

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25年4月30日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590630

研究課題名（和文） 酸素中毒に於ける肺線維化病態の解明

研究課題名（英文） Molecular pathophysiology of pulmonary fibrosis in oxygen poisoning

研究代表者

島田 一郎 (SHIMADA ICHIROH)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：20272908

研究成果の概要（和文）：

マウス（8週齢、雄、C57BL/6J）を、酸素濃度を変えられる密閉箱内で、高濃度酸素の持続曝露あるいは酸素濃度の急激な変化に類似させた実験条件下で適宜飼育したが、明らかな肺線維化モデルマウスは作製出来なかった。

高濃度酸素曝露で誘導されたマウスの瀰漫性肺胞傷害（diffuse alveolar damage：DAD）に関して、抗4-Hydroxy-2-nonenal抗体およびc-Myc抗体を用いた免疫染色により、高濃度酸素曝露では肺組織が酸化ストレスに影響されていることを確認し、c-Myc蛋白の発現も確認した。mRNA発現に於いては、c-Mycと同時にBaxが誘導される一方、Surfactant-associated proteinsでは、SP-AおよびSP-Cは有意に抑制されていたが、SP-BおよびSP-Dは有意な変化を示さなかった。

研究成果の概要（英文）：

Eight-week-old mice (C57BL/6J) were bred as follows. In the 100 % oxygen-exposure experiment, the parameters were duplicated. Twenty male mice weighing 21-24 g were randomly divided into four groups as follows: (1) five mice for the control group were kept in atmospheric oxygen; (2) another fifteen mice to be used as the hyperoxia-exposure group were kept in a metallic chamber for 1 day, 2 days, and 3 days, respectively, into which oxygen flowed at a rate of 0.8 liter / min. The oximeter (JKO-25LJ II, JIKCO Ltd, Japan), which was connected with the chamber, indicated 95-100 % oxygen concentration. In the 75 % oxygen-exposure experiment, ten male mice were randomly divided into two groups as follows: (1) five mice for the control group were kept in atmospheric oxygen; (2) another five mice to be used as the hyperoxia-exposure group were kept in a metallic chamber for 9 days, respectively. In the 60 % oxygen- and 40 % oxygen-exposure experiments, ten male mice were randomly divided into two groups as follows: (1) five mice for the control group were kept in atmospheric oxygen; (2) another five mice to be used as the

hyperoxia-exposure group were kept in a metallic chamber for 4 weeks, respectively. In the 6 % oxygen-exposure experiment, ten male mice were randomly divided into two groups as follows: (1) five mice for the control group were kept in atmospheric oxygen; (2) another five mice to be used as the hypoxia-exposure group were kept in a metallic chamber for 3 days, respectively. In these experiment, we could not establish marked pulmonary fibrosis in mice.

We have already elucidated transcript profiling of diffuse alveolar damage (DAD) induced by hyperoxia exposure in mice and showed that the mRNA level of surfactant-associated protein C (SP-C) is significantly down-regulated, while that of c-Myc is significantly up-regulated (Int J Legal Med 2008;122:373-83). To confirm the molecular pathophysiology of this alveolar dysfunction more precisely, other surfactant-associated genes and apoptosis-related genes were examined in this Grants-in-Aid for Scientific Research (C). Our study showed that: (1) hyperoxia induces a marked increase in protein levels of 4-hydroxy-2-nonenal (HNE)-amino acid Michael adduct and c-Myc; and (2) mRNA levels of surfactant-associated protein A (SP-A) and surfactant-associated protein C (SP-C) are significantly down-regulated, while those of c-Myc and Bax are significantly up-regulated in hyperoxia exposure. These results suggest that: (1) c-Myc and Bax overexpression means progression of apoptosis, which brings about a malignant cycle of reactive oxygen species (ROS) production; and (2) multiple apoptotic pathways seem to be involved in decreases in levels of mRNAs for SP-A and SP-C, in turn causing the serious risk for pulmonary collapse.

交付決定額

(金額単位：円)

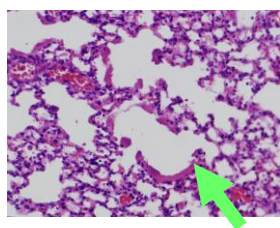
	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 医歯薬学
 科研費の分科・細目：社会医学・法医学
 キーワード： 瀰漫性肺胞傷害、高濃度酸素曝露、低酸素濃度曝露、アポトーシス、c-Myc (Myelocytomatosis oncogene)、CTGF (Connective tissue growth factor)、肺サーファクタント蛋白、リゾチーム

<p>1. 研究開始当初の背景 人工呼吸器管理時のルートの繋ぎ間違え事例、Paraquat の誤飲事例、熱傷事例などに</p>	<p>於いて、事件後に施された高濃度酸素を用いた人工呼吸器管理も、瀰漫性肺胞傷害 (diffuse alveolar damage : DAD) の発症に</p>
--	---

関与していた可能性があった。高濃度酸素曝露に基づく DAD に関しては、予後の改善の為に、分子レベルでの病態生理の解明が、法医学病理学および救急医学に於ける喫緊の課題となっている。私共は、以下の研究成果を報告している。

マウスを高濃度酸素（酸素濃度 100%）曝露密閉箱内に於いて飼育すると、マウスは 5 日間前後で DAD に因り死亡する。肺には、肺硝子膜を認める。



肺硝子膜 (PAS 染色)

研究代表者らは、2005 年および 2006 年度に獲得した基盤研究 (C) No. 17590574 にて以下の研究成果を発表した【Int J Legal Med 122(5):373-83, 2008】。

マウス (C57BL/6J) を高濃度酸素（酸素濃度 100%）曝露密閉箱内に於いて 3 日間飼育すると、HE 染色に於いては顕著な変化を認めなかったが、免疫染色に於いては Galectin-3 (anti-apoptotic lectin) を発現した炎症性細胞の増加を認めた。これは apoptosis の進行を意味した。

mRNA の発現は、以下のような時系列的変化を示した。“CCN family” の Cystein rich protein 61 (CYR61) および Connective tissue growth factor (CTGF) の mRNA は有意に増加した。これらの誘導は、血管新生などの器質化過程の進展を示唆した。また、Surfactant-associated protein C (SP-C)、Cytochrome P450, 2f2 (CYP2F2)、Tight junction (細胞間接着装置) を構成する、Claudin 1 (CLDN1)、Membrane-associated zonula occludens (ZO-1) 等の mRNA の有意

な減少は、肺胞虚脱への進展を示唆した。更に、Lysozyme (LYZS) の mRNA の有意な減少は、免疫の破綻を示唆した。

尚、Myelocytomatosis oncogene (c-Myc) および Galectin-3 の mRNA レベルの上昇は、apoptosis の進行を裏付けた。高濃度酸素状態が肺組織に於ける活性酸素の生成を誘導し、活性酸素によって誘導された c-Myc が更なる活性酸素を発生させ、上記のような mRNA 発現の変化を誘導していると推定した。

上記の研究成果は Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) による normalization のデータおよび生データからの解析結果であるが、その後、 β_2 -microglobulin (β_2M)、Ribosomal protein: large P2 (RPLP2)、および Importin 8 (IPO8) での normalization でも上記と同じ結果であることを確認した【Legal Med 11:S151-4, 2009】。

2. 研究の目的

人工呼吸器管理に於いては、高濃度酸素の持続曝露あるいは酸素濃度の急激な変化に因り、瀰漫性肺胞傷害から肺線維症へ進展する可能性がある。本研究では、この病態を解明するために、先ずマウスの肺胞中隔の炎症について解析する。次に、培養細胞に高濃度酸素あるいは低酸素濃度を曝露し、c-Myc を中心としたシグナル伝達の変化を調べ、肺胞中隔の器質化機序を総括する。

3. 研究の方法

次項の研究成果で詳述したように、動物実験および細胞培養実験を行った。

4. 研究成果

2010年度の研究成果

【in vivoの実験結果】

第94次日本法医学会学術全国集会にて発表】

空気と窒素を混合して飼育箱内の酸素濃度を6%に保ち、マウス(8週齢、雄、C57BL/6J)を2日、3日、4日間飼育致した。

低酸素濃度状態の肺では、mRNAの発現が誘導されているものとして、

- ① 血管新生・線維化などの組織増殖に重要な役割果たすVascular endothelial growth factor c: Vegfc の mRNA レベルが有意に上昇していた。
- ② Tissue inhibitor of metalloproteinases : Timp1、Timp4 の発現も、有意に上昇していた。
- ③CRP などの急性期蛋白の産生やB細胞の増殖を促す Interleukin 6: Il6 は、高発現している個体もあったが、個体差が大きかった。

一方、mRNAの発現が抑制されているものとして、

- ④細菌の細胞壁の糖蛋白を分解する Lysozymes : Lyzs、Lzp-s の発現は、有意に抑制されており、生体防禦機構の破綻を示唆していた。

- ⑤また、哺乳類に於ける蛋白質のリン酸化による重要なシグナル伝達経路である

Mitogen activated protein kinase kinase 6: Map2k6 の発現は、有意に抑制されていた。

【in vitroの実験結果 第32回日本法医学会学術中部地方集会にて発表】

NIH/3T3細胞に対し、高濃度酸素を曝露した。時系列に従って細胞は円形に縮み上がり浮遊し易い状態となり、死細胞が増加し、c-MycおよびGalectin-3のmRNAが発現した。

Galectin-3は、主にマクロファージで発現する抗アポトーシス作用を有するレクチン

であるが、これらの抗アポトーシス作用を超える、c-Myc発現などに伴うアポトーシスの進行が、高濃度酸素曝露に伴う細胞死の原因の一つである可能性があった。

2011年度の研究成果

【第95次日本法医学会学術全国集会にて発表】

【緒言】

人工呼吸器管理に於いては、高濃度酸素の持続曝露に伴う酸素中毒の結果として、瀰漫性肺胞傷害(Diffuse alveolar damage:DAD)から肺線維症へ進展する場合がある。本研究では、この病態を解明する第一段階として、マウスを75%酸素濃度曝露下で9日間飼育し、摘出した肺に関して、mRNA発現などの変化を検討した。

【材料と方法】

マウス(8週齢、雄、C57BL/6J)を、対照群(5匹)および75%酸素濃度曝露群(5匹、75%の酸素濃度状態で9日間飼育)の二群に分け、cDNA microarray解析(3D-Genes Mouse 24, Toray Industries, Inc.)などにより比較検討した。

【結果および考按】

75%の酸素濃度状態で9日間飼育したところ、死亡する個体も出始めた。

100%酸素濃度曝露でのmRNA発現結果(Int J Legal Med 2008;122:1373-83)と同様に、c-Myc(NM_010849)、Galectin-3

(Lgals3:NM_010705)、connective tissue growth factor(Ctgf:NM_010217)、Cystein rich protein 61(Cyr61:NM_010516)は誘導され、一方、surfactant-associated protein c(Sftpc:NM_011359)、Cytochrome P450, 2f2(Cyp2f2:NM_007817)、lysozyme

(Lyzs:NM_0173720)の発現は抑制されていた。これらは、器質化過程の進展、肺胞虚脱、生体防禦機構の破綻などを示唆していた。

また、Matrix metalloproteinase 2、13

(Mmp2:NM_008610、Mmp13:NM_008607)およびTissue inhibitor of metalloproteinase 1(Timp1:NM_011593)の発現誘導は、組織改築の始まりを示唆していた。

2012年度の研究成果

【第96次日本法医学会学術全国集会にて発

表】

【緒言】

高濃度酸素の持続曝露に伴う酸素中毒の結果としての瀰漫性肺胞傷害 (Diffuse alveolar damage : DAD) に於いて、c-Myc を含んだシグナル伝達に変化していた。本年度は、グラム陰性細菌に特有の菌体成分であるリポ多糖 (Lipopolysaccharide : LPS) をマウスに腹腔内投与することにより、細菌感染時の高濃度酸素曝露に於ける病態生理の解析を試みた。

【材料と方法】

マウス (8週齢、雄、C57BL/6J) を、対照群 (5匹)、60%酸素群 (5匹、60%酸素状態で4週間飼育)、LPS群 (5匹、初日および14日目にそれぞれ0.2mgのLPSを腹腔内投与し4週間飼育)、および60%酸素+LPS群 (5匹、60%酸素群およびLPS群と同様に飼育) の四群を飼育した。

【結果および考察】

4週間飼育後のマウスの体重は、対照群が 27.6 ± 0.5 g、60%酸素群が 22.6 ± 0.4 g、LPS群が 26.9 ± 0.2 g、60%酸素+LPS群が 21.1 ± 0.5 g であり、LPS投与に比べ、60%高濃度酸素曝露がマウスに高度な侵襲を与えていた。cDNA microarray解析では、c-Myc (NM_010849) および Connective tissue growth factor (Ctgf:NM_010217) の発現は、60%酸素群では誘導されていたが、LPS群では誘導されていなかった。Surfactant-associated protein c (Sftpc:NM_011359) および Lysozyme (Lyzs:NM_017372) の発現は、60%酸素群でもLPS群でも抑制され、肺胞虚脱、生体防禦機構の破綻などを示唆していた。Transforming growth factor β 1 (Tgfb1:NM_011577) は著変がなく、肺胞中隔の線維化も軽度であった。

投稿予定の論文

(1) Form of the paper

Original article

(2) Title

Diffuse alveolar damage (DAD) induced by oxygen poisoning : Down-regulation of surfactant-associated protein A (SP-A) and C (SP-C) is associated with up-regulation of c-Myc and Bax

(3) Authors

Ichiroh Shimada · Carsten Hohoff · Heidi Pfeiffer · Fumiko Suzuki · Sumiko Iho · Yoshimasa Urasaki · Kazuhiro Karaya · Yoshiaki Imamura · Toshihiro Yasuda · Kazuhiro Matsui · Etsuko Tsubota · Takasumi Matsuki

(4) Abstract

研究成果の概要 (英文) に記載した。下記は Figure の一部である。

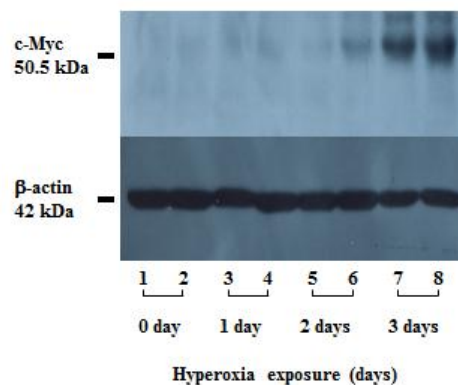


Fig. 2.

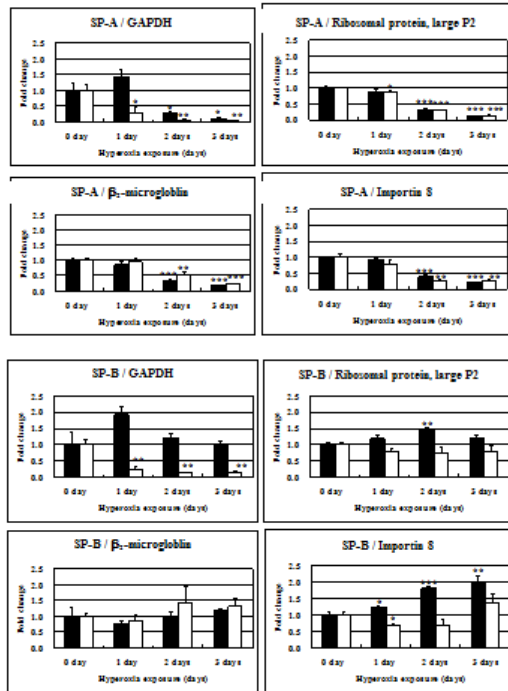


Fig. 4-1.

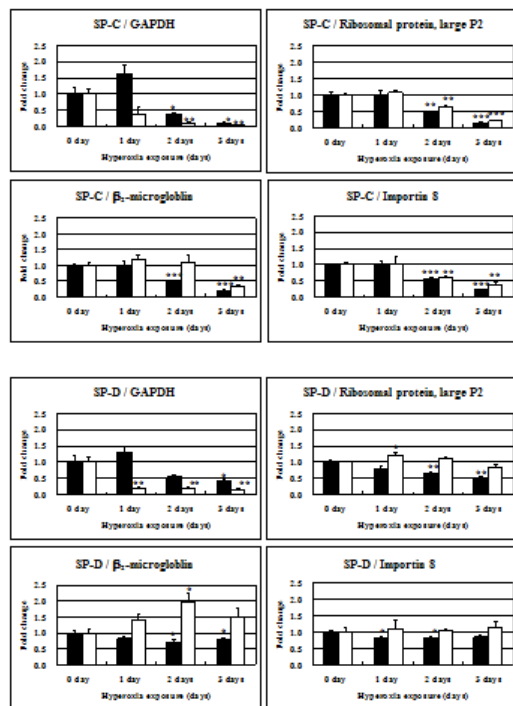


Fig. 4-2.

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)

[学会発表] (計4件)

① 島田一郎、松井一裕、松木孝澄
 高濃度酸素曝露およびリポ多糖投与における、肺の病態生理
 第96次日本法医学会学術全国集会
 2012年6月9日(土) 浜松

② 島田一郎、松井一裕、坪田悦子、松木孝澄
 75%酸素濃度曝露で生じる瀰漫性肺胞傷害(Diffuse alveolar damage)に於けるシグナル伝達
 第95次日本法医学会学術全国集会
 2011年6月16日(木) 福島

③ 島田一郎、伊藤慎治、松井一裕、坪田悦子、松木孝澄
 NIH/3T3細胞に於ける、高濃度酸素曝露に伴うc-Myc遺伝子の発現
 第32回日本法医学会学術中部地方集会
 2010年10月23日(土) 富山

④ 島田一郎、松井一裕、坪田悦子、松木孝澄
 低酸素濃度状態に於ける、肺でのシグナル伝達の変化
 第94次日本法医学会学術全国集会
 2010年6月25日(金) 東京

[その他]

ホームページ等

<http://houi.med.lab.u-fukui.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田 一郎 (SHIMADA ICHIROH)
 福井大学・医学部・准教授
 研究者番号：20272908

(2) 研究分担者

松木 孝澄 (MATUKI TAKASUMI)
 福井大学・医学部・教授
 研究者番号：10126617
松井 一裕 (MATUI KAZUHIRO)
 福井大学・医学部・客員教授
 研究者番号：80181676

(3) 連携研究者

安田 年博 (YASUDA TOSHIHIRO)
 福井大学・医学部・教授
 研究者番号：80175645
今村 好章 (IMAMURA YOSHIAKI)
 福井大学・医学部附属病院・准教授
 研究者番号：40223341