

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591157

研究課題名(和文) LPS惹起肺水腫におけるHGFによる回復機構

研究課題名(英文) Recovery mechanism from LPS-induced lung edema by HGF

研究代表者

岩崎 吉伸 (IWASAKI, YOSHINOBU)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00203373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：Lipopolysaccharide (LPS)を気管内投与すると肺血管内皮におけるHepatocyte growth factor (HGF)遺伝子発現、蛋白発現が亢進した。マウス肺の気管支肺胞洗浄から肺胞マクロファージを単離し、LPSを添加すると上清中にIL-1、TNF- $\alpha$ が誘導された。LPS気管内中投与直後に抗IL-1抗体、抗TNF抗体を投与すると肺血管内皮のHGFの発現は抑制され、肺胞上皮のアポトーシス、肺血管透過性は抑制された。抗HGF抗体を投与すると肺胞上皮のアポトーシスは増強し、肺血管透過性は亢進した。以上より、HGFはLPS肺水腫の回復に重要な役割を担っていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The expression of hepatocyte growth factor (HGF) in pulmonary endothelium was promoted in both gene and protein levels by injecting lipopolysaccharide (LPS) into trachea of mice. Alveolar macrophages isolated from bronchoalveolar lavage fluid were cultured in addition to LPS. IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were introduced from the alveolar macrophages. The expression of HGF in pulmonary endothelium was inhibited in LPS-induced lung injury by administering anti-IL-1 $\beta$  antibody or anti-TNF $\alpha$  antibody immediately after injecting LPS into trachea. In LPS-induced lung injury, administration of anti-HGF antibody promoted apoptosis of alveolar epithelium, and pulmonary vascular permeability. It suggested that HGF could play a pivotal role in recovery from LPS-induced lung injury.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：LPS lung injury HGF 血管透過性 アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 敗血症性急性肺損傷では、TLR4 が菌体成分である Lipopolysaccharide(以下 LPS)を認識することにより、過剰な全身性炎症反応が引き起こされる。LPS は、肝臓またはヒト II 型肺胞上皮細胞での LPS-binding protein(LBP)産生を誘導し、直ちに LPS と結合する。LPS-LBP complex は、マクロファージ、単球の細胞膜に発現している CD14 と結合することにより細胞を活性化する。活性化されたマクロファージや単球は、種々のサイトカインを産生し、血管透過性亢進が引き起こされ、その結果、透過型肺水腫が惹起される。

(2) 創傷治癒は血管透過性亢進、炎症細胞の浸潤を経て、組織の再生修復と連続するが、HGF は後期の創傷治癒機転に極めて重要である。肺に対する HGF の作用としては肺胞上皮細胞の分化・増殖、血管透過性抑制作用が知られ、LPS 起因性肺障害においても回復過程に重要な役割を担っていると考えられる。HGF は、内皮細胞上の HGF receptor に働き、Mitogen-activated protein kinase である ERK1/2 および p38 が関与し、血管内皮細胞のアクチン細胞骨格の強化、細胞間接着蛋白である / -catenin と VE-cadherin の強固な接着を促進することにより、血管透過性を抑制する。急性肺障害では、気管支肺胞洗浄液中の HGF が高値であり、血管透過性の調節に重要であるとの報告はみられる。しかし、急性肺障害の回復において HGF の遺伝子発現・蛋白発現が重要であるという発想に基づいて行われた研究はない。

(3) HGF は Interleukin-1 (以下 IL-1) Tumor necrosis factor (以下 TNF-)により誘導され、肺胞上皮細胞の分化、増殖を促進することが知られている。LPS 惹起肺水腫において、LPS により、IL-1、TNF- が肺胞マクロファージより産生放出

されることが報告され、これらのサイトカインが LPS 惹起肺水腫の発症に重要な役割を担っていることが知られている。

2. 研究の目的 LPS 惹起肺水腫において HGF の産生が、肺水腫の回復に重要であるという仮説を証明することを目的に以下の点について検討した。LPS 惹起肺障害における肺血管内皮細胞の HGF の遺伝子発現・蛋白発現を検討した。また、LPS により IL-1、TNF- が産生されることを確認し、その上で IL-1、TNF- を抑制することにより、HGF 発現における影響についても検討した。IL-1、TNF- の産生と HGF 発現との関係を明らかにし、HGF を抑制することにより肺胞上皮細胞、肺血管透過性、肺水腫に及ぼす影響についても検討し、新たな治療標的としての HGF の可能性について検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 創傷治癒は血管透過性亢進、炎症細胞の浸潤を経て、組織の再生修復と連続するが、HGF は後期の創傷治癒機転に極めて重要である。LPS 刺激により HGF の遺伝子発現・蛋白発現に及ぼす影響、HGF の発現と IL-1、TNF- との関係、HGF の肺血管内皮細胞に及ぼす影響を検討した

### LPS による肺障害マウスの作成

LPSを気管内投与し、24時間後に両肺を摘出し、湿重量測定後、60 24時間乾燥し、乾燥重量を測定した。気管内投与24時間後に以下の項目を検討した。さらに、抗IL-1抗体、抗TNF- 抗体をLPS投与直後に気管内に投与した。

LPS気管内投与後の肺血管内皮細胞におけるHGF遺伝子および蛋白発現

気管内投与24時間後に肺を摘出し、肺血管内皮細胞HGF遺伝子発現・蛋白質発現が、Microdissection法を用いて、Real Time RT-PCR法、Northern Blot法、免疫組織染色により検討した。LPS投与24時間後の血清

中IL-1、TNF- $\alpha$ を測定した。また、抗IL-1抗体、抗TNF- $\alpha$ 抗体をLPS気管内投与直後に投与し、HGF遺伝子発現・蛋白発現をRT-PCR、免疫組織染色で検討した。

LPS投与後の肺血管内皮細胞のアクチン細胞骨格に及ぼすHGFの効果

マウス肺から血管内皮細胞を分離培養し、LPS添加24後にRhodamine-phalloidin染色を行い、蛍光顕微鏡でアクチン細胞骨格を観察した。さらに、HGFをLPS添加時に加え、アクチン細胞骨格、血管内皮細胞間の隙間に及ぼす影響を検討した。

肺泡マクロファージの活性化と炎症性サイトカイン

マウス肺の気管支肺泡洗浄を行ない、マクロファージを単離した。培養液中にLPSを添加し6時間後に上清中のIL-1、TNF- $\alpha$ をELISAで測定した。

(2) HGFを阻害することによる肺胞上皮アポトーシス・肺血管透過性に及ぼす影響、肺水腫に及ぼす影響を検討した。さらに、HGFを投与することによりアポトーシスがどのように影響されるかについても以下の点で検討した。

組織学的検討

LPS投与24時間後に脱血致死させ、摘出肺をTUNEL染色した。さらに、Bax、Bcl-2、p21、p53をRT-PCR法にて測定した。

肺血管透過性

LPS気管内投与24時間後に $^{131}\text{I}$ で標識したアルブミンを静注し、1時間後に気管支肺泡洗浄を行い、1時間で血管内から気管支肺泡洗浄液中に漏出したアルブミン量で肺血管透過性を検討した。さらに、LPS投与直後に抗HGF抗体を投与し、肺血管透過性に及ぼす影響を検討した。

TLRシグナリングアッセイ

マウス肺からII型肺胞上皮細胞を分離培養し、LPS添加後に、さらに抗CD14抗体を添加し、蛍光酵素遺伝子に結合したNF $\kappa$ B

反応領域(IL-8プロモータ)を用いてシグナリングを測定した。

肺泡マクロファージの活性化と炎症性サイトカイン

マウス肺の気管支肺泡洗浄を行ない、洗浄液中のマクロファージを単離し、LPS添加直後に抗CD14抗体、抗TLR4抗体を添加し、抗CD14抗体、抗TLR4抗体のHGF産生に及ぼす影響を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 急性肺障害では種々の炎症細胞、液性因子により血管透過性亢進を引き起こすが、HGFの急性肺障害に及ぼす影響は不明である。

LPSによる肺障害マウスの作成

LPSを気管内投与4時間後の肺湿乾重量比は増加し、24時間後に肺水腫の発生が確認された。抗IL-1抗体、抗TNF- $\alpha$ 抗体をLPS投与直後に投与すると肺湿乾重量比の増加は抑制された。

LPS気管内投与後の肺血管内皮細胞におけるHGF遺伝子および蛋白発現

LPS気管内投与24時間後に摘出肺をMicrodissection法により、肺血管内皮細胞を切り取り、Real Time RT-PCR法、Northern Blot法によりDNAレベルでの遺伝子発現を検討した。LPS投与24時間後に肺血管内皮細胞のHGF発現は亢進していた。さらに、摘出肺の免疫組織染色では、肺血管内皮細胞にHGF蛋白の発現がみられた。また、LPS投与24時間後の血清IL-1、TNF- $\alpha$ は上昇した。抗IL-1抗体、抗TNF- $\alpha$ 抗体をLPS気管内投与直後に投与すると、HGF遺伝子発現・蛋白発現を抑制された。

LPS投与後の肺血管内皮細胞のアクチン細胞骨格に及ぼすHGFの効果

マウス肺からの分離培養した血管内皮細胞の培養液中にLPSを添加し、24間後に行ったRhodamine-phalloidin染色では、蛍光顕

微鏡で肺血管内皮細胞のアクチン細胞骨格の脆弱が観察された。さらに、HGF を LPS 添加時に加えると、アクチン細胞骨格の回復、血管内皮細胞間の間隙がみられず、HGF により改善した。

肺胞マクロファージの活性化と炎症性サイトカイン

マウス肺の気管支肺胞洗浄を行ない、マクロファージを単離した。培養液中に LPS を添加し 6 時間後に上清中の IL-1、TNF- $\alpha$  が増加した。

(2) HGF を阻害することによる肺胞上皮アポトーシス・肺血管透過性に及ぼす影響、肺水腫に及ぼす影響を検討した。さらに、HGF を投与することによりアポトーシスがどのように影響されるかについても以下の点で検討した。

組織学的検討

LPS 投与 24 時間後に脱血致死させ、摘出肺を TUNEL 染色し、肺胞上皮にアポトーシスが誘導された。Bax、Bcl-2、p21、p53 を RT-PCR 法にて測定し、Bax を介して肺胞上皮細胞がアポトーシスを誘導されていることが確認された。

肺血管透過性

LPS 気管内投与後 24 時間から 25 時間の 1 時間における  $^{131}\text{I}$  で標識したアルブミンを静注し、1 時間後に気管支肺胞洗浄を行い、1 時間で血管内から気管支肺胞洗浄液中に漏出したアルブミン量は有意に増加し、肺血管透過性亢進がみられた。さらに、LPS 投与直後に抗 HGF 抗体を投与したところ、肺血管透過性が抑制された。

TLRシグナリングアッセイ

マウス肺から II 型肺胞上皮細胞を分離培養し、LPS 添加後、蛍光酵素遺伝子に結合した NF $\kappa$ B 反応領域(IL-8 プロモータ)を用いて TLR シグナリングを測定したところ、LPS 添加 24 時間後に亢進がみられた。

5. 主な発表論文等  
なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 吉伸 (IWASAKI YOSHINOBU)  
京都府立医科大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：00203373

(2) 研究分担者

丸中 良典 (MARUNAKA YOSHINORI)  
京都府立医科大学・医学研究科・教授  
研究者番号：00127036

新里 直美 (NIISATO NAOMI)  
京都府立医科大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：00237645

有本 太一郎 (ARIMOTO TAICHIRO)  
京都府立医科大学・医学研究科・講師  
研究者番号：30457865

上田 幹雄 (UEDA MIKIO)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：40457966

河野 能士 (KOUNO YOSHIHITO)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：90516163