

平成23年5月30日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390460

研究課題名（和文）人工呼吸器関連肺損傷に関連したバイオマーカーの検討

研究課題名（英文）Biomarkers associated with ventilator associated lung injury

研究代表者

橋本 悟 (Hashimoto Satoru)

京都市立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：90167578

研究成果の概要（和文）：

人口呼吸関連肺損傷に関連する各種バイオマーカーについて検討を加えた。臨床的には本病態でラミニン5 γ 2断片の著しい増加を認め、炎症性のペプチド分解酵素である neutral endopeptidase (NEP) 活性は血中では減少、肺胞内では増加することを認めた。基礎研究ではこれらに加え細胞外 ATP、モエシンについて検討を行い、これらのバイオマーカーも有用である可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

We studied several biomarkers that could predict the mortality or efficacy of therapy in patients with acute lung injury or acute respiratory distress syndrome (ALI/ARDS). For this aim, we conducted clinical and basic studies. In clinical studies, we sampled blood and alveolar epithelial lining fluid which was facilitated by the method of bronchoalveolar microsampling in ALI/ARDS patients. As a result, we found significantly higher amount of amino-terminal fragment of laminin gamma2-chain in blood and in epithelial lining fluids of patients with ALI/ARDS. And also, neutral endopeptidase (NEP) activity in ALI/ARDS patients were significantly lower compared to control group. In basic studies we conducted the experiments in similar lung injurious settings. In addition, extracellular ATP and moesin expression in association with lung injury were studied using mouse model. These studies confirmed our hypothesis that these biomarkers increase or decrease in accordance with the severity of the disease. Thus these biomarkers should be examined in a larger clinical trial whether it could useful for the physicians.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	11,200,000	3,360,000	14,560,000

研究分野：急性呼吸不全

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：人工呼吸器関連肺損傷、ラミニン5 γ 2断片、細胞外ATP、neutral endopeptidase (NEP) 活性、モエシン

1. 研究開始当初の背景

急性肺損傷/急性呼吸窮迫症候群(以下ALI/ARDS)は集中治療領域において未だ高い死亡率を示す疾患であり、その病態の早期解明および有効な治療方法の確立が望まれている。特に本来治療補助手段として必須であるべき陽圧人工呼吸に伴う人工呼吸関連肺損傷(以下VILI)はひとたび発生するとALI/ARDS治療をより一層困難なものとする。VILI予防および治療に関しては「肺保護戦略」が有用と考えられさまざまな人工呼吸法が提唱されているがこれらの方法を定量的に評価するための適切な手段はない。急性肺損傷に深く関連するバイオマーカーについてもその存在を示唆する報告は散見するも、臨床および基礎において現時点ではまだまだ解明すべき点が多いと考えられる。また申請者らは近年、臨床面において、申請者らはマイクロサンプリング法と呼ぶ方法を開発し、これを用い重症患者等から比較的簡便に肺上皮被覆液採取を可能とした。ラミニン5 γ 2は γ 2鎖の切断により細胞運動亢進作用を発揮する細胞外マトリックス構成細胞接着分子で上皮細胞から特異的に産生される。切断後の γ 2断片はヒト循環液中に遊離し細胞傷害のマーカーとして有用ではないかと考えられている。また炎症性のペプチド分解酵素であるneutral endopeptidase (NEP)活性は細胞傷害と密接に関連していることが示唆されている。さらに炎症反応を誘発する因子として細胞外アデノシン三リン酸(ATP)が最近注目されている。ATPは細胞内においてはエネルギー代謝の基質として重要であるが、刺激に応じて細胞外に放出されP2受容体と呼ばれるATP受容体を介してマクロファージや樹状細胞を活性化させサイトカインの分泌を促すといわれている。さらにモエシンは、互いに構造や機能の類似する他のタンパク質であるエズリン、ラディキシンとともにERM(ezrin/radixin/moesin)タンパク質ファミリーと総称され、細胞膜とアクチン細胞骨格とのリンカータンパク質としての役割を担っているが、組織損傷に伴う修復過程においてアクチン細胞骨格の再編成に深く関与しているとされる。

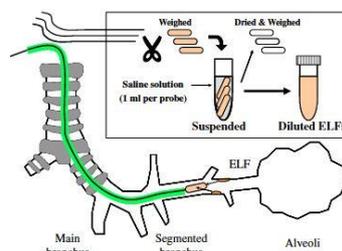
2. 研究の目的

本研究においては臨床面および基礎面の両方においてVILIの病態の解明およびその予防法、治療法を評価するための適切なバイオマーカーを得ることを目的とする。今回はラミニン5 γ 2鎖、細胞外ATP、モエシンについてVILIにおける各病期を反映するバイオマーカーとしての有用性を臨床および基礎の両面から検討することを目的とした。

3. 研究の方法

臨床研究

人工呼吸を余儀なくされたALI/ARDS患者を対象として採血及びELF採取を実施した。バイオマーカーとしては、ラミニン5 γ 2鎖分解物および炎症性のペプチド分解酵素である



neutral endopeptidase (NEP)活性を検討した。また一部の症例でエラスターゼ阻害剤投与中の血中の真のエラスターゼ活性を新しい方法で測定した。肺胞上皮被覆液は図に示すように、気管支ファイバーを用いて細気管支レベルにファイバー先端を位置させ、鉗子口から挿入した、マイクロサンプリングプローブから採取した。さらに時系列で末梢血を採取し血中濃度の測定を行った。

基礎研究

培養肺上皮細胞に各種増殖因子を添加しラミニン5 γ 2鎖分解物の産生を検討した。NEP活性については塩酸によるマウス肺傷害モデルを作成し、医って時間の人工呼吸後に肺、血中のNEP活性を計測した。ATPについては人工呼吸中のマウスにATPを気管内投与しその肺損傷の程度を計測するとともに、高容量換気後の肺を用いて細胞外ATP濃度を測定した。またP2受容体拮抗薬投与によりこれらの作用に変化があるかを検討した。次にモエシン欠損マウスを用い、ブレオマイシン肺傷害を作成し、野生型マウスと比較した。

4. 研究成果

ALI/ARDS患者において血中及び肺胞上皮被覆液中のラミニン5 γ 2鎖分解物はコントロールおよび他の肺疾患に比して有意に高値を示し、また予後不良群で持続的な高値を示したことから本バイオマーカー測定の有用性が示された。また培養上皮細胞における実験ではEGF添加によりラミニン5 γ 2鎖分解物の産生増加が認められEGFとの密接な関係が示唆された。NEP活性についてはALI/ARDS患者の血中における活性は有意に減少した。本現象をマウス塩酸肺傷害モデルによって検証したところ、肺内のNEP活性はむしろ上昇することが示され、そのために逆説的に血中濃度が減少することが証明された。これにより血中NEP活性の現象が肺傷害の程度を示唆しうる可能性が示された。高容量換気モデルにおいて気管支肺胞洗浄液中の細胞外ATP

は有意に増加したが、細胞外 ATP 直接気管内投与にても同程度の傷害が起きることが示され、また P2 受容体拮抗薬投与によってこれらの傷害は軽減することが示され細胞外 ATP のバイオマーカーとしての有用性が示唆された。モエシン欠損マウスは従来その表現型が野生型マウスと変わらないと言われていたが、長期間飼育により著明な肺胞拡大を来すことが分かった。次に野生型では軽度の線維化を来す程度の少量のブレオマイシン気管内投与で、モエシン欠損マウスは著明な肺線維化を伴う肺傷害を来すことが示されモエシンが肺傷害修復期点に重要な役割を担っていることが示された。ATP およびモエシンについては今後臨床面においてバイオマーカーとしての有用性が検証されるべきと考えられた。

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 6 件)

- ① Hashimoto S, Okayama Y, Shime N, Kimura A, Funakoshi Y, Kawabata K, Ishizaka A, Amaya F: Neutrophil elastase activity in acute respiratory distress syndrome. *Respirology*, 13(4): 581-4, 2008 (査読有)
- ② Hashimoto S, Amaya F, Matsuyama H, Ueno H, Kikuchi S, Tanaka M, Watanabe Y, Ebina M, Ishizaka A, Tsukita S, Hashimoto S: Dysregulation of lung injury and repair in moesin-deficient mice treated with intratracheal bleomycin. *Am J Physiol* 295(5): L566-574, 2008 (査読有)
- ③ Matsuyama H, Amaya F, Hashimoto S, Ueno H, Beppu S, Mizuta M, Shime N, Ishizaka A, Hashimoto S: Acute lung inflammation and ventilator-induced lung injury caused by ATP via the P2Y receptors: an experimental study. *Respiratory*

Research. 9:79, 2008 (査読有)

- ④ Hasegawa N, Nishimura T, Watabnabe M, Tasaka S, Nakano Y, Yamazaki K, Hashimoto S, Nishimura M, Ishizaka A. Concentrations of clarithromycin and active metabolite in the epithelial lining fluid of patients with mycobacterium avium complex pulmonary disease. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 22(3):190-193, 2009 (査読有)
- ⑤ Katayama M, Ishizaka A, Kotani K, Ware L, Matthay M, Hashimoto S. Laminin γ 2 fragments are increased in the circulation of patients with early-phase acute lung injury. *Intensive Care Med* 36(3):476-86, 2010 (査読有)
- ⑥ Hashimoto S, Amaya F, Oh-Hashi K, Kiuchi, K, Hashimoto S. Expression of neutral endopeptidase activity during clinical and experimental acute lung injury. *Respir Res* 11:164. 2010 (査読有)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 悟 (Hashimoto Satoru)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 90167578

(2) 研究分担者

志馬 伸朗 (Shime Nobuaki)

京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号: 00260795

天谷 文昌 (Amaya Fumimasa)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：60347466

上野 博司 (Ueno Hiroshi)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：20381965

石坂 彰敏 (Ishizaka Akitoshi)
慶応義塾大学・医学部・教授
研究者番号：90176181

長谷川 直樹 (Hasegawa Naoki)
慶応義塾大学・医学部・講師
研究者番号：20198724