

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462828

研究課題名(和文) 侵襲的人工呼吸に対する上皮細胞骨格応答メカニズムの解明と治療への応用

研究課題名(英文) Management of lung epithelial cell response against invasive mechanical ventilation.

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)・客員講師

研究者番号：60515279

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ラット、マウスに低容量換気(6mL/Kg)と高容量換気(20mL/Kgおよび40mL/Kg)による人工呼吸を行い、乾湿重量比、アルブミン漏出率を測定した。高容量換気群では乾湿重量比の上昇とアルブミン露出率の増加を認め、組織学的観察により免疫担当細胞の肺組織への浸潤を認めた。これらのモデルを用いて、人工呼吸後の炎症性サイトカインの発現とERMタンパクの変化について調査したところ、高容量換気群では炎症性サイトカインの発現が増加し、ERMタンパクの発現が低下していることが明らかとなった。これらの研究から、ERMタンパクの発現変化が侵襲的人工呼吸後の炎症反応と何らかの関連を持つことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Rats and mice were mechanically ventilated in lower tidal volume (6mL/Kg) or higher tidal volume (20mL/Kg and 40mL/Kg). Lung was removed and wet/dry ratio and albumin leakage was measured. We found increase in wet/dry ratio and albumin leakage in higher tidal volume group. Lung histology showed immune cell invasion after the mechanical ventilation with higher tidal volume. Using this model, we investigated the expression of inflammatory cytokine and ERM proteins in the lung. We found that mechanical ventilation with higher tidal volume increased the amount of inflammatory cytokines and decreased the expression of ERM protein in the lung. These result suggested that the relationship between the expression of ERM protein and the inflammatory reaction after the invasive mechanical ventilation.

研究分野：麻酔科学

キーワード：人工呼吸関連肺障害

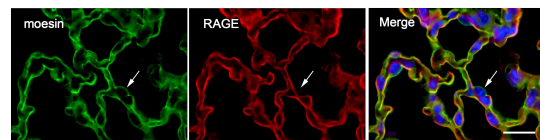
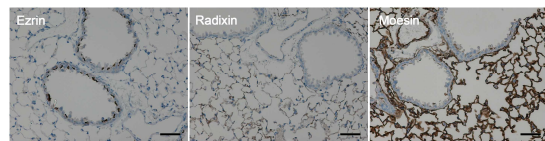
## 1. 研究開始当初の背景

機械的陽圧換気による人工呼吸は、急性呼吸窮迫症候群 (Acute Respiratory Distress Syndrome; ARDS) など、傷害された組織の肺損傷をさらに悪化させることが知られており、そうした病態は人工呼吸器関連肺損傷あるいは人工呼吸器誘発肺損傷と称されている (Am J Respir Crit Care Med. 157(1):294-323, 1998)。さらには近年、ARDS 以外の病態に対しても、不適切な人工呼吸が死亡率や人工呼吸期間を増加させる可能性が示唆されており注目されている (JAMA. 24:308(16):1651-9, 2012)。人工呼吸器関連肺損傷は、大きな一回換気量による volutrauma、高い気道内圧に伴う barotrauma、肺胞の虚脱と再開通の繰り返しで生じるずり応力(剪断ストレス)による atelectrauma など複数の機序により生じると考えられている。このため、低一回換気量や高 PEEP 設定といった人工呼吸管理を行うことで、可能な限り人工呼吸器関連肺損傷を防ぐ肺保護戦略が提唱されている。研究代表者らも、体外式の膜型人工肺 (Extracorporeal Membrane Oxygenation; ECMO) を使用し人工呼吸器関連肺損傷を低減することで良好な転帰が得られた鑄型気管支炎の一例を報告したが (J Anesth. 26(2):265-8, 2012)、本手法は重篤な合併症も多く全般に適用されるものではない。

上記に加え不適切な機械的陽圧換気は、肺構成細胞からのサイトカイン等の細胞障害性メディエーターの産生を増加させ、肺損傷の悪化 (biotrauma) のみならず遠隔臓器の機能障害を引き起こす原因ともなりうる。ところが、陽圧換気に伴う肺胞上皮細胞をはじめとする肺構成細胞の細胞内環境の制御メカニズムに関しては、あまり明らかにされていない。研究代表者らは以前、過剰な陽圧換気が肺損傷を惹起させ肺胞内 ATP 濃度の上昇を引き起こすこと、外因性に投与された ATP

が肺損傷を惹起させること、またその経路として P2 受容体が関与していることを明らかにした (Respir Res 13:9:79, 2008)。

過大な陽圧換気は物理的な肺胞上皮の過伸展を引き起こし、細胞ストレスを生じさせる。一方で、通常自然呼吸下においても、肺胞は拡張と縮小を繰り返すため、何らかの肺胞上皮細胞の形態ならびに細胞内恒常性を維持する機構が働いているものと推測される。研究代表者は以前、ERM タンパク質の中の



moesin が in vivo で肺胞上皮細胞に特異的に発現し、肺組織の損傷修復過程における形態維持機構に重要な役割を果たしていることを報告した (Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 295(4) : L566-74, 2008)。

ERM タンパク質は哺乳動物においては互いに構造・機能とも高い相同性を有する三種類のタンパク質、ezrin・radixin・moesin から成る。ERM タンパク質は細胞膜とアクチン系細胞骨格を架橋することで、細胞・組織構造の維持、細胞運動・遊走、さらには膜タンパク質との相互作用により細胞内外のシグナル伝達機序への関与が様々な細胞実験から証明されている。ERM タンパク質は互いに機能的重複性を有しており、三重もの安全機構をもって細胞組織形態維持に関与する。一方で、moesin タンパク質が陽圧換気などの剪断ストレスに対して、いかにして肺胞上皮細胞における細胞 - 細胞間あるいは細胞 - 基質間相互作用を介して肺胞構造の安定化を司るのか、その細胞分子メカニズムに関しては明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

人工呼吸による肺への影響に関して、肺胞を構成する上皮細胞の細胞骨格を制御するシグナル伝達機構に焦点を当てた研究はあまりない。ショウジョウバエでは唯一保有するERM タンパク質の欠損が、Rho シグナル経路に拮抗的に働き、imaginal disc の上皮構造の破綻へと導くことが示されている。研究代表者は以前に、moesin が肺組織内では他のERM タンパク質とは明らかに発現を異にすること、肺損傷修復過程において重要な役割を果たすことを報告した。この研究結果はショウジョウバエにおける上皮構造の破綻と類似しており、moesin が人工呼吸によって生じる細胞ストレス環境下において、他のERM タンパク質とは独立して肺胞上皮構築の維持機能に関与するものと考えている。これをふまえて、本研究は以下の事項を明らかにする目的で施行する計画とする。

2.1. 野生型マウスに侵襲的な機械的人工換気を施し、マウスに肺損傷を惹起させる。肺損傷後の組織を採取し、肺構成細胞のERM タンパク質の発現に検討を加えた上で、肺胞上皮細胞極性、細胞配列、細胞間接着等の影響を評価する。加えて、低分子 GTP family の Rho 活性を評価することで肺胞上皮細胞の細胞骨格シグナル制御機構を解明する。

2.2. moesin 欠損マウスを用い、機械的人工換気を施し肺損傷を惹起させ、野生型マウスと比較する。肺損傷の程度の違いに加え、他のERM タンパク質の発現動態への影響について調査する。また野生型マウスに対して、ERM タンパク質の活性を修飾するとされる試薬を投与することによる人工呼吸器関連肺損傷の軽減効果について検討する。

## 3. 研究の方法

3.1. マウス人工呼吸器関連肺損傷モデルの作製

野生型 C57BL/6 マウスを低容量換気群(6ml/kg)と高容量換気群(20ml/kg, 40ml/kg)に分け、機械的人工呼吸を行う。人工呼吸器関連肺損傷モデルの作製は既に確立済みであるが、人工呼吸時間も含め、さらなる肺損傷動物モデルの検討を図る。

### 3.2. 人工呼吸関連肺損傷の評価

人工呼吸の各段階において気管内に 20G ポリプロピレンカテーテルを挿入し、PBS にて気管支肺胞洗浄液(BALF)を回収する。BALF 内の細胞数および細胞分画を、血球計算盤とサイトスピン後の Diff-Quik 染色にて評価する。また肺組織を採取し、HE 染色を行い肺損傷の程度を形態学的に評価する。また肺乾湿重量比の評価、BALF あるいは肺ホモジネートの炎症性サイトカイン解析を行う。

### 3.3. ラット人工呼吸器関連肺損傷モデルの作製

マウスに比較して大型で、肺組織への操作を行うことが容易であるラットにおいてもマウスと同様な人工呼吸器関連肺損傷モデルを作成する。

雄性 Sprague Dawley (SD) ラットを用いて実験を行う。マウスと同様に低容量換気群(6ml/kg)と高容量換気群(20ml/kg, 40ml/kg)に分け、機械的人工呼吸を行う。マウスと同様なモデルが生じるかどうかについて、免疫組織化学法、リアルタイム PCR 法、乾湿重量比の測定、アルブミン露出率などを測定して評価する。

### 3.4. 傷害肺組織における遺伝子の発現解析

E-cadherin や integrin、ICAMs 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ている。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。ERM タンパク質ならびに接着分子の遺伝子発現を、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。リアルタイム PCR 用のプライマー

は購入予定である。肺組織を用いたリアルタイム PCR の手法に関しては既に確立済みである。

### 3.5. 傷害肺組織におけるタンパクの発現量、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気的にメンブロンに固定化させ、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 ERM タンパクならびに接着分子の局在を評価する。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。標的タンパクの抗原性の低下が危惧される場合には凍結切片を作製する。また、抗体の精度により免疫組織染色での検出が不可能な場合は In situ hybridization の手法によって mRNA を組織切片上で検出することで、傷害肺における ERM タンパクならびに接着分子の発現分布を観察する。加えて、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接着分子の発現量の経時的変化について調査する。

### 3.6. 肺胞上皮細胞の分離培養

マウスからの肺胞上皮細胞の分離は Corti らの手法に基づき行う(Am J Respir Cell Mol Biol. 14(4):309-315, 1996)。マウスより肺組織を摘出し、dispase 溶液にて 37、45 分間 incubate させ、肺細胞を分離する。不純物を濾過した後、マウス IgG をコーティングさせた培養皿にて反応させ、接着細胞を除去する。得られた型肺胞上皮細胞は Nile Red 染色にて同定後、fibronectin、collagen をコーティングした培養皿内で 10%FBS を含んだ DMEM 培地にてコンフルエントになるまで培養する。

### 3.7. 低分子 GTP 結合タンパクの細胞内活性測定

Rho ファミリー低分子 GTP 結合タンパクは

アクチン細胞骨格の制御に中心的役割を果たしており、細胞運動や細胞接着に深く関与している。本研究では、Rho ファミリー低分子 GTP 結合タンパクのエフェクター分子である RhoA、Rac、Cdc42 による制御に影響を受けるかどうか、その活性を測定する。GST に融合させたエフェクタータンパク質結合領域を用いて、細胞内の活性型 Rho ファミリータンパク質を特異的に回収し、各々に特異的な抗体を用いてウェスタンブロッティング法にて検出する。

### 3.8. 人工呼吸器関連肺損傷の軽減効果の検証

Etoposide をはじめ Rho/ERM タンパク質の活性化が示唆される試薬を投与することで、人工呼吸器関連肺損傷が軽減されるか否か検討する。具体的には、肺の組織学的検討や肺乾湿重量比、BALF 解析、サイトカイン解析等、前述の手法に基づき肺損傷を評価し、コントロール群と比較検討する。

## 4. 研究成果

### 4.1. 人工呼吸器誘発肺損傷モデル作成

マウスおよびラットを低容量換気群(6ml/kg)と高容量換気群(20ml/kg、40ml/kg)に群分けし、機械的人工呼吸を行った。その後肺組織を摘出し、それぞれの肺障害の程度を評価した。

その結果、マウス、ラットの両者において次の結果を得た。

- ・低容量換気群に比べ、高容量換気群では乾湿重量比が有意に上昇した。

- ・低容量換気群に比べ、高容量換気群ではアルブミンの漏出が有意に増加した。

- ・肺組織から作成したパラフィン切片にヘマトキシリン・エオジン染色を行い、顕微鏡観察を行ったところ、高容量換気群において炎症細胞の肺胞組織への浸潤が多く認められた。

- ・免疫担当細胞を組織学的に峻別するために

肺組織切片においてマクロファージに対する特異的な抗体である CD11b 抗体および IBA-1 抗体を用いた免疫組織化学法を行ったところ、マウス、ラットともに CD11b を発現する細胞を肺組織に認め、高容量換気群において CD11b 陽性細胞数が増加することを確認した。

これらの結果から、ラット、マウスにおいて高容量換気により肺組織の破壊が生じ、人工呼吸による肺損傷のモデルとして用いることができることを確認できた。

#### 4.2. 炎症性サイトカインの発現変化

マウスおよびラットを低容量換気群(6ml/kg)と高容量換気群(20ml/kg、40ml/kg)に群分けし、機械的人工呼吸を行い、機械的人工呼吸が肺組織における炎症性サイトカインの発現に及ぼす影響について検討した。

・IL-1 beta 抗体、TNF-alpha 抗体を用いた免疫組織化学法を行い、肺組織に IL-1 beta 陽性細胞および TNF-alpha 陽性細胞が発現することを確認した。

・高容量換気群において IL-1 beta 陽性細胞、TNF-alpha 陽性細胞の肺組織への集積が増加していた。

・IL-1 beta、IL-6、TNF-alpha、IFN-gamma に対するプライマーを調整し、リアルタイム PCR 法を用いた実験においてこれらの遺伝子発現を定量化した。低容量換気群、高容量換気群それぞれの肺組織を摘出し、mRNA を抽出、逆転写酵素を用いて cDNA を作成しこれをテンプレートとしてリアルタイム PCR を行った。その結果、高容量換気群において炎症性サイトカイン遺伝子の発現量が増加していた。

これらの結果から、高容量換気を行うことにより肺組織に炎症反応が惹起されることが明らかとされた。

#### 4.3. 肺障害モデルにおける接着因子の発現

E-cadherin、integrin、ICAM の肺組織にお

ける発現と機械的人工呼吸後の発現の変化について解析をおこなった。

・低容量換気群、高容量換気群それぞれから肺組織を摘出し、mRNA を抽出、cDNA に変換したのち E-cadherin、integrin、ICAM に対するリアルタイム PCR を行い、PCR 産物が増幅されることを確認した。

・リアルタイム PCR による E-cadherin、integrin、ICAM mRNA は高容量換気群において発現が増加する傾向が得られたが、個体間の差異が大きく、低容量換気群、高容量換気群におけるこれらの遺伝子の発現量の変化について統計学的な有意差を検出することはできなかった。

・E-cadherin、integrin、ICAM 抗体を用いた免疫組織化学法によってこれらの蛋白の肺組織における発現分布を調査することを試みたが、免疫組織科学の条件設定が困難で、有意な発現を検出することはできなかった。これらの結果から、肺組織における接着因子の発現を同定することができた。機械的人工呼吸施行後の接着因子の発現変化については今後の課題と考える。

#### 4.4. 肺障害モデルにおける ERM 蛋白の発現

Ezrin・radixin・moesin の DRG における発現と機械的人工呼吸による発現の変化について解析した。

・Ezrin・radixin・moesin mRNA に対するプライマーを作成し、低容量換気群、高容量換気群それぞれから摘出した肺組織から mRNA を抽出、リアルタイム PCR によって発現変化を解析した。PCR による ERM 蛋白の増幅を確認した。

・高容量換気群、低容量換気群の 2 群に分類し、Ezrin・radixin・moesin mRNA の発現変化を調査した。個体間の差が大きく、高容量換気群と低容量換気群の間に ERM 蛋白の肺組織における発現の違いを定量化することは困難であった。

・ Ezrin 抗体 ・ radixin 抗体 ・ moesin 抗体を用いた免疫組織科学を行い、ERM 蛋白の肺組織における分布と機械的人工呼吸後の発現変化を観察した。肺組織における ERM 発現分布を明らかにすることができ、ERM 蛋白は高容量換気群で発現減少している傾向が明らかにされた。

これらの結果から、肺組織における ERM 蛋白の発現分布を明らかにすることができた。ERM 蛋白は高容量換気群で減少する傾向があり、機械的人工呼吸による肺損傷発症との関連が示唆された。

#### 4 . 5 . 肺胞上皮細胞の分離培養

ラット肺胞上皮細胞の分離培養を試みたが、培養条件の設定に難渋し、長時間生存できる上皮細胞の培養には至っていない。

#### 4 . 6 . 細胞内 GTP 活性の測定

細胞内 GTP 活性は培養条件下の肺胞上皮細胞をサンプルに施行する計画であったが、培養条件の設定に難渋したため十分な解析結果は得ることができなかった。

#### 4 . 7 . 人工呼吸器関連肺損傷の軽減効果の検証

Etoposide を機械的人工呼吸開始前に景気感投与を行う計画とした。系気管的薬剤投与については人工呼吸に支障をきたすことなく施行する実験系を確立することができたが、薬剤を安定して投与する系の確立には至っておらず、今後の検討課題と考える。

#### 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 5 件)

1 .Fernandez-Bustamante A, Hashimoto S, Serpa Neto A, Moine P, Vidal Melo MF, Repine JE. Perioperative lung protective ventilation in obese patients. BMC Anesthesiol. 2015; 15: 56. (査読有り)

2 . Izumi Y, Sasaki M, Hashimoto S, Sawa

T, Amaya F. mTOR signaling controls VGLUT2 expression to maintain pain hypersensitivity after tissue injury. Neuroscience. 2015; 308: 169-79. (査読有り)

3 .Sasaki M, Hashimoto S, Sawa T, Amaya F. Tumor necrosis factor-alpha induces expression of C/EBP-beta in primary afferent neurons following nerve injury. Neuroscience. 2014; 279: 1-9. (査読有り)

4 . Hashimoto S, Shime N. 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. J Intensive Care. 2013; 1:2. (査読有り)

5 . 橋本壮志, 志馬仲朗, 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. 2013; 20: 287-8. (査読有り)

[学会発表](計 1 件)

Hibbert KA, Winkler TW, Hashimoto S, Holland CA, Brait KL, Harris RS, Bajwa EK and Vidal Melo MF. Lung inflammation with Sepsis and ARDS assessed in vivo by 18F-FDG-PET. Anesthesiology 2015 Annunal meeting, 2015, San Diego, 2015 October 24.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]

#### 6 . 研究組織

(1)研究代表者

橋本 壮志 (HASHIMOTO Soshi)

京都府立医科大学・医学研究科・客員講師

研究者番号 : 60515279