

## 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 5 月 13 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23792084

研究課題名（和文）網羅的遺伝子発現解析と PEEP 模擬伸展刺激による人工呼吸関連肺障害の解明

研究課題名（英文）The mechanism by which excessive stretching induces gene expressions and protein production of inflammatory mediators in cultured human pulmonary artery endothelial cells

研究代表者

小林 こず恵 (KOBAYASHI KOZUE)

北里大学・医療衛生学部・助教

研究者番号：60448975

研究成果の概要（和文）：

人工呼吸誘発肺傷害（VILI）の予防を最終目標とし、①培養細胞に過伸展模擬ひずみを加えた実験による IL-6 タンパク産生と遺伝子発現解析の時系列解析の結果から、カルシウムイオン濃度を起点とする機械的伸展から IL-6 産生に至る候補経路を推定した。②臨床において VILI の危険性を減らすとされている呼気終末陽圧（PEEP）を模擬したひずみを用いた実験を行い、PEEP によって IL-6 産生を抑制できる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

The aims of this study were to elucidate the mechanism by which stretching induces expression of inflammatory mediators in normal human pulmonary artery endothelial cells (HPAEC) when subjected to cyclic stretching, and to examine the effects of PEEP-like cyclic stretch on the IL-6 protein production. The starting point of candidate pathways inducing gene expressions is  $Ca^{2+}$  concentration in the cells changed by cyclic stretching. The IL-6 protein was produced by excessive cyclic stretching, but its production was significantly suppressed by PEEP-like cyclic stretching. HPAECs would be protected by PEEP during mechanical ventilation even if the cells are excessively stretched.

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	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：VILI、遺伝子発現解析、伸展刺激、PEEP

## 1. 研究開始当初の背景

呼吸器疾患や開胸手術などの後に人工呼吸器を装着した患者で呼吸状態が悪化するケースがある。人工呼吸下の病態は患者に大きく依存するので、現在、最適な人工呼吸の設定が困難な場合がある。

人工呼吸は呼吸器疾患治療、麻酔下・術後の呼吸管理にきわめて有用であるが、人工呼吸による肺の過伸展（過膨張）が、肺障害（ventilator-associated lung injury: VALI）を起こす場合があることがわかってい

る。Slutsky ら (Slutsky et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med, 1998) は、人工呼吸が肺障害を引き起こすだけでなく、全身性に臓器障害をもたらすという biotrauma 理論を唱えた。この理論によれば、人工呼吸による刺激によって、肺で炎症性サイトカインなど様々な物質が産生、活性化され、肺だけではなく全身の臓器までもが炎症反応を起こし、多臓器不全に陥る。また Ranajeri ら (Ranajeri et al., JAMA, 2000) は、人工呼吸 (PEEP [呼気終末陽圧人工呼吸] 併用) がサイトカイン濃度や

患者の生存率に影響すると報告している。これらに関連する死亡率は最近までは非常に高かった(40~60%)が、ここ数年で30~40%に減少しており、人工呼吸法の改善および多臓器不全(敗血症)の治療の向上によるものと思われる。しかし、依然としてその機序は明らかではない。肺障害を防ぐことは、人工呼吸からの早期離脱を促進させ、原疾患の予後良好が望める。これはICUや救急病棟の病床利用率(ベッド回転率)の向上、患者を迅速に受け入れる体制に貢献し、臨床においてきわめて大きい意義があると考えられる。この肺障害の全体像が遺伝子レベルで解明されれば、人工呼吸開始から離脱の過程で、肺障害に関連する遺伝子発現傾向、および/あるいは、それに起因するサイトカインの産生量変化を監視することで、状況に対応した人工呼吸の設定が可能になると期待される。

肺障害の先行研究では、肺胞上皮細胞に炎症性サイトカインであるTNF- $\alpha$ (腫瘍壊死因子)と伸展刺激を加えた実験で、炎症反応関連遺伝子の発現が、dos Santosら(dos Santos et al., *Physiol. Genomics*, 2004)によって報告されている。またKonstantinら(Konstantin et al., *Am. J. Physiol.*, 2003)は、肺動脈血管内皮細胞に大小2種類の伸展刺激を与え、Rho, proteinase-activated receptor (PAR-2), アポトーシス関与遺伝子が、大きい伸展のときに有意に発現することを示し、伸展の大きさで添加した薬剤の効果と伸展刺激に対する細胞の防御機能が調節されることを報告している。さらにCoplandら(Copland et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med*, 2003, 2004, *J. Cell. Phys.*, 2007)は、ラットを使用したin vitro, in vivo実験で、高一回換気量の人工呼吸に反応する遺伝子発現変化は早い段階で起こること、胎児ラットの上皮細胞で伸展による初期応答遺伝子発現の伝達経路について報告している。しかし、これらの研究では網羅的に遺伝子発現解析が行われているものは少数で、特定の遺伝子群の発現変化に注目している。また遺伝子発現データの詳細も公表されていない。

一方、すでにWebbら(Webb et al., *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1974)によってPEEPが肺障害を予防または減少させるという重要な役割があると報告している。Tremblayら(Tremblay et al., *J Clin Invest*, 1997)はラットの実験で、Ranjariらは臨床データより、人工呼吸(低一回換気量, 高PEEP)では、炎症性メディエーター(サイトカイン)はより低値を示し、これが、多臓器不全の発生やその結果患者の生存率改善に関与すると報告しているが、依然としてこの機序も明らかではない。

我々はこれまでに、培養細胞伸展装置によ

って、コラーゲン被覆シリコン膜の培養プレート上で培養された肺胞動脈内皮細胞に伸展刺激を加えてひずみを生じさせ、シリコン膜のひずみと細胞のひずみが一致することを確認した(小林こず恵他、*生体医工学*, 47巻5号)。また、12時間以内の伸展実験において発現レベルが変化した遺伝子の中からIL-1, IL-6とIL-8に注目し、IL-6とIL-8の発現が伸展刺激開始後1時間以内でピークに達すること、IL-6のタンパク質産生量が伸展開始後一定時間(6時間以上)経過してから有意に増加することを見出した。この結果は、Coplandらの報告に類似している。遺伝子が伸展開始早期に発現したことは、伸展刺激起因の障害は急性期に生じることを示唆する。IL-6のタンパク質産生量が伸展刺激3時間経過後から上昇し、6時間で有意に増加することは、伸展刺激によるサイトカイン産生の影響は3時間以降に出現することが予想される(仮説)。

## 2. 研究の目的

VALIメカニズムの解明とVALIを予防する人工呼吸の設定を最終目標とし、本研究ではin vitroの培養細胞伸展システムを用いて、機械的伸展が肺動脈血管内皮細胞に与える影響を明らかにする。遺伝子発現及びサイトカイン産生の時系列解析によって、機械的伸展からサイトカイン産生に至るシグナル伝達経路を同定し、人工呼吸が肺障害を引き起こす過程の遺伝子発現経路を予測する。

(1) 研究背景の仮説を検証するため、伸展刺激1時間以内に発現が変化する遺伝子を見つけ、それらとIL-6を含む伝達経路(パスウェイ)を検索する。さらに、伸展による影響が早期に限定されるものか確認するために、12時間以上の伸展実験を行う。

(2) (1)の実験条件にPEEPに相当する条件を加え、(1)の実験結果と比較する。PEEPはVALIの危険性を減らすとされているので、PEEPに相当する条件によって変化する伝達経路は、VALIに関連する重要な伝達経路であると考えられる。

網羅的遺伝子発現解析を用いて、伸展刺激とPEEPの肺細胞に及ぼす影響を統合的に研究することは独創的である。

刺激を単独あるいは複数同時に肺細胞に加え、その結果に対して時系列的に網羅的遺伝子発現解析を行い、炎症に至る遺伝子発現のパスウェイを解明した先行研究はない。

伸展とPEEPに関する伝達経路において炎症性物質産生につながる伝達経路が見つかれば、対症療法ではなく肺障害に至る前段階で投薬や呼吸管理による肺障害発症の予防(原因療法)が可能となる。そして結果として人工呼吸からの早期離脱を促進させ、原疾患治療が期待できる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 研究全般にわたる実験条件

①細胞播種：肺動脈血管内皮細胞を、コラーゲン被覆シリコン膜の培養プレート上の、細胞が設定どおりにひずみ範囲に播種し、増殖させる。この手法を用いた、VILI に関する伸展実験の報告がないので、本研究独自の実験手法となる。肺動脈血管内皮細胞は、肺での炎症性物質を肺のみにとどめるという重要な役割を果たしている、入手可能なセルラインの肺細胞で唯一、正常細胞由来の培養細胞である（肺胞上皮細胞は癌由来細胞）、伸展装置で設定したひずみと等しいひずみが細胞に生じるという理由で選択した。

②病理的人工呼吸模擬伸展（ひずみ 20%、周期 15 回/分、方形波）：Tschumperin ら

(Tschumperin et al., Am. Rev. Respir. Care., 2002) は、伸展率 17~22% の伸展を負荷して得られる 37~50% の細胞表面積の増大が、細胞死の原因となることを示している。これを受けて、Konstadin ら (Konstadin et al., Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol., 2003) は、5% と 18% の伸展刺激を負荷し、Shikata ら (Shikata et al., Exp. Cell Res., 2005) は、伸展刺激なしと 18% 伸展刺激負荷を行い、両方の研究ともそれぞれ伸展率 15% を超える機械的伸展を病理的伸展と位置づけている。我々も、肺全体を一つの球体と単純化して考え、呼吸時の体積、面積および長さの変化について肺気量分画から検討し、生理的伸展を 10%、病理的伸展を 20% とした。さらに、研究で使用する培養細胞伸展装置の最大伸展率は 20% であることから、病理的人工呼吸を伸展率（ひずみ）20% で模擬した。その他、PEEP 模擬ひずみを 3~5% とした。また、方形波は PCV (pressure control ventilation) を模擬し、周期 15 回/分は平均的な人工呼吸回数に相当する。

③ひずみ：VALI に関する肺構成細胞は、人工呼吸によって伸びひずみと圧縮ひずみを受ける（図 1）。PEEP 併用の場合は、圧縮ひずみが大きく関与することになる。しかし、研究で使用する培養細胞伸展装置が細胞に負荷するひずみは伸びひずみに相当する。本研究期間は、この伸びひずみによる影響に注目して研究を進める。

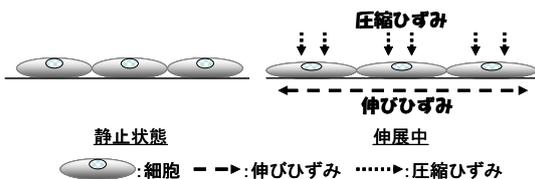


図 1. 細胞が受けるひずみ

(2) 病理的人工呼吸模擬伸展刺激による遺伝子発現量と炎症性物質産生量の時系列的計測

伸展装置に培養プレートを装着し、病理的人工呼吸模擬伸展（ひずみ 20%、周期 15 回/分、方形波）を 1 時間または、12 時間以内、12~48 時間負荷する。伸展実験中あるいは伸展後の一定時刻（1 時間以内の伸展実験：0, 10, 30 分後、12 時間以内の伸展実験：0, 1, 3, 6, 12 時間後、12 時間以上の伸展実験：12, 24, 36, 48 時間後）で採取した細胞培養液上清から IL-6 等の炎症性たんぱく質を定量する。また同時刻で total RNA を抽出して網羅的遺伝子発現解析（マイクロアレイ、リアルタイム RT-PCR）を行い、遺伝子発現の変化を計測した。得られた実験結果から、伸展刺激に対する遺伝子発現量と炎症性物質産生量の関係について評価を行う。

(3) 伸展刺激により発現量が変化した遺伝子を含む伝達経路を探索

網羅的遺伝子発現解析（マイクロアレイ、リアルタイム RT-PCR）で検出した遺伝子を多く含む伝達経路を、KEGG を用いて探索を行う。また、時間経過とともに、伝達経路の上流から下流に発現変化が移行する現象も探索する。伝達経路のデータベースは必ずしも完全ではないので、文献検索も行って、発現が変化した遺伝子間の関係を調べる。検索結果から機械的伸展から IL-6 タンパク産生に至る候補経路を推定する。

(4) 病理的人工呼吸模擬ひずみに PEEP 模擬ひずみを加えた伸展刺激による炎症性物質産生量の時系列的計測

病理的人工呼吸+PEEP を模擬した 12 時間以内の伸展刺激を負荷する。(2) の実験同様に 1 時間以内、12 時間以上の伸展実験を行った。伸展実験中あるいは伸展後の一定時刻（0, 1, 3, 6, 12 時間後）で採取した細胞培養液上清から IL-6 の炎症性たんぱく質を定量した。得られた実験結果から、伸展刺激に対する遺伝子発現量あるいは炎症性物質産生量の関係を評価する。

### 4. 研究成果

(1) 病理的人工呼吸模擬伸展刺激による遺伝子発現量と炎症性物質産生量の時系列的解析

培養細胞に過伸展模擬ひずみを加えた実験による IL-6 タンパク質産生量と遺伝子発現解析（マイクロアレイ、リアルタイム RT-PCR）の時系列解析の結果から、IL-6 タンパク質産生量は、伸展開始 3 時間がピークとなり（図 2）、12 時間以上では有意な差が見られなかった。IL-6 遺伝子は伸展開始前に比べて有意に増加し（n=5、危険率 5%）、伸展開始後 30 分でピークに達し（伸展開始前の約 4 倍）、その後減少したが、伸展開始後 3 時間

においても伸展開始前の 2 倍の値を示した (図 3)。これらの結果より、過伸展刺激起因の障害は急性期に生じることを示唆した (雑誌論文(1))。

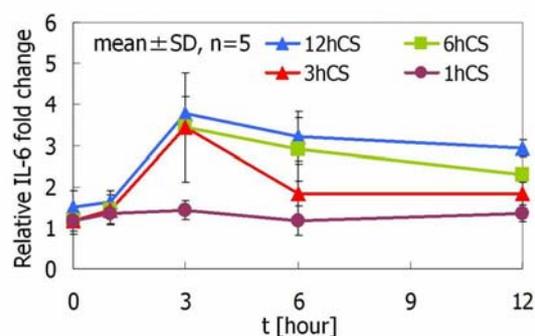


図 2. 12 時間伸展刺激による IL-6 タンパク質濃度の時間変化 (過伸展模擬ひずみ)

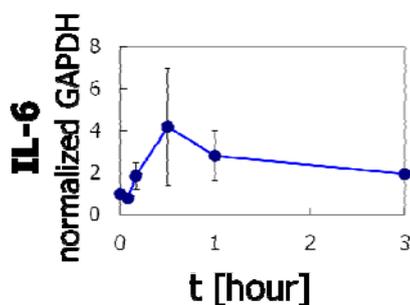


図 3. 伸展刺激による IL-6 遺伝子の発現の時間変化

(2) 機械的伸展から IL-6 タンパク質産生に至る候補経路

いくつかの遺伝子をマイクロアレイ、リアルタイム RT-PCR によって IL-6 と同様に伸展開始後 3 時間まで測定した結果、EGR1, EGFR, COX2, CTGF, FOXC などが IL-6 よりも早く出現した。

これらの結果と KEGG, 過去の研究報告から、カルシウムイオン濃度を起点とする伸展刺激→Ca<sup>2+</sup>→EGR1→EGFR→COX2→IL-6 という信号伝達経路と、伸展刺激→Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>exchanger→CTGF→TGFβ→FOXC→IL-6 という信号伝達経路が存在する可能性があることが示唆された。

カルシウムイオン濃度を蛍光顕微鏡等によって確認すること、および候補経路内の特定の遺伝子発現の阻害剤によって IL-6 発現が阻止されることを確認することが、今後の課題である。

(3) 病理的人工呼吸模擬ひずみに PEEP 模擬ひずみを加えた伸展刺激による炎症性物質産生量の時系列的計測

培養細胞に過伸展模擬ひずみ+PEEP 模擬ひずみを加えた実験による IL-6 タンパク質産生量の時系列解析の結果から、IL-6 タンパク

質産生量は、過伸展模擬ひずみに PEEP を加えると、細胞の IL-6 タンパク質産生量は過伸展模擬ひずみ単独の場合よりも減少することが示された (図 4)。つまり、PEEP を加えることによって肺の過伸展時の IL-6 産生を抑制できる可能性がある。

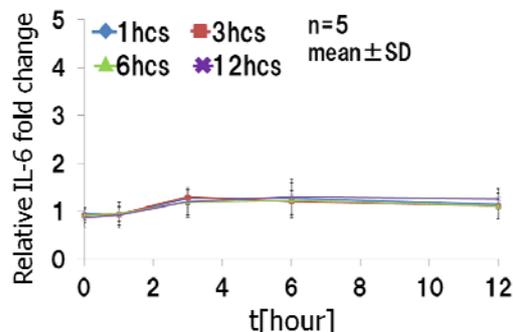


図 4. 12 時間伸展刺激による IL-6 タンパク質濃度の時間変化 (過伸展模擬ひずみ+PEEP 模擬ひずみ)

今後は、さらに過伸展模擬ひずみ+PEEP 実験を進め、過伸展模擬ひずみに PEEP を加えることで、細胞の IL-6 遺伝子発現量とタンパク質産生量が過伸展模擬ひずみ単独の場合よりも減少することを検証する。過伸展模擬ひずみ+PEEP 実験で、IL-6 遺伝子発現量あるいは IL-6 タンパク質産生量が減少する結果が確認されれば、PEEP が VILI に関する遺伝子の発現を抑制、または、発現パターンを変化 (遅延) させる可能性がある。

## 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 1 件)

(1) Kobayashi K, Tanaka M, Kokubo K, Nebuya S, Fukuoka Y, Kobayashi H, Noshiro M, Inaoka H: Temporal change in IL-6 mRNA and protein expression produced by cyclic stretching of human pulmonary artery endothelial cells, *International Journal of Molecular Medicine*, 査読有, vol. 30: pp509-513, 2012

[学会発表] (計 2 件)

(1) Kobayashi K, Tanaka M, Inaoka H, Kokubo K, Nebuya S, Fukuoka Y, Kobayashi H, Noshiro: Effects of PEEP-like cyclic stretch on the IL-6 protein production in normal human pulmonary artery endothelial cells *in vitro*, *European Respiratory Society Annual Congress*, 査読有, pp822, 2012. 9. 2, Vienna

(2) Kobayashi K, Tanaka M, Inaoka H, Kokubo K, Nebuya S, Fukuoka Y, Kobayashi H, Noshiro M: Effect of long-term mechanical stretching on cytokine production in cultured human pulmonary artery endothelial cells, Proceedings of the 26th Symposium on Biological and Physiological Engineering, 査読有, pp313, 2010.9.20, Shiga.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 こず恵 (KOBAYASHI KOZUE)

北里大学・医療衛生学部・助教

研究者番号：60448975