

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21592007

研究課題名（和文） 脂肪組織由来ストローマ細胞による急性肺傷害の治療

研究課題名（英文） Therapy for acute lung injury by adipose-tissue derived stromal cells

研究代表者

藤野 裕士（FUJINO YUJI）

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：50252672

研究成果の概要（和文）：鎮静薬であるミダゾラムが骨髄に由来する樹状細胞に対して与える影響を詳細に解析し、さらに樹状細胞によって引き起こされる個体レベルでの免疫応答にミダゾラムは影響しうることを示した。さらにミダゾラムの樹状細胞に対する作用は GABA 系を介したのではなく、末梢性ベンゾジアゼピン受容体のシグナル伝達を介したものであることを示唆する結果を得た。また急性肺傷害の際に自発呼吸を温存した人工換気法を採ることの意義をウサギの急性肺傷害モデルを用いて解析を行った。この実験では肺に保護的な人工換気戦略を採用している状況でも自発呼吸努力を不適切に温存すると、肺の機能的予後を悪化させる実験結果が得られた。この実験により自発呼吸の温存は急性肺傷害の予後に悪い影響をあたえる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Midazolam inhibits the functional maturation of murine DCs and interferes with DC induction of T helper 1 immunity in the whole mouse. Further, by the use of rabbit model of acute lung injury, we elucidated the role of maintaining spontaneous breathing for the progression of acute lung injury. Even in the lung-protective strategy for acute lung injury, the inadequate maintenance of spontaneous ventilation can make clinical outcome worse.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 麻酔・蘇生学

キーワード：急性肺傷害、人工呼吸器、自発呼吸

骨髄由来樹状細胞、Th1 型免疫応答、鎮静薬

ミダゾラム

1. 研究開始当初の背景

(1) 鎮静や麻酔が動物個体の免疫能に影響するのかという問題は古くからある問題である。この問題に関連して鎮静薬の様々な免疫細胞に対する影響を調査した研究は今までに数多くなされてきた。しかしながら最も強力な抗原提示細胞として知られ、強力な免疫制御作用を持つ、樹状細胞に対する影響を調

べた研究は皆無であった。また鎮静と麻酔の免疫系への影響を解析した研究は主として試験管内での免疫細胞に対する影響を解析したものが殆ど全てであった。そのために試験管内では麻酔薬、鎮静薬は免疫細胞に影響をするが、個体レベルの免疫応答に対して鎮静薬が影響しうるのかは疑問視されていた。

(2) 急性肺傷害にたいする人工呼吸の肺保護

的戦略の重要性は広く知られているところである。しかしながら、急性肺傷害に対する管理に際して人工呼吸は不可欠であるが、肺保護的換気戦略を採用しているときに自発呼吸を温存することの意義は不明であった

2. 研究の目的

(1) 樹状細胞に対する鎮静薬の影響を詳細に解析するとともに、樹状細胞により惹起される個体レベルでの免疫応答に鎮静薬が関与するかを解析する実験系を確立してその差異を解析する

(2) 急性肺障害に対する肺保護的人工換気戦略を施行中に自発呼吸を温存した人工呼吸法を施行中に、強い自発呼吸か弱い自発呼吸かのいずれを用いたほうが急性肺傷害の人工呼吸法として適切であるのかを、ウサギの急性肺傷害モデルによる解析から明らかにする

3. 研究の方法

(1) ①マウスの骨髄細胞を GM-CSF の存在下に 7-9 日間培養して、骨髄由来の未熟樹状細胞を誘導する

②未熟樹状細胞にグラム陰性菌の菌体成分であるリポ多糖(LPS)を投与して分化成熟させる。この過程にミダゾラムで処理する群を作成する

③樹状細胞の機能の解析には、樹状細胞表面に発現される T 細胞副刺激分子 (CD80, CD86) と組織適合抗原複合体 (MHC) の発現の変化とインターロイキン 1 2 の分泌を解析する

④表現型の変化した樹状細胞が T 細胞に対する刺激能に変化を生ずるのかを、T リンパ球と樹状細胞の混合細胞培養法によって解析した。T リンパ球の増殖刺激と T リンパ球からの Th1 型サイトカインであるインターフェロン- γ の産生を ELISA 法によって解析した。

⑤個体レベルでの免疫応答に対するミダゾラムの作用を明らかにするために、接触過敏症の動物実験モデルを用いた解析を導入する。ここではさらに樹状細胞の移植によって発症する接触過敏反応モデルを確立した。このモデルを用いてミダゾラムで処理した樹状細胞とミダゾラムで非処理の樹状細胞の間で、誘導されてくる接触過敏反応がどのように異なるのかを追跡した

⑥樹状細胞に対するミダゾラムの作用がどのようなメカニズムを介しているのかを、末梢性ベンゾジアゼピン受容体と中枢性ベンゾジアゼピン受容体の特異的作動薬を用いた解析を行う。樹状細胞の誘導過程に樹状細胞に対してこれらの作動薬を作用させ、樹状細胞に発現される表面抗原 CD86 の変化を解析することで評価を行った

⑦樹状細胞に末梢性ベンゾジアゼピン受容体が存在することの証明としてメッセンジャー RNA レベルで末梢性ベンゾジアゼピン受

容体の存在を RT-PCR 法によって証明する

(2) ウサギを用いた人工呼吸による肺傷害モデルを確立し、このモデルを用いて自発呼吸の意義を解析するために以下のような実験群を作成した

①低一回換気量(LTV)人工呼吸+弱い自発呼吸 (SBweak)

②低一回換気量(LTV)人工呼吸+強い自発呼吸 (SBstrong)

③高一回換気量(MTV)人工呼吸+弱い自発呼吸 (SBweak)

④高一回換気量(MTV)人工呼吸+強い自発呼吸 (SBstrong)

これらの実験群に対して以下のようなパラメータを測定して肺傷害の程度を比較した。肺の含気の程度を組織学的検索により組織学的スコアリングによって解析比較する。ガス交換能の機能的モニタリングとして人工呼吸中の経時的な血液ガスの測定と肺コンプライアンス測定によって肺の機能的なモニタリングを行った。

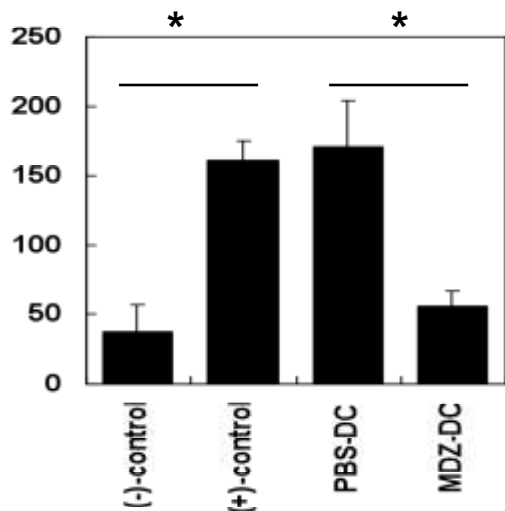
4. 研究成果

(1) ①ミダゾラムによって骨髄由来の樹状細胞上の T 細胞刺激分子である CD80, CD86, CD40, と組織適合上限複合体クラス II の発現は低下した。さらに樹状細胞によって産生されるインターロイキン 1 2 p40 の分泌はミダゾラムの処理によって低下した。これらからミダゾラムはリポ多糖による樹状細胞の分化成熟を抑制したことが解った。一方でミダゾラムの処理によって FITC デキストランの食能は亢進したことから、ミダゾラムが樹状細胞の機能を非特異的に抑制している結果でないことは示された。以上よりミダゾラムは樹状細胞の分化成熟を抑制することが示唆された

②C57BL/6 マウスから採取した樹状細胞と Balb/C マウスから採取した T リンパ球の細胞混合培養法アッセイにより、樹状細胞の性質の変化が T 細胞応答に同影響するのかを解析した。ミダゾラムで処理した樹状細胞は T 細胞への増殖刺激能が低下することをアラマーブルーによる非 RI 増殖アッセイ法によって明らかにした。また T 細胞からのインターフェロン γ の産生を培養上清を ELISA 法で測定することで解析すると、インターフェロン γ の産生は抑制されていた。これらからミダゾラムで処理した樹状細胞は T 細胞に対する Th1 型免疫応答の誘導能が低下していることが解った

③次に樹状細胞の移植によって引き起こされる接触過敏症モデルを用いた解析を行った。このモデルの発症の発生病理には Th1 型免疫応答がその発症の中心にあることが明確になっているモデルである。このモデルはハプテン (誘発に用いるハプテンの水溶性類似体) を取り込ませた樹状細胞をマウスに投

与して免疫し（感作相）その数日後にマウスの耳介にハプテンを塗布すると（誘発相）耳介が腫脹するというモデルである（左図 PBS-DC）。この腫脹の強弱によって誘発されてきた Th1 型応答の強度を比較検討することが可能である。ミダゾラムで予め処理しておいた樹状細胞でこのモデルを誘導すると接触過敏反応の誘導（耳介の腫脹）が低下した（左図 MDZ-DC）。これは樹状細胞によって個体レベルに生じる Th1 型免疫応答をミダゾラムが抑制したことを示している



(図) 縦軸は耳介の腫脹(μm)を示す。(-)コントロールは担体を腹部に塗布してハプテンの感作を行わずに、誘発のみ行った物。(+)コントロールは腹部にハプテンを塗布した後、耳介にハプテンを塗布する、古典的な接触過敏反応を誘導させた物。PBS-DC は薬剤の処理なく樹状細胞を誘導させた群、MDZ-DC はミダゾラムで処理して樹状細胞を誘導した群である

④末梢性ベンゾジアゼピン受容体作動薬である PK11195 と Ro5-4868 を樹状細胞の誘導過程に作用させると樹状細胞に発現される CD86 の発現は低下した。一方で中枢性ベンゾジアゼピン受容体作動薬であるクロルジアゼパムを誘導過程で作用させても発現される CD86 に変化はなかった。これらから樹状細胞の分化成熟過程には中枢性ベンゾジアゼピン受容体-GABA 系ではなく末梢性ベンゾジアゼピン受容体のシグナル伝達が関与していることが示唆された

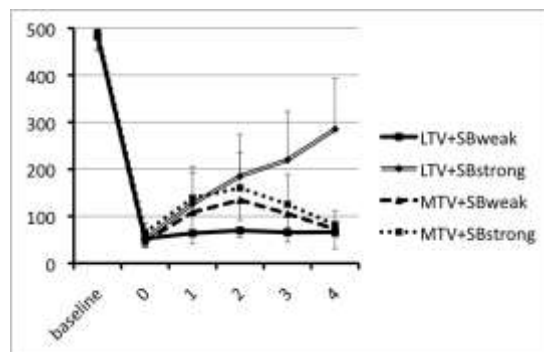
⑤樹状細胞からメッセンジャーRNA を抽出して末梢性ベンゾジアゼピン受容体に特異的なプライマーを用いて RT-PCR 法を行うと末梢性ベンゾジアゼピン受容体に特異的な

mRNA が検出された。④と⑤より樹状細胞にはベンゾジアゼピン受容体が存在し、ミダゾラムはこの系をかいして樹状細胞の分化成熟に影響を与えていることが示唆された

(2) ①ウサギの人工呼吸による実験的な急性肺傷害モデルを実行中に自発呼吸を温存することは今までは非常に困難であった。この問題点に対して、新しい鎮静薬であるデクスメトミジンを利用した鎮静法を導入することで、この問題点を克服することができた。また自発呼吸の強弱は呼吸促進薬であるドキサプラムを併用することで達成した。自発呼吸の程度、いいかえると自発呼吸努力は P.1 を測定することで計測した

②実験をおこなった実験群のうち LTV+SBweak 群は最も組織学的検索による肺含気が良好で、さらに機能的にもガス交換能と肺コンプライアンスは保持されていた。一方で MTV+SBstrong 群では組織学的検索による無気肺の形成が著しかった。さらにこの実験群では肺コンプライアンスの低下とガス交換能からみる肺の機能の低下が著しかった。また加えてこの群では組織学的に肺への著しい多核白血球の浸潤が最も著しかった。また肺傷害の程度のさほど強くない LTV+SBstrong 群ではもっともガス交換が維持されかつコンプライアンスの低下も軽度であった。

今回の実験では実際の気道内圧としては全て 30cmH₂O 以下に抑えており、他の換気力学的パラメーターからも肺保護的換気戦略にのっとった人工呼吸法を行っていた。しかしながら呼吸生理学的計測によって測られた肺胞にかかる圧は MTV+SBstrong 群ではどのマウスでも 30cmH₂O を超えた高い圧がかかっていることがわかった。すなわち一見すると肺保護的換気戦略は成立しているようには見えても、強い自発呼吸によって肺胞にかかる圧は予想外に大きくなっている可能性が示唆された。



(図) 縦軸は P/F 比、横軸は人工呼吸開始からの時間を示す

③本研究の LTV+SBweak 群の実験結果から肺傷害が軽度であるときは自発呼吸の温存は肺傷害の進展にとって保護的に作用しガス交換や肺の含気にとって有利である可能性が示唆された。肺傷害が軽度であるときに適切な自発呼吸の維持は肺傷害の予後に良い影響を与えることが LTV+SBstrong の結果から示唆された。一方で肺傷害が重度である時には自発呼吸の温存は肺傷害を進展させる要素として働く可能性が示唆された。しかしながら実際の臨床上は肺傷害が軽度であるか重度であるのか、あるいはどの患者に弱い自発呼吸を温存すればよいかといったことは的確に検出評価をすることは不可能であり患者によって換気法を最適化する方法がない。よって自発呼吸を残した人工呼吸管理を行っている時は実際には肺保護的な人工呼吸法が達成できていない可能性があることを考慮する必要がある。

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. Crit Care Med. 2012 40:1578-85.
査読有
Spontaneous breathing during lung-protective ventilation in an experimental acute lung injury model: high transpulmonary pressure associated with strong spontaneous breathing effort may worsen lung injury.
Yoshida T, Uchiyama A, Matsuura N, Mashimo T, Fujino Y.
2. Anesthesiology. 2011 114:355-62.
査読有
Midazolam suppresses maturation of murine dendritic cells and priming of lipopolysaccharide-induced T helper 1-type immune response.
Ohta N, Ohashi Y, Takayama C, Mashimo T, Fujino Y.
3. Anesth Analg. 2011 113:529-33.
査読有
The effect of ventilator performance on airway pressure release ventilation: a model lung study.
Yoshida T, Uchiyama A, Mashimo T, Fujino Y.
4. Anesth Analg. 2009 109:793-800.
査読有
Ketamine inhibits maturation of bone marrow-derived dendritic cells and

priming of the Th1-type immune response.
Ohta N, Ohashi Y, Fujino Y.

[学会発表] (計 5 件)

1. 敗血症は粘膜免疫応答を低下させる
第 39 回日本集中治療医学会学術総会
2012. 3. 1 千葉
大田典之、山中秀則、高山千尋、後藤幸子、井口直也、平松大介、真下節、藤野裕士
2. プロポフォールは樹状細胞によって惹起される Th1 型免疫応答を促進する
第 39 回日本集中治療医学会学術総会
2012. 3. 1 千葉
山中秀則、大田典之、高山千尋、後藤幸子、井口直也、平松大介、真下節、藤野裕士
3. 樹状細胞の機能に対する鎮静薬の影響の多様性
第 38 回日本集中治療医学会学術総会
2011. 2. 26 横浜
大田典之、山中秀則、高山千尋、後藤幸子、井口直也、平松大介、内山昭則、藤野裕士
4. ミダゾラムは樹状細胞によって惹起される Th1 型の免疫応答を抑制する
日本麻酔科学会 第 57 回学術総会
2010. 6. 3 福岡
大田典之
5. 臨床使用濃度のミダゾラムは樹状細胞によって起こる Th1 型免疫応答を抑制する
第 37 回日本集中治療医学会学術総会
2010. 3. 6 広島
大田典之、井口直也、植田一吉、平尾収、後藤幸子、内山昭則、高山千尋、藤野裕士
6. 研究組織
(1) 研究代表者
藤野 裕士 (FUJINO YUJI)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号：50252672
(2) 研究分担者
大田 典之 (OHTA NORIYUKI)
大阪大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60379162

平尾 収 (HIRAO OSAMU)
大阪大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：10362617
(平成 22 年度まで研究分担者として参画)