

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2011～2012
課題番号：	23791239
研究課題名（和文）	新生児慢性肺疾患の出生前発症誘導における酸化還元バランスの破綻について
研究課題名（英文）	Antenatal priming theory about induction of neonatal chronic lung disease: collapse of redox balance.
研究代表者	
	長谷川 昌史 (Hasegawa Masashi)
	大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：	80388264

研究成果の概要（和文）：新生児慢性肺疾患が出生前のストレスによる酸化還元状態の変化で発症誘導されていると仮定し細胞モデルで検討した。L2 細胞へ TNF α 負荷後 TGF β を添加すると上皮間質転換が増強された。細胞内 GSH は TGF β 添加後低下し、GSH が枯渇した状態で TNF α 前負荷を行うと上皮間質転換がより増強した。TNF α 前負荷後は細胞内過酸化水素が増加し、カタラーゼ製剤の添加で上皮間質転換が軽減した。細胞内の酸化還元状態によりストレスに対する細胞の反応に影響を与えたと考えられた。

研究成果の概要（英文）：I think that neonatal chronic lung disease may have been developed by prenatal changes of the redox state, and tested the assumption in a cell model. Epithelial mesenchymal transition (EMT) is enhanced by exposure of TNF α and TGF β to L2 cells. Intracellular GSH decreased after addition of TGF β , and EMT is more enhanced by GSH depletion and TNF α preload. Intracellular hydrogen peroxide increased by TNF α preload and EMT is reduced by the addition of catalase mimic. I think that redox status of cells influence the cellular response to prenatal stress.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 胎児・新生児医学

キーワード：未熟児医学 慢性肺疾患 上皮間質転換 酸化還元状態 活性酸素

1. 研究開始当初の背景

新生児慢性肺疾患、あるいは気管支肺異形成(BPD, bronchopulmonary dysplasia)は、本来肺呼吸には適さない未熟肺に複合的なダメージが積み重なって生ずる早産児特有の慢性呼吸器疾患であり、肺胞発育の停止と間質の線維化の様々な程度の混在を特徴とする。

傷害因子としては、出生後の酸素毒性や人工呼吸器による圧容負荷が主なものであるが、出生前の胎盤感染や絨毛膜下血腫など

の胎児環境の悪化も統計的に BPD を重症化させ得る因子であることが知られている。しかしながらその機序は未だ推測の域を出ない。

最近、細胞内の酸化還元状態 redox signaling system が、アポトーシス経路や生存に関わる PI3K-Akt pathway、あるいは NF κ B などの転写因子活性の調節を通して、細胞の増殖、分化からアポトーシス、ネクローシスに至るまでに直接間接にかかわっていることが次第に明らかとなりつつある。

(Schafer F. Q. and Buettner G. R. (2001) Free Radic. Biol. Med. 30, 1191-1212.)

Redox signaling system は周囲の酸化還元環境(以下 redox 環境)に大きく影響される。Redox 環境はすべての酸化還元物質の酸化還元電位の総和として電位で示されるが、細胞内では量的に他の酸化還元物質を大きく凌駕する glutathione / glutathione disulfide (2GSH/GSSG) couple によって実質上規定されている。さらには量的にははるかに少ないが thioredoxin, glutaredoxin, peroxiredoxin なども redox signaling の調整にかかわっている。

また慢性肺疾患の組織の特徴として肺胞の発育の停止と肺線維化の混在があげられる。その中でも線維化には myofibroblast が重要な役割を果たすと考えられているが、その起源は fibroblast だけでなく肺などの上皮細胞からも TGF- β 等によって分化するという上皮間質転換が注目されている。さらに慢性肺疾患の患児で気管支肺胞洗浄液中の TGF- β が高かったという報告もある。

2. 研究の目的

未熟児に長期の酸素治療が必要となる新生児慢性肺疾患の成因はいまだ不明である。一般的に考えられる増悪因子は出生後の酸素毒性や人工呼吸器による圧容量負荷であるが、胎内での障害との関連はいまだ証明されていない。また近年 GSH, GSSG などの測定により求められる酸化還元電位が細胞の状態(増殖、分化、アポトーシス、ネクローシス)と関連することが報告されている。

本実験では胎内環境下のストレス(胎盤感染や絨毛膜下血腫)による酸化還元環境の変化に着目し、胎内感染の場合は炎症性サイトカインが、絨毛膜下血腫の場合は遊離の鉄イオンの介在等によって生じる種々のフリーラジカルが、これらの細胞の redox 環境を酸化傾向に移行させることによって細胞活性を低下させ、その状態で出生後の酸素などの傷害因子にさらされると細胞内環境がさらに酸化へと傾き極端な場合は細胞死へ、あるいは増殖、分化の停止や、上皮間質転換(epithelial-mesenchymal transition, EMT)によってコラーゲンを産生する間質細胞に変化するなど様々な程度に細胞の運命を狂わせその集大成として慢性肺疾患が出生前にあらかじめ発症誘導されているのでは、と

いう仮定の元に培養細胞モデルで検討する。

慢性肺疾患のメカニズムに上皮間質転換が重要な役割を果たすと考え、細胞モデルでの TGF- β による上皮間質転換を確認した上で炎症性サイトカイン前負荷の上皮間質転換への影響やフリーラジカルとの関連、抗酸化剤の上皮間質転換への影響などを調べ、GSH, GSSG で規定される細胞内酸化還元状態とストレス負荷後の細胞の変化との関わりを明らかにして慢性肺疾患の成因を探る。

3. 研究の方法

(1) 肺上皮培養細胞である L2 細胞を用いて control 群, TGF- β 添加群(TGF- β 10ng/ml 72hr)、TNF α 前負荷群(TNF α 100ng/ml 24hr or 48hr)、TNF α 前負荷後 TGF- β 添加群で比較。

(2) 上皮間質転換を上皮マーカーとして ZO-1, 間質マーカーとして α -SMA, Vimentin などを用いて免疫蛍光染色や RT-PCR を用いて評価。

(3) 細胞内の GSH, GSSG を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定し、
$$E_{hc} \text{ (mV)} = -287 - (59.1/2) \log \left(\frac{[\text{GSH}]^2}{[\text{GSSG}]} \right)$$
 の式で導かれる細胞の酸化還元状態を示す電位 half-cell reduction potential (E_{hc})を測定する。

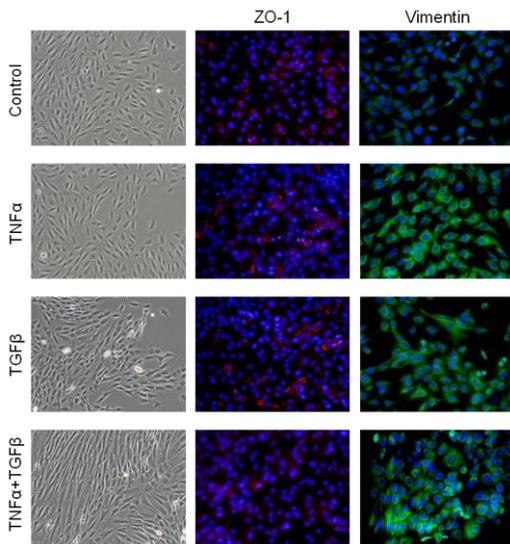
(4) SH 酸化剤である dimethyl maleate (DEM) による前処置で GSH を枯渇させた状態で、TGF- β 添加、TNF α 前負荷後 TGF- β 添加等による上皮間質転換への影響を調べる。

(5) 酸化ストレスの影響を調べるため、細胞内過酸化水素を特異的に検出する蛍光物質 BES-H₂O₂ を用いて過酸化水素の影響を測定。

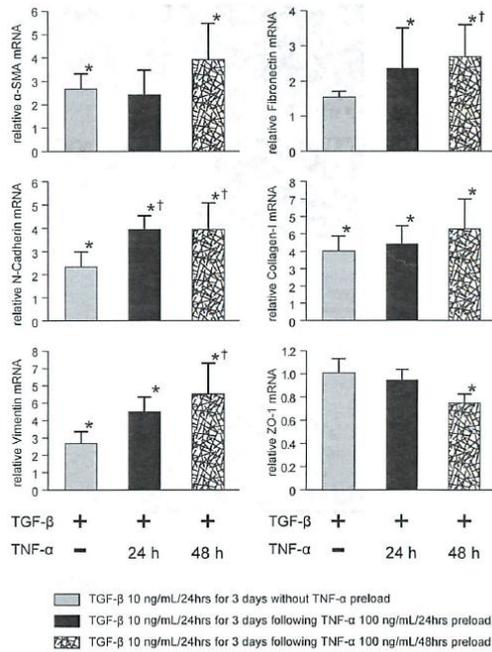
(6) 過酸化水素を分解する catalase mimic である EUK-134 を添加することで上皮間質転換が抑制できるかを検討。

4. 研究成果

(1) TGF- β の添加により免疫染色で上皮マーカーの ZO-1 減少と間質マーカーの Vimentin 増加を認め、上皮間質転換が認められた。TNF α 前負荷後 TGF- β 添加群ではより上皮間質転換の増強が見られた。TNF α 単独負荷のみでは上皮間質転換は認めなかった。

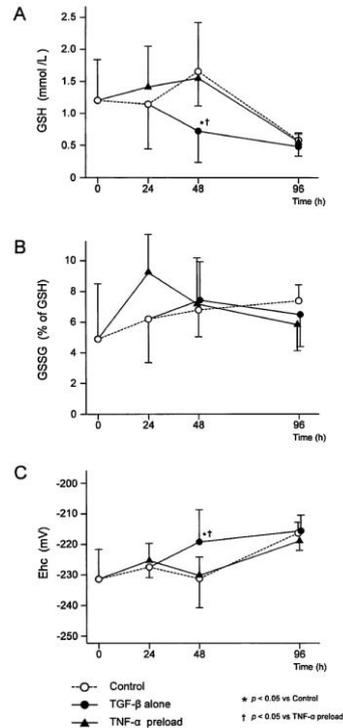


RT-PCR による mRNA 発現確認でも TNF α 前負荷後 TGF- β 添加群で上皮マーカーの ZO-1 減少と間質マーカーの α -SMA, N-Cadherin, Vimentin 等の増加を認め、上皮間質転換増強が認められた。

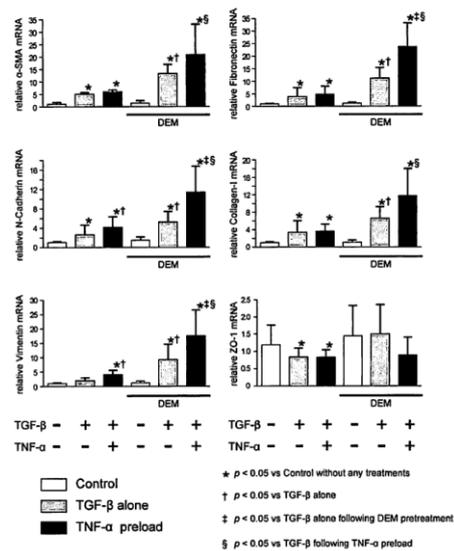


□ TGF- β 10 ng/mL/24hrs for 3 days without TNF- α preload
 ■ TGF- β 10 ng/mL/24hrs for 3 days following TNF- α 100 ng/mL/24hrs preload
 ▨ TGF- β 10 ng/mL/24hrs for 3 days following TNF- α 100 ng/mL/48hrs preload

(2) TGF β 添加群で細胞内 GSH は 48 時間で低下を認めた。TNF α 前負荷後 TGF β 添加群ではこの GSH 低下は見られなかった。GSSG については明らかな変化はなく GSH, GSSG から計算される酸化還元電位 Ehc は TGF β 添加群で 48 時間で電位は一過性に上昇した。



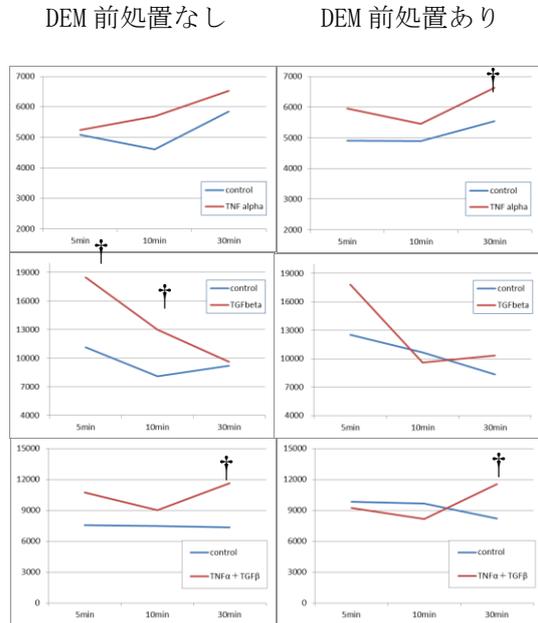
(3) DEM 前処置により GSH を枯渇させた状態では TNF α 前負荷後 TGF- β 添加群で上皮間質転換が DEM 非投与時と比べてより増強された。



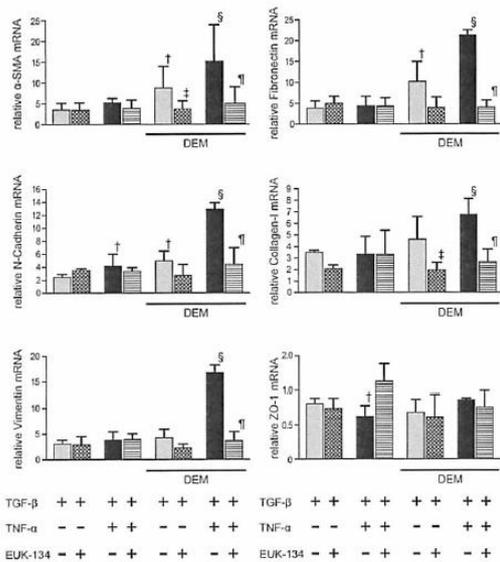
□ Control
 ■ TGF- β alone
 ▨ TGF- β + TNF- α preload
 ■ TGF- β + TNF- α + DEM

* $p < 0.05$ vs Control without any treatments
 † $p < 0.05$ vs TGF- β alone
 ‡ $p < 0.05$ vs TGF- β alone following DEM pretreatment
 § $p < 0.05$ vs TGF- β following TNF- α preload

(4) BES-H₂O₂を用いた蛍光測定で TGF β 添加単独や DEM 前処置により TNF α 前負荷後細胞内 H₂O₂ は増加していた。上皮間質転換への過酸化水素による酸化ストレスの関連が示唆された。



(5) 過酸化水素の分解を担うカタラーゼ製剤 EUK-134 の添加によって DEM 前処置時の TNF α 前負荷後 TGF-β 添加群の上皮間質転換の増強効果が打ち消された。



細胞内の酸化還元状態によりストレスに対する細胞の反応(上皮間質転換など)に様々な影響を与える可能性が示唆された。GSH 製剤やカタラーゼ製剤等の慢性肺疾患に対する予防治療への応用が期待される。

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 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 昌史 (Hasegawa Masashi)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：80388264