

学位論文題名

Relationship between neutrophil influx and oxidative stress in alveolar space in lipopolysaccharide-induced lung injury

(LPS投与急性肺障害モデルマウスにおける肺胞腔の好中球浸潤と酸化ストレスの関係に関する検討)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】急性肺傷害(ALI)およびその重症型である急性呼吸促迫症候群(ARDS)は肺炎、敗血症、外傷性ショック、輸血など種々の背景疾患により肺胞気道上皮の傷害と肺血管透過性の亢進が生じて非心原性の肺水腫に至る疾患である。病理組織学的には好中球を主体とする炎症細胞の集積、肺毛細血管のうっ血、肺胞壁の浮腫や肥厚、硝子膜の形成を特徴とする。現時点でALI/ARDSに対し明らかに有効な治療法は確立しておらず、その致死率は依然高いままである。ALI/ARDSの発症および進展においては好中球から産生される酸化ストレスが重要な役割を果たしている。炎症細胞由来の各種サイトカインやメディエーターならびに内皮細胞由来の接着分子の発現亢進により循環血中の好中球の肺への集積と肺胞腔への遊走が起こる。肺胞腔で活性化した好中球は好中球エラスターゼ及び次亜塩素酸などの活性酸素種(reactive oxygen species: ROS)を放出する。これらの酸化活性物質がもたらす酸化ストレスが生体に備わっている抗酸化防御機構を凌駕することにより上皮細胞と内皮細胞の傷害を伴う炎症が起こり、肺胞上皮および肺微小血管の透過性亢進が起こることがALI/ARDSの発症メカニズムに関与している。これまでもALI/ARDS患者の肺胞洗浄(BAL)液で健常者と比較してカルボニル蛋白や脂質酸化物(LPO)などの酸化ストレスマーカーが上昇していることが報告されているが、これらの酸化ストレスと好中球性炎症との関連をみた検討は現時点でない。このため我々は今回急性肺傷害モデルマウスを用いてBAL液における好中球性炎症および酸化ストレスについて経時的な検討をおこなった。

【材料と方法】9週齢のICRマウスにグラム陰性菌の内毒素であるLipopolysaccharide(LPS)を気管内投与して急性肺傷害モデルマウスを作成した。LPS投与1, 3, 5, 7, 14日後の各々のタイムポイントにおいてBAL液および肺組織の回収をおこなった。BAL液においては、cytospin法による好中球数の算定と、好中球活性の一般的な指標であるMPO活性について検討した。さらに酸化ストレスマーカーとしてカルボニル化アルブミン、過酸化脂質(LPO)、グルタチオンおよび酸化型グルタチオンの測定をおこなった。好中球炎症について肺胞腔と肺組織との動態の変化を検討するため肺組織においてGr-1染色による好中球浸潤の評価とMPO活性を測定した。また肺傷害の程度についてwet/dry肺重量比や肺傷害スコアを検討した。さらに、LPS投与後に肺胞腔に集積した好中球のROS産生能について検討するためにLPS投与1日後および5日後のマウスより回収したBAL液から好中球を分離し、細胞内の活性酸素強度について蛍光試薬であるAPF(aminophenyl

fluorescein) を用いた蛍光強度の測定およびフローサイト法により検討した。

【結果】LPS の気管内投与後に肺胞腔の好中球浸潤を反映して BAL 液中の著明な好中球数の上昇を認めた。好中球数の上昇は LPS 投与後 5 日目がピークであり、7 日目には明らかな消退を認めた。次に BAL 液中の酸化ストレスマーカーとしてカルボニル化アルブミン、LPO、グルタチオンおよび酸化型グルタチオンを測定したところいずれも LPS 投与 7 日後まで上昇しており BAL 液中の好中球数のピークと解離していた。そこで好中球活性の指標である MPO 活性について BAL 液で検討したところ酸化ストレスマーカーと同様に LPS 投与 7 日後まで上昇を認めた。さらに、BAL 液中の MPO 活性とカルボニル化蛋白の間に有意な相関を認めた。また、気道上皮傷害の指標である wet/dry 肺重量比および肺傷害スコアは MPO 活性や酸化ストレスマーカーと同様に LPS 投与 7 日目まで上昇していた。一方で肺組織での Gr-1 染色による好中球浸潤の評価、MPO 活性および酸化ストレスマーカーであるカルボニル化蛋白や 4-HNE の測定をしたところいずれも LPS 投与 7 日後には明らかに低下していた。最後に、LPS 投与 1 日後および 5 日後にマウスの肺胞腔から回収した好中球の MPO 活性および ROS 強度を蛍光強度測定法およびフローサイト法で検討したところ 5 日後に回収した好中球では 1 日後に回収した好中球と比較していずれも有意に増強していた。

【考察】本研究では急性肺傷害モデルマウスの BAL 液を解析することにより LPS 投与後の肺胞腔における好中球性炎症と酸化ストレスの関連を検討し、肺組織と対比させることを目的とした。今回得られた結果より、急性肺障害モデルマウスにおいて肺胞腔の酸化ストレスは好中球の消退した後も遷延していること、酸化ストレスの動態が肺胞腔と肺組織で一様ではないこと、肺胞腔に遊走した好中球の酸化ストレス産生能が炎症後期では早期と比較して増強していることが明らかとなった。ROS の直接的な測定は困難であるため、ROS の強度を示す間接的な指標である酸化修飾物は、酸化ストレスマーカーとして用いられる。近年、これらの酸化ストレスマーカーは単なるマーカーではなく、機能変化やシグナル伝達などを介して積極的に肺の傷害に関わっていると考えられている。今回の検討で好中球が消退した後も肺傷害が遷延した機序として、肺胞腔の酸化ストレスマーカー自体が上皮障害や炎症細胞の活性化に関わっている可能性も考えられた。MPO はほぼ好中球にのみ存在するため、好中球活性の最も一般的な指標である。BAL 液における好中球の消退後も MPO 活性が遷延していた機序として今回我々は肺胞腔から回収した好中球の MPO 活性と APF で標識した活性酸素強度が経時的に増強することを示した。MPO 活性が遷延した別な機序として、MPO の肺胞腔からのクリアランスが低下していた可能性も考えられた。臨床において BAL 液における好中球の割合は、疾患の活動性を評価する指標として広く使われている。今回の肺傷害モデルの検討において BAL 液中の好中球数が低下した後も MPO や酸化ストレスマーカーは低下せず、肺傷害の指標と同様の動態を示したことから、両者が好中球数よりも有用な疾患の活動性のマーカーになる可能性や、ALI/ARDS 治療薬の効果判定のマーカーになりうる可能性がある。

【結論】本研究は急性肺傷害モデルにおける好中球性炎症と酸化ストレスマーカーに関する最初の論文である。今回の我々の研究から ALI/ARDS 患者の BAL 液において MPO 活性や酸化ストレスマーカーが、従来の好中球分画と比較してすぐれた疾患活動性マーカーや治療効果判定の指標となる可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 笠 原 正 典
副 査 教 授 上 出 利 光
副 査 教 授 瀬 谷 司
副 査 教 授 西 村 正 治

学位論文題名

Relationship between neutrophil influx and oxidative stress in alveolar space in lipopolysaccharide-induced lung injury

(LPS投与急性肺障害モデルマウスにおける肺胞腔の好中球浸潤と酸化ストレスの関係に関する検討)

急性肺傷害は様々な疾患を背景として急性の非心原性の肺水腫を呈する肺疾患である。本研究では lipopolysaccharide (LPS) を気管内投与したモデルマウスを用いて、気管支肺胞洗浄 (BAL) 液の炎症細胞、特に好中球や様々な酸化ストレスマーカーが、肺組織や肺傷害の程度をどの程度反映するかについて詳細な検討をおこなった。本研究の結果、BAL 液の好中球は肺組織の好中球と有意に相関するが肺傷害の修復が起こる前に速やかに消退すること、BAL 液の酸化ストレスマーカーは肺組織の酸化ストレスと相関しない一方で肺傷害の程度を反映すること、さらに LPS 投与後に肺胞腔に集積する好中球の酸化ストレス活性が炎症の時相で異なることが明らかとなった。

質疑応答において、副査である上出教授からは、①今回マウスモデルで得られた結果がそのまま様々な背景疾患があるヒトの場合に当てはまると考えることができるか、②刺激に対する好中球の heterogeneity については検討したか、の 2 点について質問をいただいた。これに対して申請者は、①ヒトの急性肺傷害では様々な背景疾患があるが、大きく肺の直接的な傷害に起因するものと、肺以外の傷害による間接的な肺傷害との 2 種類がある。今回のモデルは前者の代表的なモデルであるが、後者のモデルである LPS の腹腔内投与や虫垂穿孔によるマウスモデルで今回の結果が再現できるかについても検討する必要がある②今回の検討ではノックアウトマウスや薬物を用いた好中球の heterogeneity の検討はおこなっていない、ことについて回答をおこなった。

次に副査である瀬谷教授より、①今回用いた LPS は TLR-4 のリガンドとして作用する種類のものか。そうであるならば、例えば TLR-4 のノックアウトマウスに LPS を気管内投与した際にはどのような結果になると考えられるか、②今回の結果で、肺胞腔から好中球が見かけ上で消退した後もその活性である MPO が遷延していたのは好中球が原因と考えられるかという 3 点について質問をいただいた。これに対して申請者は、①今回用いた LPS は、TLR-4 のリガンドとして作用する一般的なものである。TLR-4 はその下流シグナルである NF- κ B を介して炎症性サイトカインの発現などに関わるので、その欠損マウスにおいては LPS 投与後の好中球の集積や肺傷害の程度は抑制されると考えられる。しかしながら、BAL 液と肺組織の関係が TLR-4 の欠損によりどのような結果になるかについては今回の検討からは述べることはできない、②炎症早期と比較して、後期で好中球の活性が上昇していることが機序の一つに挙げられる。別の機序としては、酸化ストレスはマクロファージの貪

食能を抑制することが報告されており、炎症後期においては MPO のクリアランスが低下している可能性も考えられる。と回答した。

次に副査である西村教授より、①今回の動物モデルを用いて得られた検討を今後どうように実際の臨床に応用できるか、という点について質問をいただいた。これに対して申請者は、①ヒトの肺疾患、特に急性肺傷害などの急性疾患においては肺組織の生検は非常に困難であり、BAL が組織をどのように反映しているかを対比させて検討することはできない。今回の検討は介入実験をおこなっておらず、急性肺傷害の病態などに直接迫るものではないが、BAL から得られた情報により実際の肺でおこっている病態のなにをみているかという解釈に寄与する、と回答した。

最後に主査である笠原教授より、①今後ヒトにおいて、何が活動性の把握などで良いマーカーであるかを検討するうえで重要なことはなにか、②複数の酸化ストレスマーカーで、今回の検討とあわせて最も有用なものはどれか、という 2 点について質問をいただいた。これに対し申請者は、①ヒトでは今回のように繰り返し BAL をおこなうことはできないために同じことはできないが、他のマウスモデルや他の strain でも同様の結果であれば、1 回の BAL での好中球数、好中球炎症、酸化ストレスを総合的に評価することで炎症の時相や、活動性の有無についての評価が期待できる、②以前の我々の検討では気管支喘息患者の喀痰中のカルボニル蛋白が好酸球比率と有意に相関していた。蛋白酸化は組織傷害の直接的な指標であるために今回測定したうちでは最も有用ではないかと考えられる、と回答した。

この論文は、急性肺傷害における BAL 液と肺組織の経時的変化について詳細に検討した点において高く評価され、今後はヒトにおける有用な活動性マーカーの検索を目的とした研究への進展が期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。