

機関番号：33303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591678

研究課題名（和文） 肺傷害におけるβ受容体機能再生メカニズムの研究

研究課題名（英文） The mechanisms responsible for the recovery of the beta-adrenoceptor function in the alveolar epithelium of lung injury

研究代表者

佐久間 勉 (SAKUMA TSUTOMU)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：90215674

研究成果の概要（和文）：肺傷害において肺胞上皮細胞肺水分再吸収（肺胞水分クリアランス）を促進するβ受容体機能の再生機序を研究した。RAGE(Receptor for advanced glycation end-products)ノックアウトマウスではRAGEはVentilator-induce lung injuryに関与しない。腎不全ラットではβ受容体機能は維持され、内因性カテコールアミンの分泌亢進によりβ受容体機能を亢進した。グルタミン酸により肺胞水分クリアランスは低下するため、腎不全におけるアミノ酸投与は肺胞上皮細胞機能に影響する。海水中の高マグネシウム濃度により肺胞水分クリアランス機能とβ受容体機能は変化しないため、溺水患者におけるβ交感神経刺激薬の有用性が示唆された。ヒト肺ではアクアポリン（水チャンネル）は肺癌の増殖と転移に関与する可能性が示唆された。肺傷害におけるβ受容体機能再生メカニズムの研究は重要である。

研究成果の概要（英文）：The mechanisms responsible for the recovery of beta-adrenoceptor in the alveolar epithelium were studied in the lungs with lung injury. First, we studied the role of RAGE (Receptor for advanced glycation end-products) in the knockout mice without RAGE and found that RAGE did not play a role in ventilator-induced lung injury in mice. Second, the function of alveolar fluid clearance decreased in rat with renal failure. But, the endogenous catecholamine in the rat with renal failure increased alveolar fluid clearance and played an important role in the prevention of pulmonary edema. Third, since glutamic acid decreased basal alveolar fluid clearance in rats and beta-2 adrenergic agonist increased alveolar fluid clearance in rats with an administration of glutamic acid, it is suggested that glutamic acid should not be administered in patients with pulmonary edema and lung injury. The balance of amino acid may be important to maintain the function of alveolar fluid clearance. Fourth, the high concentration of magnesium as that in seawater did not change basal alveolar fluid clearance and the function of beta-adrenergic agonist in alveolar fluid clearance. The beta-adrenergic agonist may be a potent agent in the treatment of drowned people of seawater. Finally, aquaporin played an important role invasion and metastasis of lung cancer. This study indicates that it is important to study the mechanism responsible for the recovery of beta-adrenoceptor in lung injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：肺傷害、 $\beta$ 受容体、肺胞水分クリアランス、肺胞上皮細胞、再生

### 1. 研究開始当初の背景

急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) をはじめとする肺傷害の致死率が高い。それは内科医や救急医療医のみならず、近年の肺癌手術件数の増加に伴う呼吸器外科関連肺傷害（急性呼吸窮迫症候群，肺水腫，虚血再灌流肺傷害，誤嚥性肺炎，無気肺，薬剤誘発性肺炎，間質性肺炎など）として呼吸器外科医を悩ませている。これまでに急性肺傷害の発症を防止する様々な治療方法が試みられてきたが，Low tidal volume ventilation 以外に有効な方法は確立されていない。申請者らは 1989 年以来肺胞上皮細胞を介する肺胞水分再吸収機序（肺胞水分クリアランス）を研究し成果を報告してきた。米国 NHLBI ARDS Network (<http://www.ardsnet.org/>) では肺傷害に対するサルブタモール（ $\beta$  2 刺激薬）吸入療法の臨床治験が平成 19 年 8 月から開始された。これは肺胞水分クリアランスを亢進させる治療法が肺傷害患者の予後を改善するか否かを定める注目の大規模臨床治験である。この治験の開始に際しては、申請者が報告したヒト切除肺での肺胞水分クリアランス (Am J Respir Crit Care Med 1994, 1997) が大いに貢献した。申請者らが開発した肺胞水分クリアランス測定方法は独創的であると海外でも評価されている。特にヒト肺での成績は高く評価され、多くの論文に引用されている。その独創性を発展させる。

### 2. 研究の目的

肺胞上皮細胞の  $\beta$  受容体と肺胞上皮細胞受容体の間に介在する機序を解明し、

$\beta$  受容体機能の再生機序を解明し、再生あるいはレスキュー治療法を開発することであった。第一に RAGE (Receptor for advanced glycation end-products) が Ventilator-induced lung injury (VILI) に重要な役割を果たすか否かを明らかにした。第二は腎不全誘発肺傷害 (American Thoracic Society 2007 International Conference) では  $\beta$  刺激薬の効果が喪失あるいは減弱した。その事実を踏まえて、腎不全モデルでアミノ酸の役割と内因性カテコールアミン、 $\beta$ 2 受容体機能の再生機序を解明して、その治療法を開発することであった。特に、栄養素（グルタミン酸ナトリウム）の経気道的投与による  $\beta$  受容体機能に及ぼす影響を明らかにして治療法の可能性を研究した。第三は溺水誘発肺傷害の治療法を開発するため、海水中のマグネシウムが肺胞水分クリアランスと  $\beta$  受容体機能に及ぼす影響を明らかにした。

### 3. 研究の方法

- (1) RAGE : RAGE ノックアウトマウス（金沢大学より提供）を飼育繁殖した。麻酔後気管切開を施行し、人工呼吸管理とした。一回換気量を 6 ml/kg、12 ml/kg、28 ml/kg で 120 分換気した。体温を 36-37°C に維持した。換気後マウスを屠殺して両側肺を摘出して 80°C のオーブンにて 72 時間乾燥し、乾湿重量法にて肺水分量を計算し、肺傷害の程度を測定した。対照として Wild type マウス (C57BL/6J) を同じ条件に暴露して同様の研究を行った。
- (2)  $\beta$  受容体の実験 : Alzet Osmotic Pump を用いて、 $\beta$  受容体遮断薬の持続注入モデルを作成した。そのポンプを使用すると約 1 週間の持続注入実験が可能であることを証明する研究をおこなった。

(3) 腎不全傷害肺モデル：腎不全肺傷害モデルを作成した。ラットを麻酔科に左右腎動脈を結紮して、24時間後と48時間後に血液を採取して、BUN、血清クレアチニン、血漿カテコールアミン（アドレナリン、ノルアドレナリン、ドーパミン）濃度を測定した。屠殺して肺を摘出し、肺胞水分クリアランスを測定した。 $\beta$ 交感神経遮断薬（プロプラノロール）、ナトリウムチャンネルブロッカー（アミロライド）、ナトリウムポンプブロッカー（ウアバイン）の効果を研究した。

(4) アミノ酸の研究：5%アルブミンを含む生理食塩水にグルタミン酸ナトリウムを溶解し、ヒト切除肺とラット切除肺に気道内投与した。その肺を純酸素にて膨張させ、摂氏37°Cに1時間維持した。1時間後に気道内注入液を採取してグルタミン濃度と肺胞内液量変化からグルタミン酸吸収量を計算した。肺胞水分アルブミン濃度の変化より肺胞水分クリアランスを測定した。

(5) マグネシウムの研究：地震による津波では溺水による死亡が多い。海水にはMgが多く含まれ、溺水では肺胞内Mg濃度が上昇する。ラット肺でMgが肺水腫改善に及ぼす影響を研究した。ラットより肺を摘出し、0、5、10 mg/dlのMgを含む生理食塩水を注入して、肺を准酸素で膨張させた。37°Cに1時間維持し、気道内注入液を採取して、肺胞水分クリアランスを測定した。

(6) ヒト切除肺での研究：ヒト切除肺でのアクアポリンの機能を研究するため、肺癌のため切除した肺でアクアポリン1、3、5の発現を研究した。アクアポリンの発現は免疫組織学的検査法、RT-PCR法を用いて行った。また、肺癌細胞における発現を研究するため、過去に採取保存した標本組織を使用して癌細胞での発現を研究した。アクアポリンの発現と術後再発の関連を研究した。

#### 4. 研究成果

(1) RAGEノックアウトマウスでの研究：RAGEノックアウトマウス（N=150）の繁殖はWild typeマウスと同様であり飼育中の易感染性は認められなかった。肺傷害の指標である肺湿乾重量比は一回

換気量6 mg/kgでは平均3.3 g/g、12 ml/kgでは平均3.8 g/g、28 ml/kgでは平均4.5 g/gと一回換気量に比して有為に増加し、換気量依存性の肺傷害を認めた。しかし、ノックアウトマウスとWild typeマウスでは有為差がなかった。次に、肺胞水分クリアランスを測定して、 $\beta$ 1交感神経刺激薬デノパミンと $\beta$ 2交感神経刺激薬テルブタミンの効果を比較した。その結果、肺湿乾重量比、肺胞水分クリアランス、テルブタリン効果、デノパミン効果ともノックアウトマウスとWild typeマウスで有為差がなかった。このことより、RAGEはVILIに関与しない事が示唆された。

(2)  $\beta$ 1受容体の役割の研究：Alzet Osmotic Pumpを用いて、 $\beta$ 1受容体遮断薬の持続注入モデルを作成することができた。そのポンプを使用すると約1週間にわたりポンプは正常に機能し、長時間薬物持続注入研究が可能であることが判明した。

(3) ラット肺傷害モデルでの研究：血清BUN、クレアチニンは時間経過に伴って上昇し、BUN値は100mg/dl、クレアチニンは8mg/dl以上に上昇した。肺胞水分クリアランスは増加した。 $\beta$ 交感神経刺激薬により肺胞水分クリアランスは亢進した。肺を摘出し標本作製した。その標本で、 $\beta$ 受容体、アクアポリン1、3、5を免疫染色中である。また、肺のmRNAを抽出しており、 $\beta$ 受容体の発現、アクアポリンの発現を測定中である。

(4) アミノ酸が肺胞上皮細胞機能に及ぼす影響の研究：ラット肺を摘出して、グルタミン酸が肺胞水分クリアランスに及ぼす影響を研究した。その結果、グルタミン酸は肺胞水分クリアランスを低下させ、肺水腫の改善が遅延させた。腎不全肺傷害ラットでは、血清BUN、クレアチニンは時間経過に伴って上昇し、肺胞水分クリアランスは減少する。これにはアミノ酸代謝異常が関与している可能性が示唆された。しかし、腎不全時には内因性カテコールアミンの放出により、肺胞水分クリアランスは増加し、肺水腫の改善に寄与する。また、 $\beta$ 交感神経刺激薬により肺胞水分クリアランスは亢進した。この研究では、腎不全肺傷害ではアミノ酸代謝異常の治療を推進するとともに、 $\beta$ 刺激薬投与による肺水腫の治療が重要であることが示唆された。

(5) マグネシウムが肺胞水分クリアランスに

及ぼす影響の研究：5 mg/dl、10 mg/dl のMgにより肺胞水分クリアランスは変化しない。また、 $\beta$ 交感神経刺激薬の肺胞水分クリアランス亢進機能にも影響を及ぼさない。この研究では、海水の溺水に対して $\beta$ 交換神経刺激薬治療は肺胞内水腫改善に有効であることが示唆された。（研究進行中）

- (6) ヒト切除肺での研究：肺癌浸潤部ではアクアポリン1の細胞膜発現が亢進していた。その発現は術後再発率と挿管した。癌細胞の分化、浸潤増殖、転移に水分クリアランスの因子であるアクアポリンが重要な役割を果たしていることが示唆された。

#### 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4件)

- ① Gu X, Li P, Liu H, Li Na, Li S, Sakuma T. The effect of influenza virus A on Th1/Th2 balance and alveolar fluid clearance in pregnant rats. *Exp Lung Res*, 査読有, 2011 (in press).
- ② Machida Y, Ueda Y, Shimasaki M, Sato K, Sagawa M, Katsuda S, Sakuma T. Relationship of aquaporin 1, 3, and 5 expression in lung cancer cells to cellular differentiation, invasive growth, and metastasis potential. *Hum Pathol*, 査読有, 42: 669-678, 2011.
- ③ 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. *Respirology*, 査読有, 14: 195-202, 2009.
- ④ Ma Gang, 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

rat. *Tohoku J Exp Med*, 査読有, 216, 223-230, 2008.

[学会発表] (計1件)

町田雄一郎, 趙希形, 島崎 都, 上田善道, 上野正克, 田中 良, 相川広一, 薄田勝男, 佐川元保, 佐久間勉 肺癌組織における水チャンネル (アクアポリン) 発現の研究 日本肺サーファクタント・界面医学会第45回学術研究会 2009年10月3日 金沢市

[図書] (計1件)

佐久間勉 医歯薬出版株式会社 東京 ALI/ARDSと肺胞水分クリアランス. 最新ARDSのすべて. 別冊・医学のあゆみ 石井芳樹編 2010 pp84-90.

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐久間 勉 (SAKUMA TSUTOMU)  
金沢医科大学・医学部・教授  
研究者番号：90215674