

平成21年 5月30日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590920

研究課題名 (和文) 細胞変形に伴う肺胞上皮損傷と Toll-like Receptors の役割

研究課題名 (英文) Role of toll-like receptors in alveolar epithelial injury induced by cell deformation.

研究代表者

梶 博久 (TOGA HIROHISA)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：90142554

研究成果の概要：

ラットを比較的大きな1回換気量(15-30ml/kg)で換気すると ventilator-induced lung injury (VILI)が起こった。その時に肺胞上皮細胞に Toll-like receptor-2 (TLR-2)、TLR-4 の発現増強が見られ、活性窒素酸化物、CXC chemokines の活性化を通して、NF-κB、アポトーシスを増強し肺胞上皮損傷が起こることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
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：呼吸器病学

1. 研究開始当初の背景

人工呼吸時に1回換気量を大きくする(15～30 ml/kg 体重)と急性呼吸窮迫症候群(ARDS)に類似した肺病変が起こることが知られており、ventilator-induced lung injury (VILI)と呼ばれている。VILIの原因は高い肺胞内圧や過剰伸展による直接的な肺組織の損傷・破綻と考えられてきた。しかし、ヒト ARDS において、直接圧伸展損傷を起こすとは考えに

くい従来どおりの1回換気量(12 ml/kg 体重)で換気しても、さらに小さな1回換気量(6 ml/kg 体重)の場合よりは生命予後が悪いことから、VILIの主因はむしろ炎症とそれに引き続く肺傷害の可能性が大きい。正常の陰圧呼吸とは異なり、機械呼吸では肺細胞は陽圧下にさらされ、さらに伸展、変形といったストレスを受ける。

Toll-like receptors (TLRs) は lipopoly-

saccharide (LPS)を始めとする有害物の分子構造を認識することが知られている(Science 1998;282:2085).

2. 研究の目的

(1) 正常肺または傷害肺を種々の1回換気量で陽圧換気したとき、肺組織傷害(VILI)がどのように増強されるかを評価する。この時、TLRs, 特にTLR-2, TLR-4の肺組織での発現および発現細胞種を同定する。

(2) TLR-4の特異的抑制物質であるeritoranを投与した時、このVILIの程度が変化するかどうかを明らかにする。

(3) ヒト肺またはラット肺から単離したII型肺胞上皮細胞(II型細胞)に陽圧、伸展変形の力学的ストレスを加え、細胞傷害、細胞死(アポトーシス)が起こるかを評価する。

(4) この時、II型細胞におけるTLR-2とTLR-4発現が変化するかを検討し、さらにlipoteichoic acid (LTA)とLPS添加によりTLRsが実際に機能しているかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Ventilator-induced lung injury (VILI)モデルの作成

麻酔下にラットを気管挿管し、気管内に少量の希塩酸(0.01M)またはエンドトキシン(LPS)を注入することにより肺傷害を誘発する。希塩酸投与ラットでは直後から、LPS投与ラットでは12時間後、1回換気量5~35 ml/kg体重、PEEP 0~15 cmH₂Oで1~6時間陽圧換気し、VILIを作成する。気管挿管しただけで自発呼吸としたラットをコントロールとする。

陽圧換気または自発呼吸後腹部大動脈から十分量の採血を行い脱血死させ、同PBSで肺血管を灌流後左主気管支を結紮し左肺を分離した後、右肺をPBS 5mlで3回気管

支肺胞洗浄(BAL)する。血液は血漿を分離し-80°Cで凍結保存する。BAL液(BALF)の細胞成分を分け上清を-20°Cで凍結保存し、BAL後の肺は-80°Cで凍結保存する。左肺は一部湿乾重量比を測定後4% paraformaldehyde固定、または-80°Cで凍結保存する。

肺組織の湿乾重量比、BAL細胞分画、BAL上清アルブミン、LDH濃度、肺組織切片のHematoxylin-Eosin染色所見から各群の肺傷害の程度を評価し、点数化する。

(2) II型肺胞上皮細胞の単離と力学的ストレス負荷

Dobbsら、Witherdenらの方法(J Clin Invest, 1979;63:378)に従い、ラットまたはヒト新鮮肺組織をエラスターゼ消化処理し、二層のメトリザマイドに重層することによりII型細胞を単離する。単離II型細胞を一昼夜コラーゲンで表面を覆ったシリコン膜上で培養後、付着した生存細胞を計数しておく。密閉した恒温箱内にII型細胞を置き、37°C, 21% O₂, 5% CO₂, N₂バランスの条件で、30~50 cmH₂Oの陽圧を15/分、1~6時間負荷する。同様にII型細胞を生着した培養膜を8回/分、1~6時間湾曲、伸展することにより力学的細胞伸展ストレスを負荷する。

負荷終了後、II型細胞からDNA, RNA, 蛋白を抽出し、一部の細胞ではDolmetschらの方法(Nature, 1997;386:855)に従い、核、細胞質を分離しそれぞれ蛋白を抽出する。培養上清は-80°Cで凍結保存する。

(3) Toll-like receptor (TLR)-2, TLR-4蛋白およびmRNA発現の評価

肺組織および単離II型細胞について、免疫染色およびフローサイトメトリーによりTLR-2, TLR-4蛋白の発現を検討する。

肺組織およびII型細胞から抽出したRNAについて、半定量reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)で

TLR-2 mRNA, TLR-4 mRNA の発現を検討し、イメージスキャンで半定量する。

肺組織について、in-situ hybridization (ISH)により TLR-2 mRNA, TLR-4 mRNA が肺のどのような細胞に発現しているかを観察し肺内局在について検討する。単離 II 型細胞についても同様に ISH を施行し TLR-2 mRNA, TLR-4 mRNA の発現を確認する。

(4) NO₂, NO₃ (NO_x)の定量

血漿, BAL 液上清, 培養液上清について, NO₂, NO₃ 濃度を liquid chromatography-Griess 法で測定する (Ishibashi T, Am J Physiol, 2001;281:H2757)。分離カラム, 還元カラム, Griess 反応液を含む流量反応器, 吸光検出計からなるシステムに資料液体を反応させ, 540nm での吸光度を測定することにより NO₂, NO₃ 濃度を測定できる。ヘモグロビンの存在は NO₂ ピーク測定値に干渉し, スペクトル基準値に影響し, 測定値を不正確にする。そのため資料に血液を含む時は, 溶血させ, それをあらかじめ C18 逆相カラムに通しておくことによりヘモグロビンの捉えこみをする事が出来る。

生理食塩水をはじめ溶媒として用いる水はすべて NO_x を含まないミリ Q 水を用いる。さらに NO₂, NO₃ 濃度測定に際しては, いつも当日使用したミリ Q 水の NO_x 濃度を対照として測定しスタンダードとして参照する。

(5) アポトーシスの検出と転写因子 (NF-κB)の解析

ストレス負荷後, 単離 II 型細胞を annexin V または propidium iodide で処理し, 4°C で 1 晩 incubate 後 flow cytometry でアポトーシスの定量を行う。

II 型細胞から抽出した DNA について agarose gel 電気泳動を行い, DNA ladder が観察することにより細胞にアポトーシスが

起こっているかを判定する。

II 型細胞から抽出した核蛋白についてゲルシフトアッセイにより NF-κB が核内に移動したかどうかを評価する。さらに, 抗 p50, p65 抗体の添加によるスーパーシフトを観察することにより, 活性化している主たる NF-κB サブユニットを同定する。

(6) CXC ケモカイン (IL-8, cytokine-induced neutrophil chemoattractants (CINC))の定量

血漿, BAL 液上清, 培養液上清について CINC を Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)で測定する。

(7) Lipopolysaccharide (LPS)または lipoteichoic acid (LTA)添加による II 型細胞の TLR-2, TLR-4 発現, 向炎症メディエータ, アポトーシスの変化

ヒトまたはラット単離 II 型細胞に LPS または LTA を添加した時, TLR-2, TLR-4 発現が変化するかを免疫染色, フローサイトメトリーで測定し, TLR-2 mRNA, TLR-4 mRNA 発現の変化を RT-PCR で半定量する。その時, 同細胞から放出される NO_x, CXC ケモカイン量を定量し変化を測定する。II 型細胞のアポトーシスを定量しアポトーシス頻度の変化を測定する。NF-κB の核内移動の有無と NF-κB サブユニットの同定を行う。

(8) TLRs 拮抗抑制による VILI の重症度の変化

TLR-4 の特異的拮抗物質である eritoran (Shimamoto, Circulation 2006;114:I270)を前投与しておき, VILI の重症度が変化するかどうか測定する。その時に CINC と NO_x の産生の変化も測定する。

4. 研究成果

(1) ラットを 1 回換気量 15-30 ml/kg 体重, PEEP 0 cmH₂O で 3 時間陽圧換気すると, 肺組織の湿乾重量比が上昇し,

broncho-alveolar lavage (BAL)細胞分画で好中球が増加し, BAL 上清蛋白濃度が上昇した. 組織所見では肺損傷が見られ, ventilator-induced lung injury (VILI)発症が確認された. あらかじめ, 気管内に少量のエンドトキシン(LPS)を注入しておく, VILI は増強した.

(2) VILI 発症肺組織では, 免疫染色により TLR-2 蛋白のごく弱い発現と TLR-4 蛋白の中等度の発現が見られた. 肺組織の reverse transferase-polymerase chain reaction (RT-PCR)で TLR-2 mRNA の発現の増強傾向があり, TLR-4 mRNA の発現が増強していた.

(3) ラット肺から単離した II 型肺胞上皮細胞(II 型細胞)に, 30~50 cmH₂O の陽圧を 15/分, 3 時間負荷すると, 負荷なしの細胞に比べて, 免疫染色で TLR-2 蛋白と TLR-4 蛋白の発現増強傾向が見られた.VILI 発症ラットでは, 対照ラットに比べて血漿および BAL 液上清中の NO₂, NO₃ 濃度が高かった.

(4) 以上の結果は, VILI では II 型細胞を始めとする肺細胞において TLR-2 と TLR-4 の発現が増強することを示唆している. また, その過程で NO₂, NO₃ などの活性窒素酸化物が動員されることを示している. これらの発現が VILI においてどのような役割をしているかをさらに明らかにしたい.

(5) VILI 発症肺組織から DNA を抽出し agarose gel 電気泳動を行うと, DNA ladder が観察され, 同細胞にアポトーシスが起きていることが示された.

(6) VILI 発症肺組織から II 型肺胞上皮細胞(II 型細胞)を単離し, 核蛋白を抽出し, ゲルシフトアッセイを行った. その結果, NF-κB の核内への移動が示され, NF-κB の活性化が示唆された. 抗 p50, p65 抗体によるスーパーシフトを観察したところ, 活性化している

主な NF-κB サブユニットは p50 である可能性が示された.

(7) 対照肺に比べて VILI 肺では, 血漿および BAL 上清の cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1)濃度が上昇していた. 抗 CINC-1 抗体による免疫組織染色では, 主として II 型細胞が陽性を示し, 同細胞での CINC-1 産生の増加が示唆された. ラット肺から単離した II 型細胞に, 30~50 cmH₂O の陽圧を 15/分, 3 時間負荷すると, 負荷なしの細胞に比べて, 免疫細胞染色で CINC-1 蛋白の発現増強傾向が見られた.

(8) 同細胞から抽出した DNA で agarose gel 電気泳動を行うと弱い DNA ladder の形成が認められ, アポトーシスが起きていることが示唆された.

(9) 以上の結果は, VILI では II 型細胞を始めとする肺細胞において CINC-1 の産生が増加し, 同細胞のアポトーシスが増強することを示唆している. 前回示した II 型細胞における TLR-2, TLR-4 の発現増強は, VILI において炎症性ケモカインの産生増加を通してアポトーシスの発現にも関与する可能性が示された.

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 7 件)

① Higashi K, Sakuma T, Ito K, Niho S, Ueda Y, Kobayashi T, Sekiguchi R, Takahashi T, Kato T, Tonami H: Combined evaluation of preoperative FDG uptake on PET, GGO components on CT, and serum CEA Level: Identification of both low and high risk for recurrence in patients with resected T1 lung adenocarcinoma. Eur J Nucl Med Molecul Imag 2009; 36:373-381.

査読有

② Xu J, Wang Z, Ma G, Sagawa M, Shimazaki M, Ueda Y, Sakuma T: Endogenous catecholamine stimulates alveolar fluid clearance in rats with acute pancreatitis. *Respirol* 2009; 14:195-202. 査読有

③ Ma G, Zhao X, Ueno M, Tanaka M, Machida Y, Aikawa H, Usuda K, Sagawa M, Ueda Y, Sakuma T: Increased reabsorption of alveolar edema fluid in obese Zucker rats. *Tohoku J Exp Med* 2008; 216:223-230. 査読有

④ Kanazawa Y, Ueda Y, Shimasaki M, Katsuda S, Yamamoto N, Tomita K, Tsuchiya H: Down regulation of *plakoglobin* in soft tissue sarcoma is associated with a higher risk of pulmonary metastasis. *Anticancer Res* 2008; 28:655-664. 査読有

⑤ Osanai K, Oikawa R, Higuchi J, Kobayashi M, Tsuchihara K, Iguchi M, Huang J, Toga H, Voelker DR: A mutation in Rab38 small GTPase causes abnormal lung surfactant homeostasis and aberrant alveolar structure in mice. *Am J Pathol* 2008; 173:1265-1274. 査読有

⑥ Wang Z, Xu J, Ma G, Sagawa M, Shimazaki M, Ueda Y, Sakuma T: Chronic pulmonary artery occlusion increases alveolar fluid clearance in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 134:1213-1219. 査読有

⑦ Matoba M, Tonami H, Kondou T, Yokota H, Higashi K, Toga H, Sakuma T: Lung carcinoma: diffusion-weighted MR imaging - preliminary evaluation with apparent diffusion coefficient. *Radiology* 2007;

243:570-577. 査読有

[学会発表] (計 3件)

① 戸部勇保, H. Toga, et al: Abnormal lung phenotype in Rab38-deficient rats, rodent models of Hermansky-Pudlak syndrome. FASEB Meeting, 2009, 4月19日, New Orleans.

② K. Osanai, R. Oikawa, J. Higuchi, T. Miwa, H. Toga: Rab38-deficient rats show phenotype of Hermansky-Pudlak syndrome. American Thoracic Society, 2007, 5月21日, San-Francisco.

③ 戸部勇保, 齋藤雅俊, 小島好司, 田中篤利, 舘由貴, 及川理恵子, 中川研, 土原一真, 井口晶晴, 関利満, 高橋昌克, 長内和弘, 黄正寿, 梅博久, Dobbs Leland: Expression of VEGF in alveolar type I and type II cell. 日本呼吸器学会学術講演会. 2007, 5月12日, 東京.

6. 研究組織

(1)研究代表者

梅博久 (TOGA HIROHISA)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号: 90142554

(2)研究分担者

上田善道 (UEDA YOSHIMICHI)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号: 50271375