

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

サイトカインによる肺微小血管内皮細胞機能障害とその抑制

研究分担者 森島恒雄

研究協力者: 斎藤有希恵、山田睦子、藤井洋輔、八代将登、塚原宏一
(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科小児医科学)

研究要旨

インフルエンザウイルス A/H1N1 2009 pdm 感染では、ARDS や鑄型気管支炎を合併した症例報告の増加が特徴的であった。ARDS など肺血管透過性の亢進に対する効果的な薬物療法は確立されておらず、今回我々はサイトカインや種々の薬物が肺血管透過性に及ぼす影響について in vitro で検討した。

結果: インフルエンザ感染時に産生されるサイトカインによって、肺血管透過性は亢進した。ステロイドやエダラボン、NOS 阻害剤の前投与によって透過性の亢進は抑制された。免疫蛍光抗体法でステロイドやエダラボンによる細胞間接着の構成分子の強化作用が示唆された。

結論: 脳症や ARDS などの重症インフルエンザ感染症では、血管透過性の亢進が病態に関与している。ステロイドやエダラボン投与により、血管透過性そのものを改善できる可能性が示唆された。高病原性トリインフルエンザなどの病態解析や治療開発にも応用可能と考えられた。

A. 研究目的

2009 年に流行したインフルエンザウイルス A/H1N1 pdm 感染では、小児や基礎疾患を有する患者を中心に重症肺炎を呈する症例が多くみられた。また、ARDS や鑄型気管支炎を合併した症例報告の増加が特徴的であった。

ARDS など、肺血管透過性の亢進が関与していると考えられる病態の効果的な薬物療法は確立されておらず、今回我々はヒト肺由来微小血管内皮細胞を用いて、インフルエンザウイルスやサイトカイン、種々の薬剤が肺血管透過性に及ぼす影響について検討した。

B. 研究方法

透過性はボイデンチャンバーを用いて評価した。2 層のウェルで、底面に 3 μm の pore があいた膜で構成される上室に肺微小血管内皮細胞を培養し、3 日後、コンフルエントの状態に達した。刺激物質を含む培地に交換した。24 時間後、上室に蛍光標識したデキストランを投与し、2 時間後に下室に漏れ出したデキストランの蛍光度を測定した。透過性の評価は Permeability Index = [experimental clearance]

- [spontaneous clearance] / [clearance of filter alone] - [spontaneous clearance] × 100 として計算し比較した。また、透過性の変化が起こる機序について、mRNA の発現変化や、細胞間接着の構成分子の変化を検討した。

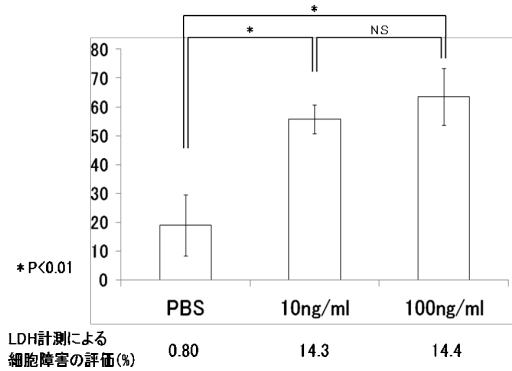
C. 研究結果

インフルエンザウイルスのヒト肺毛細血管内皮細胞での増殖は確認できなかった。TNF- α +IL-1 (各 10ng/ml) 投与によって血管透過性は亢進した(図 1)。デキサメサゾン(100 μM)やフリーラジカルスカベンジャーであるエダラボン(100 μM)、NO 合成酵素阻害剤の L-NMMA(100 μM)を前投与することで、サイトカインによる透過性亢進は抑制された(図 2, 3, 4)。

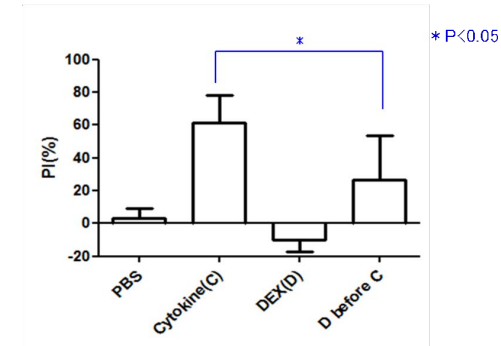
TNF- α +IL-1 投与後、経時的に mRNA の発現変化を検討した。MMP-9 は 24 時間後までに mRNA の発現変化は認められず、培養上清の蛋白も感度以下であった。一方、TNF- α +IL-1 投与後 1~3 時間後から、ICAM1、VCAM1、IL-8、MCP-1 といった接着分子やケモカインの mRNA 発現が増強し、培養上清中の蛋白濃度も上昇を認めた。

デキサメサゾンやエダラボンの前投与群では、サイトカインのみ投与した群と比較して、免疫蛍光抗体法で adherence junction の主要な構成分子である VE-Cadherin や tight junction の構成分子である ZO-1 が保持されていた(図 5、6)。また、サイトカイン投与 3 時間後のリアルタイム PCR で、デキサメサゾンとエダラボンの前投与群ではサイトカインのみの群と比較して有意に ZO-1 発現の増強を認めた(図 7)。

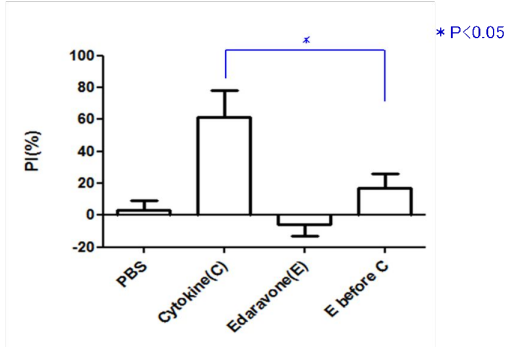
(図1) TNF- α +IL-1 β 添加24時間後の透過性の変化



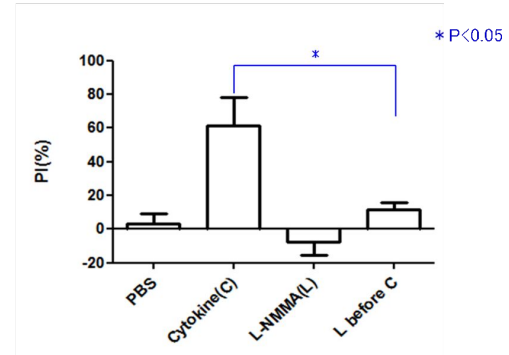
(図2) Dexamethasone(100 μ M) 前投与下での TNF- α +IL-1 β 添加24時間後の透過性の変化



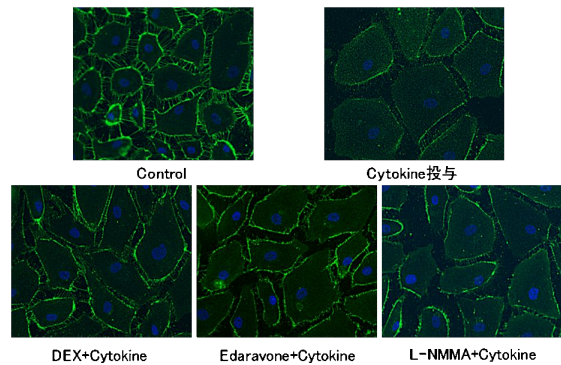
(図3) Edaravone(100 μ M) 前投与下での TNF- α +IL-1 β 添加24時間後の透過性の変化



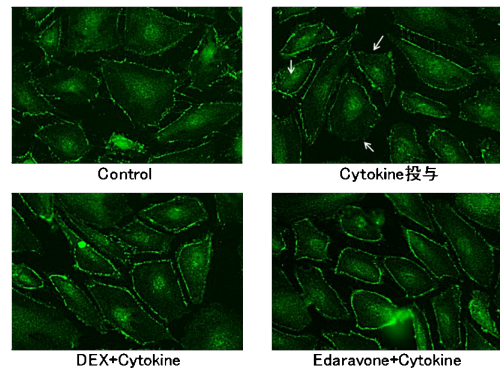
(図4) L-NMMA(1mM) 前投与下での TNF- α +IL-1 β 添加24時間後の透過性の変化



(図5) TNF- α +IL-1 β 添加24時間後の VE-Cadherin の変化

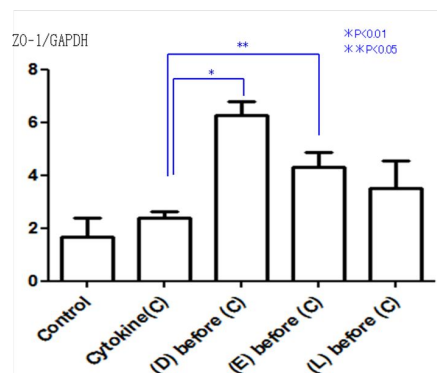


(図6) サイトカイン添加24時間後のZO-1 の変化



(図7) ZO-1 mRNA の変化

②薬剤+サイトカイン投与3h後のリアルタイムPCR



D. 考察

我々は以前の報告(Tsugeら)で、サイトカイン(特にTNF- α)によるMMP-9の高発現が脳血液関門の破壊につながることを示しているが、肺微小血管内皮細胞では、透過性亢進時にMMP-9のmRNA発現は誘導されず、脳血管とは異なる機序が推定された。

デキサメサゾンやエダラボンによる透過性の抑制の1つの機序として、VE-Cadherinの保持作用やZO-1発現増強を介した細胞間接着機能の回復促進作用が考えられた。ヒトの臍帯静脈血管内皮細胞において、エダラボン投与によりadherence junctionの構成分子の発現が増強し電気抵抗が上昇することが報告されており、今回の肺血管内皮細胞でも同様の結果が得られた。

E. 結論

インフルエンザウイルス感染時に産生されるTNF- α およびIL-1により肺血管透過性は亢進し、ステロイドやエダラボン、NOS阻害剤の前投与によって抑制された。透過性亢進には脳血管とは異なる機序が推定された。ステロイドやエダラボンによる透過性の抑制は、adherence junctionやtight junctionの構成成分

の強化によることが示唆された。これらの研究は、肺障害性の高い高病原性トリインフルエンザなどの病態解析や治療開発にも応用可能と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1)

2. 学会発表

(1) 齊藤有希恵, 津下 充, 藤井洋輔, 長岡義晴, 八代将登, 塚原宏一, 森島恒雄. サイトカインによる肺血管内皮細胞機能障害のメカニズム. 第44回日本小児感染症学会, 小倉, 2012年(11月).

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし