

課題番号 55

人工呼吸惹起性肺障害(VILI)下における Neutrophil Extracellular Traps (NETs)形成の加齢による影響

[1] 組織

代表者：Wolfgang Kuebler
(Charité - Universitätsmedizin Berlin
・ Institute of Physiology)
対応者：堀内 久徳
(東北大学加齢医学研究所)
分担者：
田淵 新 (Charité - Universitätsmedizin
Berlin ・ Institute of Physiology)

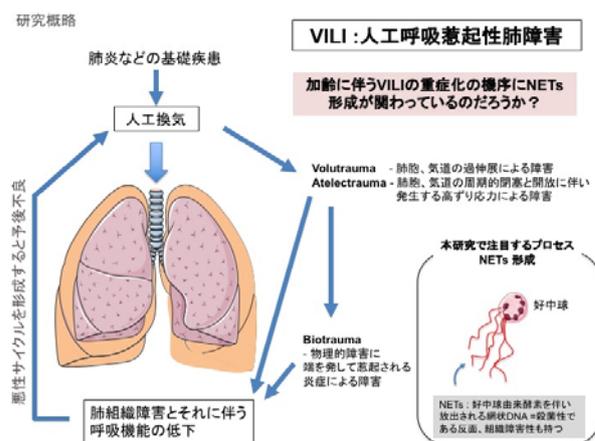
研究費：物件費 30万円

[2] 研究経過

[研究目的・概要]

人工呼吸は急性肺障害治療に欠かせない一方で、好中球浸潤を伴う炎症反応を増悪させ、人工呼吸惹起性肺障害(Ventilator Induced Lung Injury: VILI)の原因となるが、急性肺障害による死亡率の高い高齢者ではVILIも重症化しやすいと考えられている。近年、好中球から放出される Neutrophil Extracellular Traps (NETs)が感染防御だけでなく、広範な炎症性疾患に関わっていることが示されつつある。申請者らもマウスのVILIモデルにおいてNETs形成が誘導されることを確認したが(Yildiz *et al.*, *Anesthesiology*. 2015 Apr;122(4):864-75)、重症化しやすい高齢者のVILIにおいてNETs形成がどのような状態にあるのかは未だ知られていない。従って、NETs形成をin vivoで評価できるマウスモデルを確立した加齢医学研究所の堀内研究室(Shishikura *et al.*, *Br J Pharmacol.* 201 Jan; 173(2):319-31)と協力し、VILIにおけるNETs形成の加齢による影響を明らかにするのが本研究の目的である。本研究は前年度課題番号65として採用され、Lipopolysaccharide(LPS)吸入と高一回換気量(20ml/kg 体重)換気のdouble hit VILI modelを用いて、老年マウスと若年対照マウスを評価した。同モデル肺胞洗浄液中には好中球とNETs様構造が見られた他、老年マウスでは肺コンプライアンス低下、肺胞

洗浄液中の好中球の増加など、より強い肺障害の傾向を認め、洗浄液中のDNA濃度が高いことから、老年マウスのVILIにおいてNETsが増悪因子として働くことが示唆され、本年度は継続課題として採択された。本研究室は平成28年度末にカナダ・トロント市のキーンナリサーチセンターからドイツ・ベルリン市のシャリテー医科大学に移転しており、新規の動物実験申請及び長期飼育という時間的制約により老年マウスによる本年度のin vivo実験結果はまだ得られていないが、本研究を多面的に進めるためmicrofluidic channel slideと培養細胞を用いたin vitro VILIモデルの構築を行った。



[研究打ち合わせ]

代表者らは老年マウスを使った実験計画などにつき、ネット会議やメールで適宜、議論を行った。また堀内教授は2017年度ベルリンで開催された国際血栓止血学会(ISTH2017:開催期間7月8日から13日)に参加、研究発表されたが、その機会を利用して我々の新研究室を訪問、視察された。その際、生理学研究棟合同セミナーにて、講演をしていただき相互理解を深めた。他日、ベルリン心臓センター(Deutsches Hertz Zentrum Berlin)にて同センター主催で行われた合同ミーティングでも講演いただき、広く意見交換をおこなった。老年マウスを使用する本研究には長期の協力が必要であり、ドイツ研究振興協会(DFG: Deutsche Forschungsgemeinschaft)にて研究助成

申請準備中の VILI のメカニズム解明プロジェクトの一部として継続する方針とし、今後も堀内研と話し合いながら、本研究を展開してゆく。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

VILI の主要機序の一つである atelectrauma は、溢水ないし虚脱により呼吸時に閉鎖していた肺胞や末梢気道に、吸気に伴って空気が侵入することで肺胞上皮上で気液相境界の移動が生じ、その際発生する高ずり応力によって上皮細胞が物理的に傷害されるためだと考えられている。そこで、この傷害機序を再現する *in vitro* アッセイ系の構築を試み、本年度は、以下に示す研究成果を得た。

1. Ibidi 社 μ -Slide を用い高さ 800 μm の微小水路内にヒト肺上皮由来 H441 をコンフルエント状態に至るまで培養した後、ポンプを用いて培養液、引き続き空気 (CO₂ 5% 添加) を交互に還流し、気液境界が細胞上を周期的に移動する系を構築した。チューブ配置の工夫、ポンプ圧の最適化により、上記 atelectrauma 発生状況を模した気液境界移動を少なくとも 6 時間以上安定的に維持できるようになった。
2. 培養液のみの還流に比べ、培養液、空気の交互還流による VILI モデルでは上皮の剥離に加え、sytox green による DNA 染色陽性細胞が増加した。sytox green は正常細胞膜を透過することはできないため、atelectrauma と同様の物理的機序で上皮細胞膜の障害が生じたと考えられる。
3. 前年度の *in vivo* 実験で保存していた肺胞洗浄液を追加解析し、コレステロール濃度を測定した。若年対照マウスに比べ、老年マウス VILI モデル由来の洗浄液では高いコレステロール濃度を示した。先行研究により、マウス VILI モデルで上昇する肺胞洗浄液中コレステロールは血清由来ではないことが示されており、未だ謎ではあるものの、細胞膜由来であることが疑われる。その場合、老年マウスでは肺の物理的障害が強いことを示唆しており、前年度示唆された老年マウスでの肺胞洗浄液中の NETs の増大に、好中球への物理的ストレスが関連している可能性がある。

in vitro VILI model: Ibidi 社ポンプシステムを改変し、気液相の移動による atelectrauma を模倣するもの



(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究は、臨床的に重要な問題である人工呼吸惹起性肺障害 (VILI) の重症化について、特に高齢者と NETs 形成の関わりに光を当てるものである。研究経過で述べたような経緯で、現在基本段階にある実験を重ねる他、Kuebler 研での生体顕微鏡を用いた肺内 NETs 評価、堀内研での高齢マウス白血球の NETs 形成能定量に加え、今回構築した *in vitro* VILI モデルに若年、老年マウス由来の好中球を投入し VILI (atelectrauma) における物理的ストレスによる NETs 形成の検討を進めてゆく。なお *in vitro* VILI モデル自体は今後の VILI 研究一般に応用できると考えられる。本共同研究は VILI 重症化メカニズムの理解に寄与する他、VILI 治療ターゲットとしての NETs 研究の可能性を拓くものである。

[4] 成果資料

研究成果は現時点で未発表である