

## 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：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592303

研究課題名(和文)急性肺損傷発症機序の解明と、治療戦略の確立にむけた多角的アプローチ

研究課題名(英文)A diversified approach to investigate the mechanism of acute lung injury and to establish its therapeutic strategy

研究代表者

倉橋 清泰 (KURAHASHI, Kiyoyasu)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：50234539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：分離肺換気中の非換気側肺では炎症性メディエーターが増加し、一方非換気側にCPAPを付加するとこれらの変化を抑制したことから、非換気側のCPAPが胸部手術に伴う肺傷害の予防法になる可能性があると考えられた。この現象を普遍化し、急性呼吸窮迫症候群の如くの病態において無気肺を減らすような人工呼吸戦略を用いることは、動脈血酸素分圧を上げる目的に止まらず低酸素による肺の炎症を減らし肺傷害を軽減する可能性が示唆された。またHIF-1は低酸素によるTNF- $\alpha$ 誘導性炎症の増強に対して抑制的に働いており、HIF-1を活性化することが肺傷害の新たな治療的アプローチとしての可能性を持つことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found that pro-inflammatory cytokines are secreted in non-ventilated lungs during one-lung ventilation, while these cytokines were reduced when continuous positive airway pressure (CPAP) was applied in the non-ventilated lungs. Application of CPAP to non-ventilated lungs during one-lung ventilation would be a prophylactic approach for post-operative lung injury. These concepts may be generalized to ventilator strategies during acute respiratory distress syndrome (ARDS). The application of high positive end-expiratory pressure (PEEP) would be of benefit not only to improve arterial partial oxygen tension but also to ameliorate lung inflammation and concomitant lung injury by preventing lung tissue hypoxia. In addition, we found that hypoxia inducible factor (HIF)-1 reduces the inflammation, typical for TNF- $\alpha$  up-regulation during experimental hypoxemia in vivo and in vitro. It is suggested that activation of HIF-1 would be a potential therapeutic approach for lung injury.

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：急性肺傷害 HIF-1 肺胞上皮細胞 ARDS TLR-4 アポトーシス FasL

## 1. 研究開始当初の背景

ARDS は、肺微小血管透過性が亢進して、肺胞腔内、肺間質への滲出液貯留による著しい低酸素血症を示す疾患群であり、治療困難で死亡率が高い。また、その原因疾患には誤嚥、感染性肺炎、肺挫傷、有毒ガスの吸入、溺水など肺が一次損傷部位であるものに加え、敗血症、薬物中毒、多発外傷、大量輸血後、急性膵炎などの間接的な要因でも発症し、罹患患者数も相当数にのぼる。最近の米国の統計でも年間 20 万人が罹患し、8 万人余が死亡している。しかしながら、現在までに本症候群に対する有効な治療法は確立されていない。そこで本研究ではこの ARDS の発症機序を探究し、その鍵となる因子の修飾から ARDS を予防 / 治療する戦略を構築することを目標とする。

## 2. 研究の目的

ARDS の患者の病態として、低酸素血症がある。この原因のひとつには、肺の一部が潰れ酸素が供給されない部分いわゆる無気肺の部分が発見されている。無気肺は ARDS の結果でもあるが原因にもなると考えられる。我々は、無気肺の部分では肺の傷害を発生させる分子学的変化が生じており、無気肺を予防する事で肺傷害を軽減するとの仮説を立てた。無気肺の生じている肺部分と正常に換気されている肺部分を分離して、それぞれの部分における肺の炎症や傷害の程度にどのような差があるか、またその機序やそれらに関与する分子について探求する。

## 3. 研究の方法

### (1) in vivo 実験

無気肺における炎症をより詳細に調べるために、肺を正常に換気される部分と換気がされずに潰れる部分とに分離する。全身麻酔、両側開胸下のラットの左主気管支に気管切開口より気管チューブを挿入し、片肺換気を行う。その後右肺については、大気に開放し

て無気肺を形成する群 (OLV 群) と、右肺に 5cmH<sub>2</sub>O の continuous positive airway pressure (CPAP) を付加する群 (CPAP 群) とにランダムに割り振る。

### 換気条件

sham group : 両肺換気

OLV group : 左肺換気 + 右肺虚脱

CPAP group : 左肺換気 + 右肺 CPAP 付加

これらの条件で 4 時間人工呼吸を行い、血液を採取の後安楽死させて肺を取り出し、ホモジェネート、病理組織等に供する。

一組のラットは、それぞれの換気条件下にラジオアイソトープラベルしたマクロアルブミンを静脈内投与し、後に取り出した肺のアイソトープレベルから肺血流量の左右比を求めた。

### (2) 肺上皮細胞の cell line を用いた低酸素暴露実験

肺における低酸素誘導性炎症における HIF-1 の役割を調べるために、マウス肺上皮細胞株 MLE15 を用いて、in vitro における低酸素誘導性炎症モデルを作成した。

siRNA を用いて HIF-1 をノックダウンし、炎症性メディエータ分泌に与える影響を検討した。

また、炎症を司る主たる転写因子である (nuclear factor) NF- $\kappa$ B に対して、低酸素及び HIF-1 がどのような影響を与えているかを検討した。

## 4. 研究成果

分離肺換気により、非換気側肺は換気側肺に比べて 20%程度まで血流が減少したが、CPAP の付加により、この比は 70%程度まで有意に上昇した (data not shown)。

非換気側肺の炎症性メディエータは上昇した。一方 CPAP の付加により、この上昇は有意に抑えられた (図 1)。

免疫組織染色では、非換気側肺の HIF-1 $\alpha$  が強発現していたが、sham 群と CPAP 群では

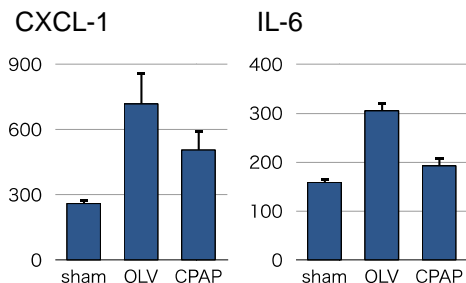


図1. 非換気側肺内の炎症性サイトカイン濃度  
CXCL-1: (C-X-C motif) ligand 1; IL-6:  
interleukin-1

その程度が減少していた(図2A)。また、HIF-1の下流遺伝子である vascular endothelial growth factor (VEGF)-A や glucose transporter (GLUT)-1 は OLV 群で有意に上昇し、CPAP 群ではそれが抑制された(図2B)。

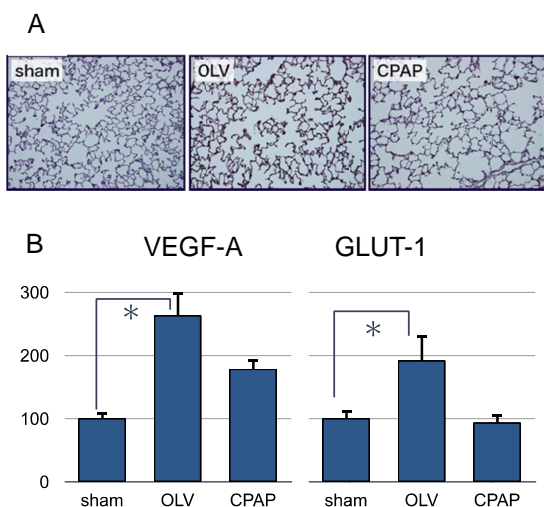


図2. (A) HIF-1 $\alpha$ 免疫染色。(B) HIF-1下流遺伝子の mRNA の発現量。Sham 群に対する比率。\* : p < 0.05  
VEGF: vascular endothelial growth factor; GLUT: glucose transporter

培養細胞を用いた低酸素暴露実験で、細胞は低酸素暴露によりより多くの炎症性サイトカインを産生した。また、HIF-1 を knock down (K/D) した細胞は低酸素によりさらに多くのサイトカインを産生した(図3)。

分離肺換気中の非換気側肺では炎症性メディエーターが増加した。一方、非換気側に CPAP を付加すると炎症を抑制したことから、非換気側の CPAP が胸部手術に伴う肺傷害の

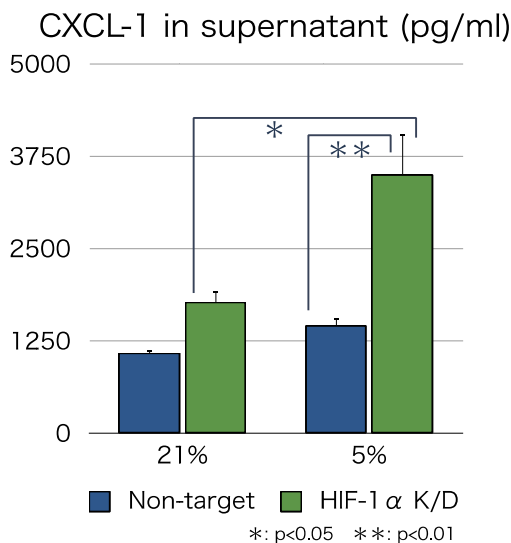


図3. 肺胞上皮細胞の低酸素暴露による炎症性サイトカイン産生  
CXCL-1: (C-X-C motif) ligand 1

予防法になる可能性があると考えられた。この現象を普遍化し、急性呼吸窮迫症候群の如くの病態において無気肺を減らすような人工呼吸戦略を用いることは、動脈血酸素分圧を上げる目的に止まらず低酸素による肺の炎症を減らし肺傷害を軽減する可能性が示唆された。また HIF-1 は低酸素による TNF- $\alpha$  誘導性炎症の増強に対して抑制的に働いており、HIF-1 を活性化することが肺傷害の新たな治療的アプローチとしての可能性を持つことが示唆された。

## 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 1件)

倉橋清泰: 術中機械換気と術後肺傷害. in ARDS の診療の現在の状況と今後の展望. 麻酔. 査読なし, 62 巻, 2013, 563-72

[学会発表](計 7件)

Tojyo K, Nagamine Y, Ota S, Baba Y, Goto T, Kurahashi K: Hypoxia-inducible factor-1 is up-regulated in hypoxia-induced lung injury and acts as anti-inflammatory transcription factor in lung epithelial cells. Euroanesthesia 2014. 2014.05.31-06.03. Stockholm, Sweden

東條健太郎、長嶺祐介、矢澤卓也、水原敬洋、後藤隆久、倉橋清泰：無気肺における肺胞低酸素は肺傷害を引き起こす。日本麻酔科学会総会。2014.05.15-17。パシフィコ横浜（神奈川県）

倉橋清泰：肺保護換気が必要な手術麻酔。in 麻酔中の人工呼吸再考(シンポジウム)。日本臨床麻酔学会総会(招待講演)

2013.11.01-03。石川県立音楽堂(石川県)

東條健太郎、長嶺祐介、矢澤卓也、後藤隆久、倉橋清泰：分離肺換気中の非換気側肺において無気肺に伴う低酸素が炎症を惹起する。第107回臨床呼吸生理研究会。2013.6.22 コンベンションホールAP浜松町(東京都)

Tojo K, Nagamine Y, Ota S, Baba Y, Goto T, Kurahashi K: Alveolar Hypoxia During One-Lung Ventilation Leads to HIF-1 Activation and Lung Inflammation in the Non-Ventilated Lung. American Thoracic Society International Conference 2013.5.17-22, Philadelphia. U.S.A.

Tojo K, Ota S, Baba Y, Koga M, Goto T, Kurahashi K: Application of Continuous Positive Airway Pressure to the Collapsed Lung During One-Lung Ventilation Attenuates Lung Inflammation Via HIF-1 Pathway. American Society of Anesthesiology Annual Meeting. 2012.10.13-17, Washington, D.C. U.S.A.

東條健太郎、大田周平、馬場靖子、古賀資和、後藤隆久、倉橋清泰：分離肺換気中の虚脱肺へのCPAP付加は肺の炎症を軽減する。日本麻酔科学会総会。2012.06.7-9, 神戸ポートピアホテル(兵庫県)。

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

倉橋清泰(KURAHASHI, Kiyoyasu)  
横浜市立大学・医学部・准教授  
研究者番号：50234539

### (2)研究分担者

矢澤卓也(YAZAWA, Takuya)  
杏林大学・医学部・准教授  
研究者番号：50251054

馬場靖子(BABA, Yasuko)

横浜市立大学・市民総合医療センター・講師  
研究者番号：80453041

### (3)連携研究者

斎藤泉(SAITO, Izumu)  
東京大学・医科学研究所・教授  
研究者番号：70158913