

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592251

研究課題名(和文)脳死関連肺障害の病態解明と予防・治療法の開発

研究課題名(英文)Clarification of the pathophysiology of brain death-associated lung function impairment and research on the precaution and remedy

研究代表者

西脇 公俊(NISHIWAKI, KIMITOSHI)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10189326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：臓器移植医療において、脳死患者から提供される肺が移植に至らない理由の一つに、脳浮腫・脳圧亢進による神経原性肺水腫(NPE)の発生が肺機能障害を引き起こすことが示唆されている。本研究では、in vitro肺動脈内皮細胞モデルを確立し、NPE発生関連物質として見出した神経ペプチドY(NPY)の細胞透過性亢進作用の有無を評価した。その結果、NPYは 10^{-11} ～ 10^{-7} Mの濃度範囲において有意な細胞透過性亢進作用を示さなかった。また、低酸素条件下およびノルエピネフリン共存下においてもNPYに有意な作用が認められなかったことから、NPEにおけるNPYの作用点は肺血管内皮細胞以外にあると考えられた。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested as a reason for the difficulty in the lung transplantation from a brain-dead donor that brain edema and increased intracranial pressure induce neurogenic pulmonary edema (NPE) resulting in the lung function impairment. In the present study, we established an in vitro human pulmonary endothelial cell model and assessed the effect of neuropeptide Y (NPY), which was discovered as a causative agent in NPE, on cell permeability. NPY alone showed no statistically significant enhancement of cell permeability in the range from 1×10^{-11} to 1×10^{-7} M. In addition, neither hypoxic (5% O₂) condition nor combination with norepinephrine caused NPY-induced cell permeability. These results suggest that the site of action of NPY is not in pulmonary endothelial cells in NPE.

研究分野：医歯薬学

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：神経原性肺水腫 細胞透過性 肺動脈内皮細胞 神経ペプチドY 麻酔薬 脳死肺移植

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

平成22年7月17日に改正臓器移植法が施行されてから脳死臓器移植が急増し、日本においても本格的な移植医療の第二の幕開けとも言える状況となった。脳死患者からどの臓器が提供されるかは脳死患者側の意思による部分もあるが、たとえ了解の得られた臓器であったとしても、その臓器に障害があれば移植はできない。特に肺は、最近の日本の脳死臓器移植において、提供される機会の少ない臓器である。また海外においても脳死患者からの肺移植は20%にも満たないと報告されている(Snell GI et al. J Heart Lung Transplant 2008; 27: 662-7)。その背景には脳浮腫・脳圧亢進による神経原性肺水腫の発生が関与する可能性が示唆されている。既に実験動物レベルでは、ブタ脳死モデルにおいて、神経原性肺水腫の発生とともに、血中および肺組織中の神経ペプチド発現量に変化が生じることが示されている(Anne B et al. J Heart Lung Transplant 2009; 28: 725-32)。

我々は、ラット神経付き肺灌流標本において、肺交感神経終末でカテコールアミンと共存する神経ペプチドY(NPY)に血管透過性亢進惹起作用を見出した(Hirabayashi A et al. Eur J Pharmacol 1994; 259: 227-30)。さらに、ラットフィブリン誘発神経原性肺水腫モデルを用いた検討から、水腫液中にNPYが高濃度に存在すること(Hamdy O et al. Crit Care Med 2001; 29: 1222-8)や、肺水腫発生は6種類のNPY受容体サブタイプのうちY3受容体を介した反応であること(Hirabayashi A et al. Eur J Pharmacol 1994; 296: 297-305)を示し、血行動態だけでなくNPYによる神経性調節が透過性亢進機序に深く関与することを明らかにしてきた。しかしながら、NPYの具体的な肺血管透過性亢進機序および一般的な肺水腫の透過性亢進機序との関連については未だ不明である。

また、我々はラットフィブリン誘発神経原性肺水腫モデルにおいて、吸入麻酔薬Isofluraneが、気管支上皮細胞からの血管内皮細胞成長因子(VEGF)の放出を促進し、細胞透過性を亢進するが、同じ吸入麻酔薬のSevofluraneにはそのような作用が見られないことを報告した(Kandatsu N et al. Anesthesiology 2005; 102: 1182-9)。このことは、使用する麻酔薬により引き起こされる肺水腫の程度が異なる可能性を示唆するものであるが、麻酔薬と細胞透過性亢進作用との関連性は未だ明らかになっていない状況にある。

2. 研究の目的

本研究は、*in vitro*肺血管内皮細胞モデルを構築し、NPYの細胞透過性亢進機序を細胞

レベルで明らかにすることを目的とした。さらに同モデルを用いて、各種麻酔薬の細胞透過性亢進作用の有無を検討することとした。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養および試薬

正常ヒト肺動脈内皮細胞(HPAEC、クラボウ)は内皮細胞培地キット-2(EGM-2、2%ウシ胎児血清、Lonza)により継代培養を行い、実験には5-7継代目の細胞を用いた。*In vitro*血管内皮細胞モデル作製時には、EGM-2から付属添加因子の一つのVEGFを除いた培地を使用した。評価にはNPY(Phoenix Pharmaceuticals)の他に、既知の細胞透過性亢進物質として、組換えヒトVEGF-A₁₆₅(rhVEGF)、ヒスタミン(共に和光純薬)、リポポリサッカライド(LPS、Sigma)、腫瘍壊死因子(TNF- α 、Peprotech)、ブラジキニン(ペプチド研究所)を使用した。また、麻酔薬として、フェンタニル(第一三共)、ミダゾラム(アステラス製薬)、ケタミン(第一三共)、プロポフォール(丸石製薬)、ロピバカイン(アストラゼネカ)および揮発性吸入麻酔薬のイソフルラン(アボット)とセボフルラン(丸石製薬)の評価を行った。

(2) ウエスタンブロットティング

HPAECにおけるNPY-Y3受容体蛋白質の発現確認はウエスタンブロット法で行った。10cmデッシュに培養した細胞を1%トリトンX-100(和光純薬)およびプロテアーゼ阻害剤カクテル(Roche)を含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を用いて回収し、蛋白質濃度をBCAプロテインアッセイキット(Pierce)で測定した。細胞溶解液とLaemlliバッファーを用いて1mg/mL濃度のウエスタンブロットティング用サンプルを調製した。一定量の蛋白質(20 μ g)を15%濃度のポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)により分離した。その後、Polyvinylidene Difluoride(PVDF)膜(BIO-RAD)に、セミドライ方式で転写を行った。PVDF膜を5%(w/v)スキムミルク(和光純薬)を含む0.1%Tween-20 Tris緩衝生理食塩水(TBS-T)と室温で1時間反応させてブロッキングを行った後、一次抗体として1000倍希釈したウサギ抗ヒトNPY3R抗体(Alpha Diagnostic)と4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。翌日、Horseradish Peroxidase(HRP)標識二次抗体(Cell Signaling)と室温で1時間反応させた後、ECL Western Blotting Detection System(GE Healthcare)を用い、抗体反応物質の化学発光をイメージャー(ImageQuant LAS4010、GE Healthcare)で検出した。NPY-Y3受容体蛋白質検出における陽性対照として、ラット副腎髄質由来の褐色細胞腫PC12の細胞溶解液(BD Biosciences)を20 μ g蛋白質/レーンでSDS-PAGEに供した。

また、NPY3R 蛋白質検出後、PVDF 膜をストリップバッファー (Thermo scientific) で処理した後、再度ブロッキングを行い、ハウスキーピング蛋白質であるアクチンを、マウス抗ベータアクチン抗体 (1:10000, abcam) を用いて上記と同様の方法で検出した。

(3) 細胞透過性試験

ダブルチャンバー法による *In vitro* 血管内皮細胞モデルは、円筒の下部に 1 μm の孔を持つポリエチレンテレフタレート膜のついたミリセル[®] (Millipore) 内に HPAEC を 5×10^5 cells/cm² で播種し、ミリセル[®] 外側の 24 穴プレートのウェル中にも液高が等しくなるように培地を入れ、5% CO₂ インキュベーター内で培養することにより作製した。細胞透過性評価は PET 膜上の細胞がコンフルエントに到達した播種 3 日後に行なった。

ミリセル[®] 内の上室には評価物質とイソチオシアン酸フルオレセイン (FITC) で標識されたアルブミン (最終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含む培地を、ミリセル[®] 外の下室ウェルには上室と同濃度の評価物質を含む培地を添加し、5% CO₂ インキュベーター内で培養した。揮発性吸入麻酔薬の評価の際は、上室に FITC-アルブミン溶液、下室に培地を添加し、気化器を用いてイソフルラン 2% またはセボフルラン 3% に調整した 5% CO₂ インキュベーター内に培養プレートを置き、麻酔薬に曝露させた。

培養終了後、ウェル中に移行した FITC-アルブミンを蛍光光度計 (POWERSCAN 4, DS ファーマバイオメディカル) により測定し (励起波長 490 nm, 蛍光波長 525 nm) 細胞透過性の指標とした。同時に、HPAEC を播種していないミリセル[®] を用いて透過実験を行い、評価物質を添加していないコントロール群と比較した。さらに透過実験終了後、ミリセル[®] 内の細胞を 4%ホルマリンで固定したのち、ギムザ染色し、血管内皮細胞層形成の有無を確認した。(図 1)

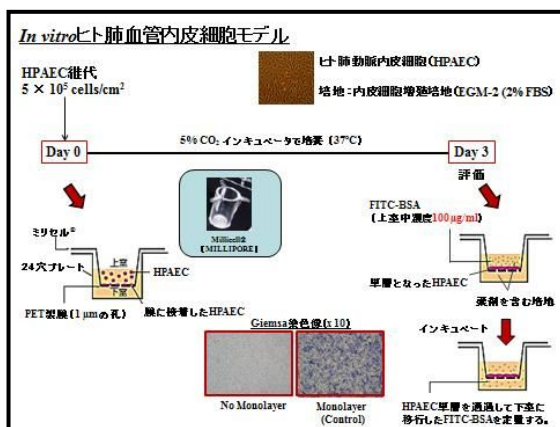


図 1: *In vitro* 血管内皮細胞モデル作製方法

(4) 統計解析

データは全てコントロール群を 100%とした時の相対値を平均値 \pm 標準誤差で示した。統計解析はすべて SPSS ソフトウェア (IBM) を用い、両側 t 検定もしくは一元配置の分散分析後の両側 Dunnett 検定により解析した。P 値が 0.05 より小さい場合に統計学的に有意とした。

4. 研究成果

(1) HPAEC における NPY-Y3 受容体の発現

In vitro 肺血管内皮細胞モデルに使用する HPAEC が、神経原性肺水腫の作用点と考えられている NPY-Y3 受容体を発現しているか否かについて、ウエスタンブロッティング法で検討した。その結果、陽性対照として用いた PC12 細胞溶解液と同様に、HPAEC 細胞溶解液で抗 NPY-Y3 受容体抗体陽性蛋白質バンドが検出された (図 2)。

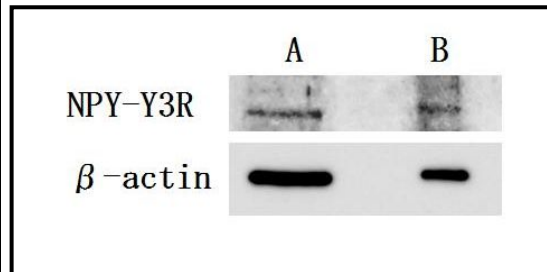


図 2: HPAEC 細胞溶解液を用いた NPY-Y3 受容体イムノブロッティング

(A: HPAEC 細胞溶解液、B: PC12 細胞溶解液)

(2) *In vitro* 肺血管内皮細胞モデル

本研究で構築した *In vitro* 肺血管内皮細胞モデル系を用いた NPY の細胞透過性亢進作用評価に先立ち、すでに細胞透過性亢進作用を示すことが報告されている薬剤およびペプチドについて、それらの作用を本評価系で検出できるかどうかの検討を行った。その結果、試験に供した全ての薬剤およびペプチドで統計学的に有意な細胞透過性亢進作用が認められた (表 1)。これにより、細胞モデル系を確立できたと判断し、NPY や各種麻酔薬の評価を行うことも妥当であると考えた。

表 1: *In vitro* 肺血管内皮細胞モデルを用いた既報の細胞透過性亢進物質の作用

物質名	濃度	反応時間 (時間)	細胞透過性 (コントロール100%)
rhVEGF	100 ng/mL	1	119.2 \pm 0.0 **
LPS	100 ng/mL	1	185.2 \pm 7.4 **
TNF- α	1 ng/mL	4	144.9 \pm 2.9 **
ヒスタミン	100 μM	1	159.3 \pm 14.8 **
ブラジキニン	100 μM	1	185.2 \pm 11.1 **

データは全て平均値 \pm 標準誤差で示す (N=3)。
* p<0.05, ** p<0.01 でコントロールに対し有意差あり (両側検定)

(3) *In vitro* 肺血管内皮細胞モデルを用いた NPY の細胞透過性亢進作用の検討

上記細胞モデルを用いて、NPY の細胞透過性亢進作用の有無を検討した。NPY は、 $1 \times 10^{-11} \sim 1 \times 10^{-7} \text{ M}$ の広範な濃度範囲で添加し、0.5、1、2、4、8、24 時間の反応時間で試験を行なった。その結果、NPY はいずれの濃度および反応時間においても有意な細胞透過性亢進作用を示さなかった。また、低酸素(5%酸素濃度)条件下においても検討を行なったが、NPY の有意な効果は観察されなかった(図3、反応時間:24 時間)。さらに、NPY が交感神経終末でカテコールアミンのコトランスミッターとして作用することから、ヒト血中濃度レベルのノルエピネフリン(NE、 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$)存在下での NPY の細胞透過性亢進作用を検討した。その結果、 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ の NPY は NE 共存下においても有意な作用を示さなかった。また、低酸素濃度条件下でも同様であった(図4、反応時間:24 時間)。

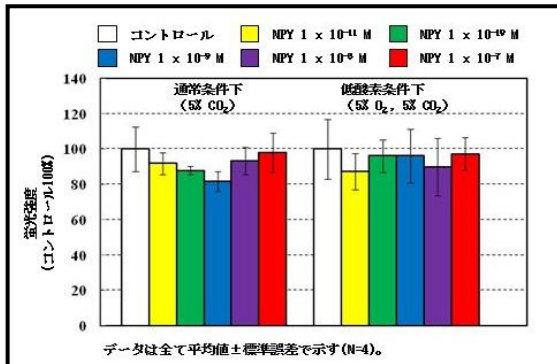


図3: *In vitro* 肺血管内皮細胞モデルを用いた NPY 単独の細胞透過性亢進作用の検討結果(反応時間:24 時間)

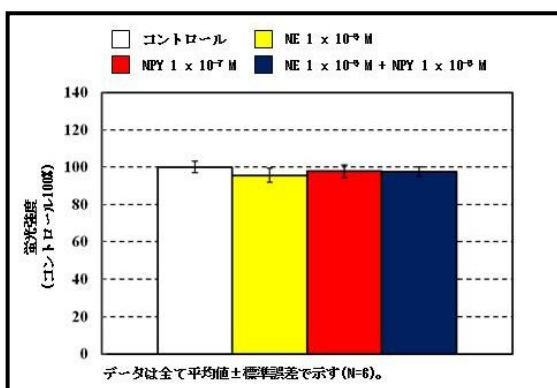


図4: *In vitro* 肺血管内皮細胞モデルを用いた低酸素条件下における NPY と NE の細胞透過性亢進作用の検討結果(反応時間:24 時間)

(4) 各種麻酔薬の細胞透過性亢進作用

In vitro 肺血管内皮細胞モデルを用いて、メカニズムの異なる麻酔薬の細胞透過性亢

進作用の有無を検討した。今回試験したフェンタニル(オピオイドμアンタゴニスト)、ミダゾラム(ベンゾジアゼピンアゴニスト)、ケタミン(NMDA アンタゴニスト)、プロポフォール(GABA-A アンタゴニスト)ロピバカイン(Na チャンネルブロッカー)は、臨床有効血中濃度で添加し、反応時間は最大8時間まで検討したが、全てにおいて有意な細胞透過性亢進作用は認められなかった。また、揮発性吸入麻酔薬の2剤についても、臨床使用濃度での曝露に対し、有意な細胞透過性亢進作用を示さなかった(表2、反応時間:8 時間)。

表2: *In vitro* 肺血管内皮細胞モデルを用いた各種麻酔薬の細胞透過性亢進作用の検討結果

麻酔薬	濃度	細胞透過性 (コントロール100%)
フェンタニル	3 ng/mL	92.7 ± 2.3
ミダゾラム	100 ng/mL	92.4 ± 2.7
ケタミン	300 ng/mL	90.8 ± 2.2
プロポフォール	3 μg/mL	95.2 ± 2.7
ロピバカイン	2 μg/mL	91.4 ± 3.2
イソフルラン	2%	103.4 ± 2.3
セボフルラン	3%	93.1 ± 3.1

データは全て平均値 ± 標準誤差で示す (N=6)。
反応時間:8時間

(5) 研究結果の考察および今後の検討課題

本研究において、NPY の作用点と考えられていた NPY-Y3 受容体蛋白質を HPAEC で検出したが、NPY 単独、5%酸素濃度の低酸素条件下および NE 共存下のいずれにおいても細胞透過性亢進作用は観察されなかった。このことから、NPY の細胞透過性に関する作用点は肺動脈内皮細胞ではないことが示唆された。NPY-Y3 受容体はリガンド結合の難しさのためクローニングが困難であった。現在、NPY-Y3 受容体は、ケモカインレセプター CXCR4/LESTR/Fusin と同一の受容体であるとされている。しかしながら、CXCR4 がリガンドである stromal cell-derived factor-1 との結合後、単球とリンパ球の遊走を強く誘導することなどが明らかにされていることは対照的に、同受容体への NPY の結合を否定する報告(Loetscher M et al. J Biol Chem 1994; 269: 232-7)もあり、NPY-Y3R に関する分子レベルでの研究は進んでいない。このような状況も踏まえ、Y3 受容体以外のサブタイプに対する作用の再検討が必要であると思われる。併せて、肺動脈内皮細胞だけではなく、交感神経終末のある血管平滑筋細胞を用いた検討も必要であると考えられた。本研究で確立した *in vitro* 肺血管内皮細胞モデルは、NPY の血管平滑筋細胞刺激により分泌される物質による間接的な細胞透過性亢進作用の評価にも有用であると思われる。

一方、*in vitro* 肺血管内皮細胞モデルを用

いた各種麻酔薬の検討において、臨床有効血中濃度で有意な細胞透過性亢進作用を示す薬物は認められなかった。その原因として、HPAEC に薬物受容体およびチャネルが発現していないことが考えられた。麻酔薬は主として神経系の細胞に作用することから、血管内皮細胞モデルに供すること自体に無理があるように思われる。しかしながら、血管平滑筋細胞には Na チャネルが発現していることが報告されていることから、ロピバカインやリドカインなどの Na チャネルブロッカーにおいては、上記と同様に、血管平滑筋細胞に対する作用に伴う間接的な細胞透過性亢進作用の有無についての評価が可能であると思われた。

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0件)

[学会発表](計3件)

市川崇、松田直之、鈴木章悟、貝沼関志、西脇公俊

「Severe ARDS の病態生理」

第 60 回日本麻酔科学会

2013 年 5 月 23 日～2013 年 5 月 25 日

ロイトン札幌(札幌市)

尾関奏子、竹市広、水野祥子、萩原伸昭、青山正、市川崇、鈴木章悟、高橋英夫、貝沼関志、西脇公俊

「先天性気管狭窄症に合併した ARDS に対し veno-venous bypass extracorporeal membrane oxygenation (V-V ECMO) による治療が奏功した 1 症例」

第 21 回日本集中治療医学会 東海北陸地方会

2013 年 6 月 15 日～2013 年 6 月 16 日

じゅうろくプラザ(岐阜市)

貝沼関志、長柄祐輝、水野祥子、尾関奏子、萩原伸昭、青山正、市川崇、鈴木章悟、高橋英夫、西脇公俊

「名大外科系集中治療部での体外式補助人工心臓長期管理 6 症例の検討」

第 32 回日本蘇生学会

2013 年 11 月 8 日～2013 年 11 月 9 日

株式会社内田洋行ユビキタス協創広場 CANVAS 東京(東京都中央区)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西脇 公俊 (NISHIWAKI KIMITOSHI)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号: 10189326

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者

石川 直久 (ISHIKAWA NAOHISA)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号: 80109321