

論文の内容の要旨

論文題目 炎症性サイトカインの曝露による、肺胞上皮細胞障害機構の検討

室屋充明

敗血症に続発する呼吸機能不全の一病態として、急性肺障害 (ALI) およびそのより重篤な状態である急性呼吸促迫症候群 (ARDS) が知られている。欧米ではその死亡率は 35% から 65% とされており、年間約 10 万人 (本邦に適用すると年間 4 万人以上) が死亡している計算になる。これまで多くの動物、臨床研究が行われているが、肺保護的人工呼吸法が生存率を改善すると報告がある他には、決定的な治療に結びつく知見は得られていない。

ALI/ARDS の病因には、細菌感染や誤嚥による肺への直接損傷だけでなく、外傷や敗血症による肺の間接損傷も約 40% と頻度が高く、肺外の炎症が何らかのメディエーターによって、肺の炎症を引き起こしていると考えられている。

ALI/ARDS の病態的基礎は、遷延する過剰な肺胞内炎症に伴う、肺胞上皮細胞傷害、そして細胞死であり、多様な炎症性メディエーターが関与している。ARDS 患者の末梢血中および肺胞洗浄液からは TNF- α 、IL-1 β などの炎症性サイトカインが、全身あるいは局所の炎症を反映して検出され、これらが高いレベル検出される例では予後不良であることが報告されている。これらの知見から、炎症局所で産生されたサイトカインが、肺へ波及して過剰炎症を引き起こすことが推測され、この過剰な炎症を抑制することが ALI/ARDS 患者に対して治療的に働くと想像される。しかしながら炎症性サイトカインに対する抗体療法やステロイドを始めとする抗炎症療法の ARDS における治療的適用は、決定的な治療法とはなり得ていない。

こうした状況をふまえ、高サイトカイン状態がいかにして肺胞上皮細胞を損傷するかを明らかにすることは、特に肺の間接損傷のメカニズムを究明することにつながると考えられ、肺の損傷を防ぐ治療法の開発につながると考えられる。

本研究では、まずヒト肺胞上皮細胞株 A549 を用いて敗血症性急性肺障害の *in vitro* モデルを作成した。本モデルの作成には、敗血症性急性肺傷害の病因に主要な役割を持つとされる炎症性

サイトカイン (IL-1 β /TNF- α /IFN- γ) を使用した。高濃度サイトカイン曝露によって誘導される細胞傷害のメカニズムを検討するため、このモデルを使用して、カスパーゼ経路、NF- κ B(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)/ ICAM-1(Intercellular Adhesion Molecule 1)経路および、MAP(Mitogen-activated protein) キナーゼ経路の関与を検討し、さらに抗炎症作用を持つ薬剤、あるいは抗酸化作用をもつ薬剤による細胞保護効果を評価することで、細胞内シグナル経路の検討と、各種薬剤の治療的可能性を検討した。

方法: A549 細胞に炎症性サイトカイン (IL-1 β /TNF- α /IFN- γ) 10ng/ml を投与して、細胞死、細胞傷害の指標を測定した。細胞傷害性は、鏡検像および細胞数、crystal violet 染色、培養液中に逸脱する LDH(lactate dehydrogenase)の定量により評価した。また、アポトーシスの関与を、断片化 cytokeratin 18 の定量およびフローサイトメーターによる Annexin V 結合細胞の検出により検討した。本モデルにおけるシグナル伝達経路を検討するため、cleaved caspase 7、ICAM-1 および、MAP キナーゼ経路の extracellular signal-regulated kinase (ERK)、c-JUN NH2-terminal protein kinase (JNK)、p38 MAPK のリン酸化を western blotting で検討した。さらに、抗炎症作用(糖質コルチコイド、テトラサイクリン系抗生物質)、抗酸化作用(抗酸化剤、アンギオテンシン受容体拮抗薬)を持つ薬剤を前投与し、その細胞保護作用を検討した。また、カスパーゼ阻害薬を用いて、その効果を改めて検討した。

結果: 炎症性サイトカインは A549 細胞に対して細胞障害性を示した。IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ は、単独よりも組み合わせて投与したときに、より強い細胞障害性を示した。サイトカイン

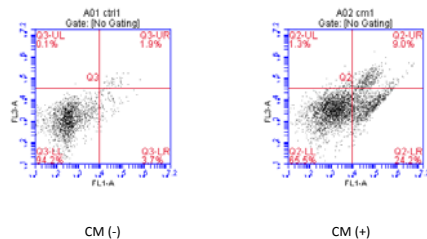


図 1

を投与することで、断片化 cytokeratin 18 が上昇し、フローサイトメトリーでも Annexin V 結合細胞が増加したことから、アポトーシス経路の活性化が示唆された(図 1)。

サイトカイン刺激によって、ICAM-1 経路、MAP kinase 経路いずれも活性化が確認され、また cleaved caspase 7 の増加も確認された。糖質コルチコイド (dexamethasone)、テトラサイクリン系抗生剤 (minocycline、doxycycline)、アンギオテンシン受容体拮抗薬 (losartan)、抗酸化剤 (catalase) を前

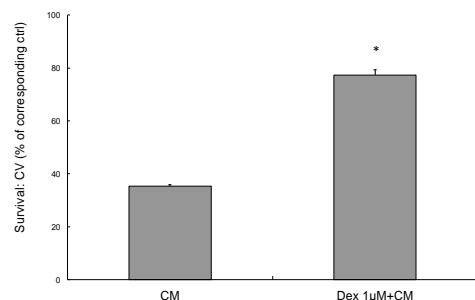


図 2

投与することで、炎症性サイトカインによる細胞傷害性は減弱し、断片化 cytokeratin 18 の逸脱も減少した。細胞保護効果は dexamethasone が高かった (図 2)。

カスパーゼ阻害薬 Q-VD-OPh の投与により、カスパーゼの活性はほぼ完全に抑制されたにもかかわらず、細胞傷害に対する抑制効果は部分的であり、他の細胞死メカニズムの寄与が示唆された。

考察：本研究では、*in vitro* で高サイトカイン誘導性肺胞上皮傷害モデルを作成し、その細胞傷害メカニズムを探索した。このモデルでは、IL-1 β 、TNF- α および IFN- γ の混合投与が強い細胞傷害性を示すことが確認された。

IL-1 β と TNF- α は、敗血症などの全身性炎症における主要な炎症性サイトカインと考えられ、本研究においても細胞傷害性を示した。同濃度の IFN- γ は、単独では細胞傷害性を示さなかったが、IL-1 β /TNF- α に IFN- γ を加えることで、その細胞傷害性を増強した。この増強効果は、複数のサイトカインが協調して生物学的作用を発揮する、臨床的な知見と合致するものである。本研究においては、肺上皮細胞 A549 の viability を、①培養液中に放出された LDH 濃度の計測、②crystal violet 染色、③増殖能を持つ細胞数の評価をする Cell counting kit-8(CCK-8)を用いた残存細胞の推計によって、評価した。この細胞傷害においては、断片化 cytokeratin 18 の増加、Annexin V-FITC 陽性細胞数の増加、cleaved caspase 7 の検出から、アポトーシスの関与が示唆された。これらの結果は、動物モデルや臨床的な敗血症性 ALI においてアポトーシス経路が活性化するとする他の報告と矛盾しない。

しかしながら、アポトーシスを阻害することでこのモデルの細胞死抑制効果があるかどうかを検討したが、広汎カスパーゼ阻害薬である Q-VD-OPh は cytokeratin 18 の断片化を完全に阻害したにもかかわらず、炎症性サイトカイン誘導性細胞傷害に対しては、その一部を抑制しただけだった。これは、過剰炎症状態下での細胞傷害において、アポトーシス以外の細胞死が関与している可能性を示唆する。

過剰炎症の状態が、敗血症性 ALI の主要な病態生理であると考えられ、この炎症状態をコントロールすることは、敗血症性 ALI の治療戦略となりうる。また炎症時における組織傷害には酸化ストレスの存在が示唆されており、その軽減は治療戦略の一つである。本研究において検討した、抗炎症作用、抗酸化作用をもつ薬物の作用可能性の概略を図 3 に示した。抗炎症性物質である dexamethasone、テトラサイクリン系抗生物質

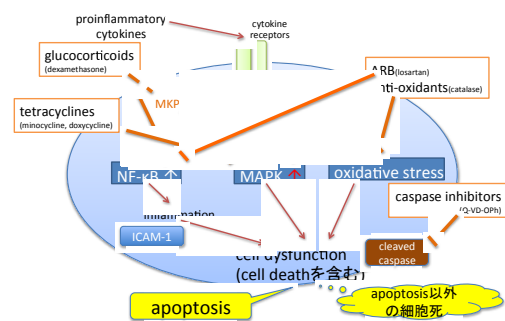


図 3

である minocycline が、A549 細胞のサイトカイン誘導性細胞傷害を、カスパーゼの活性化を含めて抑制することを確認した。抗酸化作用をもつ losartan、抗酸化物質である catalase も同様に細胞傷害を抑制した。

本研究において、dexamethasone は、混合サイトカイン刺激後の A549 に対して強い細胞傷害抑制効果を見せた。dexamethasone が NF κ B/ICAM-1 経路、MAP kinase 経路いずれも抑制したことから、炎症性蛋白の mRNA 転写阻害および NF κ B 活性の抑制が全般的な細胞保護効果に貢献している可能性がある。また、近年 dexamethasone が MAP キナーゼの非特異的阻害作用をもつ MAPK phosphatase-1 を活性化すると報告があり、A549 細胞でも同様のメカニズムが起きている可能性もある。

臨床的に cytokine storm と言われる状態が、肺胞上皮細胞の細胞死を引き起こすことを確認できたことは、肺傷害軽減のために複数のサイトカインをターゲットとすることの理論的根拠を提供する。さらに、本研究で検討した薬剤のうち、実際に細胞死を抑制するものは、細胞傷害のメカニズムを検討する上でのツールとなるだけでなく、将来的な肺保護戦略のターゲットとなりうる。

結論：

炎症性サイトカインが複数、高濃度存在することは、細胞傷害性であり、細胞死を引き起こす。この経路には炎症を惹起する経路、酸化ストレスの経路が関わっており、アポトーシス経路も部分的に関与している。これらに対する阻害作用をもつ薬剤が細胞死に保護的に働くことから、敗血症性急性肺傷害の治療戦略に役立つ可能性がある。