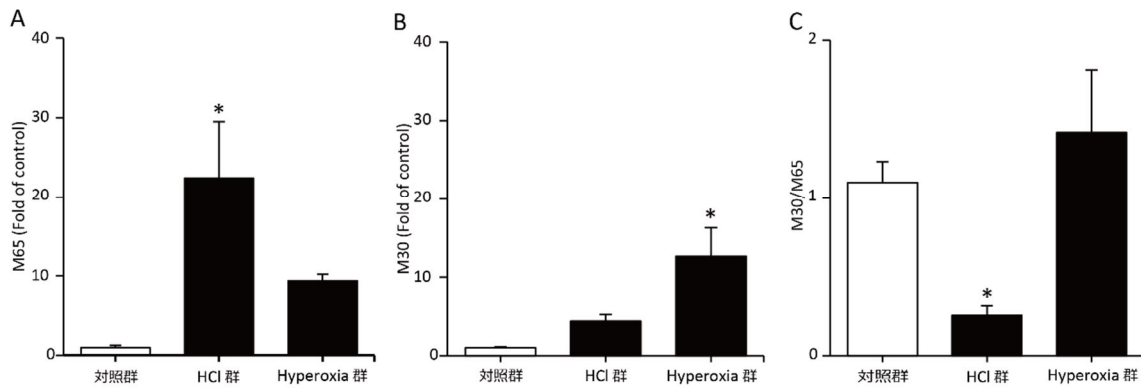
(3) 集中治療患者における CK18-M30, M65 濃度の測定

集中治療患者における肺胞上皮細胞死,さらにはネクローシス,アポトーシスがそれぞれにどの程度寄与しているのか検討を行う計画をたてたが,実際のサンプルの収集,及び測定には至らなかった。

4. 研究成果

(1) マウス ARDS モデルにおける CK18-M30, M65 マーカーの妥当性

肺胞上皮細胞死が主にネクローシスで生じる塩酸気管内投与モデル,アポトーシスで生じると考えられる高濃度酸素暴露モデルにおいて,BALF 中の CK18-M30, M65 マーカーの増加が見られ,M30/M65 比は塩酸気管内投与モデルにおいて低く,高濃度酸素暴露モデルにおいて高くなったことから BALF 中の CK18-M30, M65 両マーカーは肺胞上皮細胞死のパターンを反映すると考えられた。

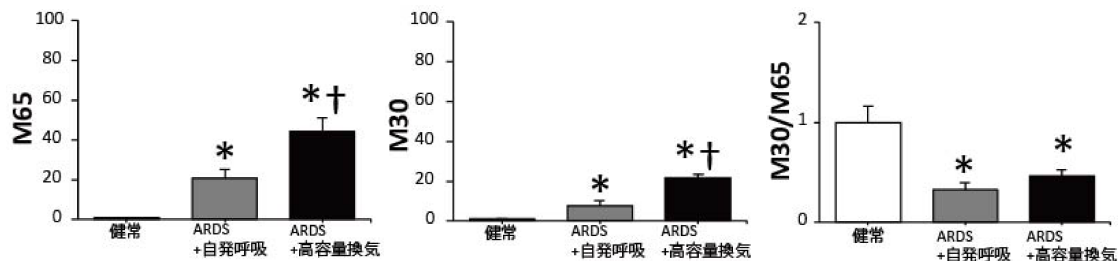


HCL 及び Hyperoxia 誘導性肺傷害モデル動物の BALF 中の CK18-M65 および-M30
 (A) M65 (B) M30 (C) M30/M65 データは各群 (n=6) の平均 ± 標準誤差で示した
 *P<0.05 (対照群との比較)

一方で、LPS 気管内投与 ARDS モデルにおいては、M30/M65 比は低くおもにネクロシスによって細胞死が生じていると考えられた。しかしながら、LPS 気管内投与モデルでは血漿中の CK18-M30, M65 と BALF 中の両マーカーの相関がみられたものの、LPS 腹腔内投与モデルでは血漿中の両マーカーが大きく増加し、BALF 中の濃度を反映しなかったことから、血漿中の CK18-M30, M65 濃度は肺以外の臓器障害の影響を強く受けることが明らかになった。

(2) マウス ARDS モデルに対する高容量換気が CK18-M30, M65 に与える影響

LPS 誘導性 ARDS モデルマウスに対して高容量換気を行うことで BALF 中のタンパク濃度、IgM 濃度、sRAGE 濃度が有意に増加したことから、肺胞上皮傷害が高容量換気に影響を受けることが示された。さらに、BALF 中の CK18-M65, M30 濃度についても有意に増加がみられ、M30/M65 比は低かったことから、人工呼吸が肺胞上皮細胞死、特にネクロシスに影響を与える可能性が示された。以上から、様々な条件で人工呼吸を受けた、同程度の重症度、臓器障害をもつ集中治療患者の血漿中の CK18-M65, M30 を測定することで、人工呼吸が肺胞上皮細胞死のパターンに与える影響を検討できる可能性があることが示唆された。



LPS 誘導性モデル動物に高容量換気を行った際の BALF 中の CK18-M65 および-M30
 データは各群 (n=3-4) の平均 ± 標準誤差で示した
 *P<0.05 (健常群との比較) †P<0.05 (ARDS+自発呼吸群との比較)

(3) 集中治療患者における CK18-M65, M30 濃度の測定

上記を踏まえると、CK18-M65, M30 マーカーを用いて ARDS 患者における肺胞上皮細胞死パターンを明らかにするためには、血液ではなく BALF を採取する必要があると考えられたがハードルが高く実現できなかった。また、喀痰を用いて検討することを考えたがこれについても実現できなかった。

また、人工呼吸が肺胞上皮細胞死に与える影響を血漿中の CK18-M65, M30 マーカーの測定することで明らかにできる可能性がある。予備的検討から示されたが、これについても実現することができなかった。

全体を通して、研究分担者によりマウス ARDS モデルマウスを用いて肺胞上皮細胞死マーカーの妥当性の検証を進めることができた。しかしながら、研究代表者の研究計画能力、遂行能力の不足により、実際のヒト ARDS もしくは集中治療患者における肺胞上皮細胞死パターンの検証は実現することができないまま、研究期間が終了してしまった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Tamada Nao, Tojo Kentaro, Yazawa Takuya, Goto Takahisa. Necrosis rather than apoptosis is the dominant form of alveolar epithelial cell death in lipopolysaccharide-induced experimental acute respiratory distress syndrome model. Shock. (査読あり)

54(1):128-139, 2020.

<https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001425>

〔学会発表〕(計3件)

玉田尚, 東條健太郎, 後藤隆久. ARDS における肺胞上皮細胞死はアポトーシス or ネクローシス?-LPS 誘導性 ARDS モデルを用いた検討-. 第46回日本集中治療医学会学術集会, (優秀演題賞受賞) 2019 .

Tamada Nao, Tojo Kentaro, Goto Takahisa. Necrosis rather than apoptosis is the dominant type of alveolar epithelial cell death in LPS-induced experimental ARDS. 39th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine, 2019.

鶴雄斗, 玉田尚, 東條健太郎, 後藤隆久. 高容量換気は ARDS における肺胞上皮細胞ネクローシスを増強する. 第47回日本集中治療医学会学術集会, 2020 .

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:東條 健太郎

ローマ字氏名:TOJO, Kentaro

所属研究機関名:横浜市立大学 部局名:医学部医学科 職名:講師

研究者番号(8桁): 80737552

研究分担者氏名:水原 敬洋

ローマ字氏名:MIHARA Takahiro

所属研究機関名:横浜市立大学 部局名:附属病院 職名:講師

研究者番号(8桁): 00637712

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 0件）

1. 著者名 Tamada Nao, Tojo Kentaro, Yazawa Takuya, Goto Takahisa	4. 巻 54
2. 論文標題 Necrosis Rather Than Apoptosis is the Dominant form of Alveolar Epithelial Cell Death in Lipopolysaccharide-Induced Experimental Acute Respiratory Distress Syndrome Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Shock	6. 最初と最後の頁 128 ~ 139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001425	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 玉田尚, 東條健太郎, 後藤隆久
2. 発表標題 ARDSにおける肺胞上皮細胞死はアポトーシスorネクローシス? -LPS誘導性ARDSモデルを用いた検討-
3. 学会等名 第46回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tamada Nao, Tojo Kentaro, Goto Takahisa
2. 発表標題 Necrosis rather than apoptosis is the dominant type of alveolar epithelial cell death in LPS-induced experimental ARDS
3. 学会等名 39th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鶴雄斗, 玉田尚, 東條健太郎, 後藤隆久
2. 発表標題 高容量換気はARDSにおける肺胞上皮細胞ネクローシスを増強する
3. 学会等名 第47回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2020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
研究 分担 者	水原 敬洋 (Mihara Takahiro) (00637712)	横浜市立大学・附属病院・准教授 (22701)	
研究 分担 者	東條 健太郎 (Tojyo Kentaro) (80737552)	横浜市立大学・医学部・講師 (22701)	