

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 8 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792081

研究課題名(和文) 上皮間葉相互移行を標的とした急性肺損傷後の上皮修復メカニズムの解明と治療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms of epithelial-mesenchymal interactions in epithelial repair processes during acute lung injury and its clinical application

研究代表者

橋本 壮志 (Hashimoto, Soshi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60515279

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：マウスに塩酸を片肺気管内投与し、急性肺損傷モデルを作成した。組織学的解析では、投与24時間後に炎症細胞浸潤と浮腫、出血を認め、14日後には肺組織の線維化を確認した。このモデルを用い急性肺損傷後の上皮修復メカニズムを検討したが、上皮間葉相互移行の関与を証明するには至らなかった。一方でリコンビナントロンボモジュリン製剤投与により、組織学的に肺線維化を抑制する傾向が認められ、上皮修復機序に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have established a mouse model of acute lung injury by unilateral intratracheal instillation of hydrochloric acid. In lung histological analyses, we observed increased inflammatory cell infiltration, edema formation, and hemorrhages at 24 hours after instillation, and the development of pulmonary fibrosis at 14 days after instillation. However, we were not able to identify the mechanisms of epithelial-mesenchymal interactions in epithelial repair processes during acute lung injury. In the meantime, we found out recombinant thrombomodulin tended to prevent the development of lung fibrosis in histological analysis, suggesting that its effect might contribute to involve epithelial repair processes during acute lung injury.

研究分野：集中治療医学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：急性肺損傷 急性呼吸窮迫症候群 人工呼吸 上皮間葉転換

## 1. 研究開始当初の背景

急性肺損傷(Acute Lung Injury; ALI)および急性呼吸窮迫症候群(Acute Respiratory Distress Syndrome; ARDS)が1967年にAshbaughらによって提唱されて以来、さまざまな治療法が提案され、そして臨床評価がなされてきたが、未だに確立された治療法は存在していない。近年の集学的治療法の進歩に伴い、その死亡率は年々減少傾向にはあるものの、未だ30~40%と報告されており、救急・集中治療医学分野において挑戦的課題の1つとなっている。

ALI/ARDSでは、過剰に産生された炎症性メディエーターが肺胞上皮・内皮を傷害し、加えて血管透過性亢進に伴う肺胞内への浸出液貯留が肺胞虚脱を促し、肺における機能的ガス交換領域を限定させる。このため、ALI/ARDSでは人工呼吸管理が必要となることが多い。人工呼吸そのものは生命維持に必要であるが、近年人工呼吸そのものによる弊害も指摘されている。われわれも人工呼吸を施したマウスを用い、肺胞上皮の進展刺激によって肺胞内ATP濃度の増加を引き起こすこと、また外因性ATPが肺損傷を増悪させることを見出した(Respir Res. 13;9:79, 2008)。肺のガス交換機能を素早く回復させるには、肺胞上皮をはじめとする肺胞構成細胞から成る肺胞単位を正常に修復させる必要がある。以前われわれは細胞骨格制御タンパク質の1つであるmoesinが肺胞上皮に優位に発現し、肺損傷後の修復過程に重要な役割を担っていることを報告した(Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 295(4):L566-74, 2008)。

傷害された肺胞上皮の修復には、分化増殖反応を受けた型肺胞上皮細胞や骨髄由来の前駆細胞の傷害部位への生着が想定されている。秩序だった修復機構は、過剰な炎症反応による上皮間葉形質転換(Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT)によって修飾を受け、線維形成を主体とする組織再構築により、肺の無機能化を起こしうる。EMTとは、上皮細胞が間葉系様細胞に形態変化する現象であり、器官形成や腫瘍の浸潤、また慢性持続性炎症に伴う組織線維化の機序として注目を集めている。近年、急性炎症後の組織修復過程におけるEMTの関与が示唆されているが、EMTの誘因因子やシグナル経路に関しては未知の点が多く、その制御メカニズムの解明はEMTを標的とした創薬の開発に不可欠である。加えて、ALI/ARDSでは、肺胞上皮の傷害の程度と、その生命予後が相関するとも言われている。したがって、EMTを含めた肺胞上皮の正常修復メカニズムの解明は、ALI/ARDSの生命予後の改善を志向する上でもきわめて重要な研究課題といえる。

## 2. 研究の目的

ALI/ARDSの病態の中心は、さまざまな生体侵襲に対する免疫系の活性化に伴う肺の

非特異的炎症反応および透過性亢進に伴う肺水腫である。このため、以前より抗炎症に主眼を置いた治療法が開発が行われてきた。抗炎症療法は理論的にはALI/ARDSの病態を沈静化しうると考えられるが、実際には治療開始の時期や本症候群の病態そのものの多様性などの問題から、科学的根拠が得られるほどの治療効果は達成できていない。近年、再生医療分野の発展とともに、ALI/ARDSに対する治療効果に関しても動物実験レベルで検討されている。実際に間葉系幹細胞移植は肺損傷後の上皮修復に有効であるばかりか、炎症反応の修飾作用をも併せ持っていることが明らかとなっている。しかし、幹細胞移植による再生治療の臨床応用には、様々な障壁があることも事実である。一方で、薬学的に上皮修復・再生を誘導し、肺胞の正常機能を回復させることができれば、近未来的に実現可能な治療法となりうる。特に肺の基本的特性ともいえるガス交換機能の早期回復は、人工呼吸器装着期間を短縮し、集中治療に伴う多大な人的ならびに医療資源の削減に寄与し、また医学的にもALI/ARDSの生命予後の改善に貢献する可能性があると考えられる。

## 3. 研究の方法

塩酸片肺気管内投与による急性肺損傷モデルマウスを用いて、肺損傷後の修復過程において、EMTがいかなる時期で誘導され、どれほどの意義を持つかについて検討する。具体的には、C57BL/6マウスを用い、0.1Nの塩酸を2ml/kg左肺に気管内投与し、急性肺損傷モデルを作成する。EMTの代表的な指標であるE-cadherinの遺伝子発現の抑制、またその組織内局在の変化を調べる。また、間葉系マーカーであるfibronectin、 $\alpha$ -SMA、vimentin等について、その発現の経時的変化を観察し、同時に肺胞上皮細胞マーカーとの2重染色によって、上皮細胞が間葉系細胞の形質を獲得するかどうかを評価する。また、リコンビナントトロンボモジュリン製剤を急性肺損傷モデルマウスに投与し、肺損傷や線維化の程度をコントロール群(生食投与群)と比較検討する。

### E-cadherin 遺伝子の発現解析

E-cadherinは上皮細胞の代表的な接着分子であり、細胞間接着に寄与し、EMT獲得に伴い発現が抑制されることから、EMTの代表的な指標の一つとなっている。マウス傷害肺を摘出し、RNAを抽出したあとに、逆転写酵素を用いてcDNAを合成する。E-cadherinの遺伝子発現を、このcDNAテンプレートをもとに、リアルタイムPCRによって定量評価する。

### E-cadherin タンパクの発現量、局在解析

ウェスタンブロッティング法を用いてタンパク発現量の変化を調べる。SDS-PAGE泳動後、ゲルからタンパク質を電氣的にメンブ

ンに固定化させ、HRP を用いて目的タンパクを検出する。また免疫組織学的手法によって、傷害肺における E-cadherin タンパクの局在を評価する。マウス肺組織をパラホルムアルデヒドにて固定し、パラフィン切片を作製する。

型肺胞上皮細胞のマーカーである pro-SPC との 2 重染色によって、型肺胞上皮細胞における E-cadherin の発現量の経時的変化について調査する。

fibronectin、 $\alpha$ -SMA、vimentin の発現解析 E-cadherin と同様に fibronectin、 $\alpha$ -SMA、vimentin についても、ウェスタンブロッティングや免疫組織染色によって、それぞれの発現量の経時的推移を観察する。Pro-SPC との 2 重染色によって、実際に塩酸投与肺損傷モデルにおける傷害肺の修復過程において、肺胞上皮細胞の上皮間葉転換の獲得の有無や形質転換の時期について in vivo で評価する。

#### 薬剤投与による治療効果の判定

塩酸投与と急性肺損傷モデルマウスに、リコンビナントトロンボモジュリン製剤を経静脈的に投与する。急性肺損傷の重症度評価には肺乾湿重量比や肺胞内タンパク濃度、気管支肺胞洗浄液中の細胞成分解析や、ELISA によるサイトカインアッセイ、肺組織学的評価によって行い、炎症反応の修飾の度合を評価する。また、肺線維化の評価として、Masson trichrome 染色あるいは Sirius Red 染色による肺の組織学的評価を行う。

#### 4. 研究成果

マウスに塩酸を片肺気管内投与し、急性肺損傷モデルを作成した。組織学的解析では、投与 24 時間後には肺組織内への炎症細胞浸潤、浮腫および出血を認め、急性肺損傷の病理像を呈していることを確認した。さらに投与 7 日後には肺胞間質の細胞浸潤と浮腫の進行を認め、14 日後には肺組織の線維化形成を確認した。

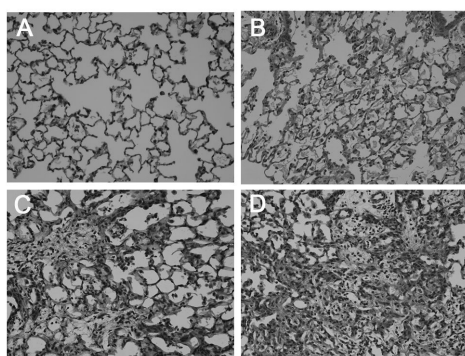


図. マウス片肺塩酸投与による肺組織像の経時的変化

A: 対照群、B: 塩酸投与 24 時間

C: 塩酸投与 7 日、D: 塩酸投与 14 日

このモデルを用い急性肺損傷後の上皮修復メカニズムを検討したが、上皮間葉相互移行の関与を証明するには至らなかった。一方でリコンビナントトロンボモジュリン製剤投与により、組織学的に肺線維化を抑制する傾向が認められたが、気管支肺胞洗浄液を用いた炎症細胞数の解析では、生食投与群と比較して有意差を認めなかった。これは、トロンボモジュリン製剤の単回投与による比較検討実験から得られた結果であり、今後は持続投与による有効性の評価が重要と考えられた。トロンボモジュリン製剤による肺線維化の抑制効果は、さらに検討を加える必要があるが、急性肺損傷過程における上皮修復機序に關与する可能性が示唆された。

#### 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 3 件)

Momoka Tonan, Soshi Hashimoto, Akio Kimura, Hiroki Matsuyama, Hiromi Kinose, Maiko Sawada, Nobuaki Shime, Natsuko Tokuhira, Yuko Kato, Masayuki Sasaki, Kunihiko Tsuchiya, Satoshi Higaki, Tadaki Oomae, Satoru Hashimoto. Successful treatment of severe asthma-associated plastic bronchitis with extracorporeal membrane oxygenation. J Anesth 2012 Apr;26(2):265-8.

橋本壮志, 志馬伸朗, 橋本悟. 急性呼吸促進症候群に対する人工呼吸管理法の単施設・10 年間の変遷. 日本集中治療医学会雑誌 20:287-8, 2013.

Soshi Hashimoto, Nobuaki Shime. Evaluation of semi-quantitative scoring of Gram staining or semi-quantitative culture for the diagnosis of ventilator-associated pneumonia: a retrospective comparison with quantitative culture. Journal of Intensive Care 1:2, 2013.

[学会発表](計 2 件)

Soshi Hashimoto, Nobuaki Shime, Satoru Hashimoto. Ten Year Trend Of Ventilator Settings For Acute Lung Injury: A Single Institute Investigation. 2012 ATS International Conference, San Francisco, California, 2012.5.20.

橋本壮志, 志馬伸朗, 溝部俊樹, 橋本悟, 佐和貞治. シンポジウム 3 VAP をなくすための総合戦略. 下気道検体の定量培養結果は直接鏡検/定性培養にて予測できるか? 第 39 回日本集中治療医学会学術集会, 千葉, 2012.2.29.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 壮志 (SOSHI HASHIMOTO)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：60515279

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし