

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390376

研究課題名(和文)細胞増殖因子と抗炎症製剤併用による肺病変修復促進と治療法開発

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of alveolar epithelial healing process in acute lung injury

研究代表者

須加原 一博 (SUGAHARA, Kazuhiro)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20171126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：1. 培養細胞を用いてEthyl pyruvate (EP)のNF- $\kappa$ Bに対する抑制効果を検索した。細胞をTNF- $\alpha$ で刺激すると、NF- $\kappa$ Bが活性化されるが、EPで濃度依存性に抑制された。これはNF- $\kappa$ BのsubunitsのRelAやp50の核内移行を抑制し、DNA結合能抑制により炎症や傷害を抑制することが示唆された。2. 肺傷害が進行すると、肺線維化が起こり重篤な呼吸不全に陥る。細菌の鞭毛抽出物flagellinにepidermal-mesenchymal transition(EMT)促進作用があり、肺胞上皮細胞の線維化を起こす作用が示唆され、細菌性肺炎の線維化の一つの機序が示唆された。

研究成果の概要(英文)：1. We have demonstrated that 1) keratinocyte growth factor (KGF) is a potent factor for proliferation and differentiation of alveolar type II cells, 2) intratracheal instillation of KGF prevented acute lung injury by bleomycin and HCl. 2. Ethyl pyruvate reportedly has anti-inflammatory actions through inhibition of NF- $\kappa$ B. We confirmed that treatment of cultured alveolar epithelial cells with tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) increased the NF- $\kappa$ B/DNA-binding activity, which was strongly inhibited with incubating with ethyl pyruvate. We also demonstrated that ethyl pyruvate interacts with RelA and p50 to inhibit their functions at multiple points. 3. Legionella pneumophila has flagella, causes pulmonary fibrosis. Microarray analysis in cultured alveolar epithelial cells indicated that flagellin increased fibronectin level and reduced E-cadherin level, which suggested that flagellin cooperates with TGF- $\beta$  and induces EMT in alveolar epithelial cells, and causes fibrosis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：麻酔・蘇生学

キーワード：急性肺傷害 創傷治癒 肺胞上皮細胞 細胞増殖因子 EGFR サイトカイン NF- $\kappa$ B EMT

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 重症呼吸不全肺病変の修復には、肺胞表面の再上皮化が不可欠で、かつ肺の線維化を如何に防ぐかが重要である。肺胞型上皮細胞は、肺表面活性物質の産生分泌など正常肺構築の維持に重要な機能を有し、再上皮化に深く関与すると考えられる。

(2) 申請者らは、肺胞上皮細胞の増殖、肺表面活性物質の産生や肺水腫液の吸収促進により肺病変の修復を促し、かつ肺の線維化を抑制できるとの仮説から本研究を開始した

(3) 申請者らは、これまでラットやヒト切除肺から肺胞型上皮細胞を分離培養し、*in vitro*での肺障害発生機序(ARRD, *Am J Pathol*)やイオン輸送能の調節機序など重要な成果を報告(*Am J physiol*, *J cell Biol*)し、呼吸不全動物肺や糖尿病ラット肺に於いて、この細胞の形態学的、生化学的变化と肺表面活性物質・アポ蛋白質(SP-A、SP-B、SP-C)の mRNA 発現動態から、遺伝子レベルでの negative なフィードバック機構の存在とアポ蛋白質 A、B、C が独立して調節されていることを示した(AJRCMB, ARRD)。

### 2. 研究の目的

(1) 肺胞上皮細胞を培養し、細胞増殖やイオン輸送能に於ける細胞外マトリクス的重要性と、新たに肺胞上皮細胞の増殖・分化およびアポ蛋白質発現が HGF、KGF などの FGF ファミリーによって調節されていることを見出し(ARRD, JJMSBI, AJP)、特に KGF による肺胞上皮細胞増殖による病変修復(Lab Invest)を証明してきた。

(2) ケラチノサイト成長因子(KGF)の前投与によりプレオマイシン肺線維化を抑制できることを証明(AJRCCM, JP)すると共に、塩酸肺障害の抑制効果もあることを証明した(AJRCMB)。

(3) 申請者らは、最近、抗炎症作用をもつエチルピルビン酸が培養肺細胞において転写因子 NF-kB の活性化を強く抑制すること(*Pulm Pharm Ther* 2010)、またその分子機構を検索し NF-kB のサブユニット RelA および p50 の核内移行を強く抑制することを証明した(*Brit J Pharm* 2010)。

本研究は、増殖因子による肺胞上皮細胞の増殖とエチルピルビン酸の抗炎症作用を組み合わせることで重症呼吸不全肺の修復改善を促進させようとする独創的研究である。

この併用により肺病変修復促進ができれば、重症呼吸不全患者に新たな治療法への道を開くものと期待される。

### 3. 研究の方法

(1) 高濃度酸素、シリカ、エンドトキシン、プレオマイシンや塩酸などの投与により作製した呼吸不全動物肺の急性期および慢性

期について、顕微鏡、電顕、免疫組織化学的变化を観察すると共に、肺胞 II 型上皮細胞の増殖、線維化の程度を検討する。

(2) (1)について、肺洗浄後、肺サーファクタントと肺胞上皮細胞増殖因子(KGF など)を併用して経気道的に後投与して肺障害の程度を(1)、(2)と同様に検索し、比較検討する。

(3) (1)について経気道的に KGF を投与し、抗炎症作用をもつエチルピルビン酸を正常ラットおよび肺傷害ラットに大腿静脈より 2ml 注入して、1、2、3、および 4 週目にラット肺を検索し、傷害の修復過程を(1)、(2)と同様に、比較検討する。

(4) (1)、(2)、(3)について、肺表面活性物質アポ蛋白質(SP-A、SP-B、SP-C および SP-D)、1、3 や 4 型コラーゲン、KGF、HGF や TGF- $\beta$  などに加え、C/EBP- $\beta$ 、 $\gamma$  などの転写因子の cDNA を alkaline phosphatase (AP)、horse-radish peroxidase (HRP) や digoxigenin (DIG) でラベルし、*in situ hybridization* 法によりこれらの mRNA の局在およびその動態を検討し、肺胞 II 型上皮細胞の機能や動態、および肺障害の程度や肺線維化過程(特に TGF- $\beta$ 、HGF、HGF などの動態から線維芽細胞やマクロファージの関与)転写因子の病変修復過程における役割などを検索する。

### 4. 研究成果

(1) 培養肺胞 II 型上皮細胞気管内投与による投与細胞の動態 これまでの研究成果から KGF 投与後 2-3 日目に最大の増殖能を示し、イオン輸送能もそれと相関した。

(2) Ethyl pyruvate (EP) による肺炎抑制機序の解明 培養細胞を用いて EP の NF-kB に対する抑制効果を検索した。細胞を TNF- $\alpha$  で刺激すると、NF-kB が活性化されるが、この作用が EP で濃度依存性に抑制された。この作用は、NF-kB の subunits の RelA や p50 の核内移行を抑制し、DNA 結合能を抑制することによることが示唆された。EP は NF-kB シグナル経路の活性化を引き起こす炎症や傷害を抑制することが示唆された。

(3) 肺傷害が進行すると、肺線維化が起こり重篤な呼吸不全に陥る。肺の線維化を如何に防ぐかが重要である。サイトカインの TGF- $\beta$  1 は肺線維芽細胞増殖を起こし、線維化を促進させる。細菌の鞭毛抽出物 flagellin に epidermal-mesenchymal transition (EMT) 促進作用があり、肺胞上皮細胞の線維化を起こす作用が示唆され、細菌性肺炎の線維化の一つの機序が示唆された。

(4) 炎症に関与するサイトカイン TNF- $\alpha$  は、p38MAP kinase 系を活性化し上皮成長

因子受容体(EGFR)のSer1047のリン酸化を引き起こす。レジオネラは鞭毛を有しその構成蛋白のFlagellinはToll-like receptor-5 (TLR5)を刺激する、肺胞上皮細胞のp38MAP kinaseが活性化されること、EMTが促進されることが示され、FlagellinによりSer1047がリン酸化されることが示された。今後、炎症におけるこのリン酸化の病態生理学的意義を検索する。

(5) FlagellinとTGF- $\beta$ 1刺激による遺伝子発現の変化をDNAマイクロアレイ法で検索し、flagellinによりfibronectin発現が増加し、E-cadherin発現が減少した。従って、flagellinによるEMT様変化はこれらの発現変化から誘導され、線維化が促進され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 11件)

Hideyuki Yamamoto, Sayomi Higa-Nakamine, Nobuhiro Noguchi, Noriko Maeda, Yutaka Kondo, Seikichi Toku, Ichiro Kukita, Kazuhiro Sugahara Desensitization by different strategies of epidermal growth factor receptor and ErbB4. Journal of Pharmacological Sciences 2014 ; 124 : 287~293, 査読あり

大城匡勝、須加原一博

特集エビデンスに基づいた周術期の安全管理、術中クライシスと外科的アプガースコア

麻酔 2014 ; 63 : 262~268、査読あり

Nobuhiro Noguchi, Yutaka Kondo, Noriko Maeda, Sayomi Higa-Nakamine, Seikichi Toku, Junichi Maruyama, Yoichiro Isohama, Ichiro Kukita, Kazuhiro Sugahara, Hideyuki Yamamoto Phosphorylation of epidermal growth factor receptor at serine 1047 by MAP kinase-activated protein kinase-2 in cultured lung epithelial cells treated with flagellin.

Archives of Biochemistry and Biophysics

2013 ; 529 : 75~85, 査読あり

Mayuko Sakanashi, T. Matsuzaki, K. Noguchi, J. Nakasone, M. Sakanashi, T. Uchida, M. Kina-Tanada, H. Kubita, K. Arakaki, A. Tanimoto, N. Yanagihara, M. Sakanashi, Y. Ohya, H. Masuzaki, S. Ishiuchi, K. Sugahara, M. Tsutsui

Long-term treatment with San'o-shashin-to, Kampo medicine, markedly ameliorates cardiac ischemia-reperfusion injury in ovariectomized rats via the Redox-dependent mechanism.

Circulation Journal 2013; 77 (7): 1827~1837, 査読あり

T. Tadokoro, K. Yoza, K. Sugahara Obstacle of guide wire advancement by the internal jugular vein valve with opening restriction: An ultrasound image Canadian Journal of Anesthesia 2013; 60 (11): 1163~4, 査読あり

野口克彦、濱館直史、松崎俊博、坂梨まゆ子、仲宗根淳子、内田太郎、新垣久美子、久保田陽秋、石内勝吾、益崎裕章、須加原一博、大屋祐輔、坂梨又郎、筒井正人 Dihydrobiopterin による内皮型一酸化窒素合成酵素機能障害

Ryukyuu Med J 2013; 32 (1, 2): 7~12, 査読あり

Masato Tsutsui, Yusuke Ohya, Kazuhiro Sugahara, Latest evidence in endothelium-derived hyperpolarizing factor research Circulation Journal 2012; 76 (7): 1599-1600, 査読あり

Yutaka Kondo, Sayomi

Higa-Nakamine, Nobuhiro Noguchi,  
Noriko Maeda, Seikichi Toku, Yoichiro  
Isohama, Kazuhiro Sugahara, Ichiro  
Kukita, Hideyuki Yamamoto  
Induction of epithelial-mesenchymal  
transition by flagellin in cultured lung  
epithelial cells.  
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol  
2012; 303: L1057~L1069 査読あり

Ayako Mizutani, Noriko Maeda,  
Seikichi Toku, Sayomi Higa-Nakamine,  
Yoichiro, Isohama, Hajime Sunakawa,  
Kazuhiro Sugahara, Hideyuki Yamamoto  
Interaction of ethyl pyruvate in vitro  
with NF- $\kappa$ B subunits, RelA and p50  
European Journal of Pharmacology 2011;  
650 (1): 151~156, 査読あり

Noguchi K, Hamadate N, Matsuzaki,  
T, Sakanashi M, Nakasone J,  
Arakaki K, Kubota H, Sugahara K,  
Ohya Y, Sakanashi M, Tsutsui M  
Increasing dihydrobiopterin causes  
dysfunction of endothelial nitric oxide  
synthase in rats in vivo.  
Am J Physiol Heart Circ Physiol 2011;  
301 (3): H721~9, 査読あり

T. Fuchigami, O. Kakinohana, MP  
Hefferan, N Lukacova, S Marsala, O  
Platoshyn, K Sugahara, TL Yaksh, M  
Marsala  
Potent suppression of stretch reflex  
activity after systemic or spinal  
delivery of tizanidine in rats with  
spinal ischemia-induced chronic  
spastic paraplegia.  
Neuroscience 2011; 194: 160~169, 査読  
あり

(学会発表)(計 12 件)

H. Nishi, J. Okubo, M. Kakinohana,  
K. Sugahara  
The efficiency of skill training for  
medical students in the clinical  
training of anesthesiology.  
2014 WGEA, AAMC Western  
regional conference, Univ Hawaii,  
March 23~25, 2014

T. Kinjo, Y. Madanbashi, S. Izumi, M.  
Oshiro, K. Sugahara  
Noradrenaline does not impair  
postoperative renal function in  
endovascular stent graft repair.  
2013 annual meeting of American  
Society of the Anesthesiologists, San  
Francisco, U.S.A., October 12~16, 2013  
Anesthesiology 2013; 119 (Supplement):  
(A3268)

T. Fukuda, S. Iseki, M. Kakinohana,  
C. Takayama, M. Matsushita, K.  
Sugahara  
A new model of global cerebral ischemia  
in mice  
2013 annual meeting of American  
Society of Anesthesiologists, San  
Francisco, U.S.A., October 12~16, 2013  
Anesthesiology 2013; 119: A2219

H. Nishi, K. Kitano, S. Taira, M.  
Kakinohana, K. Sugahara.  
Skeletal muscle mass serves as an index  
of a neuromuscular junction blocking  
agent does.  
2013 annual meeting of American  
Society of the Anesthesiologists, San

Francisco, U.S.A., October 12~16, 2013  
Anesthesiology 2013; 119: A4093

T.Tadokoro, H. Higa, T. Kawabata, K. Yoza, M. Kakinohana, K. Sugahara.  
Anesthetic management in an adult patient with double-chambered right ventricle and severe obesity.  
2013 annual meeting of American Society of the Anesthesiologists, San Francisco, U.S.A., October 12~16, 2013  
Anesthesiology 2013; 119: A4093

V.N. Lama, K. Sugahara, R. Sehmi (facilitators)  
Stem cell progenitor cells: Promising future strategies in repair, Thematic Poster Session [A89]  
American Thoracic Society (ATS) 2013 International Conference, May 17~22, Philadelphia, Pennsylvania, USA

K. Aragaki, K. Kamizato, T. Fuchigami, T. Teruya, M. Kakinohana, K. Sugahara  
Availability of initial distribution volume of glucose (IDVG) for the volume control in pulmonary decompression illness; "The chokes"  
International Anesthesia Research Society (IARS) 2013 annual meeting, May 4~7, San Diego, California, USA

M Tsutsui, K Noguchi, T Matsuzaki, M Sakanashi, J Nakasone, T Uchida, M Tanada, H Kubota, K. Sugahara, Y Ohya.  
Dihydrobiopterin causes endothelial nitric oxide synthase dysfunction in rats in vivo.  
Annual meeting of AHA Scientific

Sessions, Los Angeles, California, U.S.A., Nov 3~7, 2012  
(Abstract No. 13894)

R. Kakihana, M. Abe, N. Noguchi, M. Oshiro, K. Sugahara  
Surgical apgar score can predict postoperative complications in nonagenarian patients.  
2012 annual meeting of American Society of the Anesthesiologists, Washington DC, U.S.A., October 13~17, 2012  
Anesthesiology 2012; 117 (Supplement): 119~119 (A975)

M. Kakinohana, K. Kamizato, S. Iseki, T. Fukuda, K. Sugahara  
Expression of D-serine in the spinal cord after transient ischemia in mice  
40<sup>th</sup> annual meeting of Society for neuroscience in anesthesiology and critical care, Washington DC, October 11~12, 2012

K. Sugahara, A. Mizutani, H. Yamamoto.  
Ethyl pyruvate inhibited the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B through interaction with RelA and P50 in cultured lung epithelial cells.  
2011 International conference of American Thoracic Society, May 13~18, 2011, Denver, Colorado, U.S.A.  
Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2011; 183: A5107

Kazuhiro Sugahara  
Invited Lecture: Application of inhaled anesthesia induction and maintenance in

patients with difficult airway.  
The Chinese Society of Anesthesiology  
(CSA) 2011 Annual meeting, September  
9-10, 2011, Shandong Hotel, Ji'nan, Chin

〔図書〕(計 2 件)

森田 潔監修、中山書店、麻酔科医のため  
の周術期の疼痛管理、2014、305 (190  
～194)

澄川耕二編集、総合医学社、心臓麻酔に  
おける臓器保護、2013、283 (116～121)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

須加原 一博 (SUGAHARA, Kazuhiro)  
琉球大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：20171126

### (2) 研究分担者

大城 匡勝 (OSHIRO, Masakatsu)  
琉球大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：00315483

照屋 孝二 (TERUYA, Koji)  
琉球大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：50437983

宮田 裕史 (MIYATA, Yuji)  
琉球大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：60315471(平成24年度まで)

野口 信弘 (NOGUCHI, Nobuhiro)  
琉球大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：80457671

和泉 俊輔 (IZUMI, Syunsuke)  
琉球大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：90649401(平成25年度より)

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：