

(様式4)

学位論文の内容の要旨

(鶴巻 寛朗) 印

(学位論文のタイトル)

Protective role of proton-sensing TDAG8 in lipopolysaccharide-induced acute lung injury

(リポポリサッカライド誘導急性肺傷害におけるプロトン感知性TDAG8の保護的役割)

(学位論文の要旨)

1. 研究の背景と目的

生体において細胞外pHは7.4前後に保たれている。しかし炎症局所においては様々な炎症細胞の浸潤を伴い、低酸素、低pH環境となる。このような細胞外pHの変化を感知する機構としてプロトン感知性Gタンパク質共役型受容体 (OGR1、TDAG8、GPR4) が近年報告されている。TDAG8はマクロファージや好中球のような血液系細胞において発現しており、pH6~8という生理的な状態から炎症時におけるpH変化を感知している。また、マクロファージにおいて低pH環境下のTNF- α 、IL-6の産生を抑制することが報告されており、炎症の病態に関わっていることが考えられている。

一方、肺炎などにより発症する急性肺損傷/急性呼吸促迫症候群 (acute lung injury; ALI/ acute respiratory distress syndrome; ARDS) は肺炎や腹膜炎などの様々な疾患により二次的に起こる死亡率が高い病態であり、そのメカニズムについては不明な部分が多く、根治的な治療方法はわかっていない。経気管的Lipopolysaccharide (LPS) 投与によるALIマウスモデルは、グラム陰性菌の感染を要因とするALIの病態を反映するため、広く研究に用いられているモデルである。このモデルでは、気管内投与されたLPSと最初に接触する細胞である肺胞マクロファージまたは気道上皮細胞において、LPSの受容体であるTLR4を介して炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-6、IL-1 β) やケモカイン (KC/CXCL1、MIP-2/CXCL2) が産生され、それにより局所における好中球の遊走が起こり、好中球から産生されるプロテイナーゼや活性化酸素種などにより組織傷害が起こるとされている。

ALI/ARDSにおいては、重症になると呼気凝集液のpHが低下することが報告されていることから、肺の局所においては低pH環境となっていることが想定される。そこで、ALIの病態への関与ならびに新規の治療標的となる可能性を調べるために、ALIモデルマウスにおけるTDAG8の役割を解析した。

2. 実験方法

8-10週齢、雌のC57BL6/N 系統の野生型 (WT) マウスとTDAG8欠損 (TDAG8-KO) マウスを比較した。マウスは安楽死後に気管内にカニューレを挿入してリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて肺胞洗浄を行い、血球計算板にて白血球数を測定した。一部はサイトスピンで作成した塗抹標本にメイ・ギムザ染色を行い、細胞分画を測定した。肺から抽出したRNAはReal time PCR法にて定量的に評価した。また、肺から抽出したタンパクを用いて、SDS-PAGE、ウエスタンブロット法で目的となるタンパクを評価した。

ALIモデルは麻酔下にLPS 2.5 mg/kgを経気管的に投与することで作成した。対照群はPBSを経気管的に投与した。気管支肺胞洗浄液 (BALF) を採取し、遠心後の上清を用いてビシンコニン酸法 (BCA法) でタンパクを定量し、電気泳動にてタンパクを分離した。一部はELISA法にてサイトカイン (TNF- α 、IL-6)、ケモカイン (KC/CXCL1、MIP-2/CXCL2) を測定した。また、肺胞洗浄液中の白血球数および細胞分画を測定した。肺組織は中性緩衝ホルマリン液で固定後にパラフィン包埋してヘマトキシリン・エオジン染色を行い、

肺傷害組織スコアを算定した。肺組織より抽出したRNAは、Real time PCR法にて定量的に評価を行った。統計学的な解析は、One-way ANOVAにて多群の差を確認後、後検定としてTurky法を用いた。それぞれの検定においては、 p 値が0.05未満を統計学的に有意と評価した。

3. 結果

(1) WTマウスとTDAG8-KOマウスの肺において、OGR1、GPR4などのプロトン感知性受容体mRNA発現、また、LPSの受容体であるToll like receptor 4のタンパク、mRNA、共因子であるCD14のmRNAの発現に差は見られなかった。また、経気管的なPBS投与後の肺においてはTDAG8 mRNA発現量に変化はなかったが、LPS投与2時間後にTDAG8 mRNA発現量の上昇が見られた。

(2) WTマウスとTDAG8-KOマウスにおける肺胞洗浄液ではマクロファージが主要な細胞であり、WTマウスの肺胞洗浄液中細胞においてTDAG8 mRNAが発現していることを確認した。また、TLR4の発現に差は見られなかった。

(3) PBS投与群と比較してLPS投与群の肺胞洗浄液中白血球数は、気管内投与4時間後より有意に上昇し、好中球がその主要な細胞であった。LPS投与群において、WTマウスと比較してTDAG8-KOマウスでは気管内投与4時間後より総細胞数・好中球数の有意な増加を認めた。

(4) LPS投与群の肺胞洗浄液中のタンパク量は、PBS投与群と比較して気管内投与4時間後に増加し、LPS群においてTDAG8-KOマウスではWTマウスと比較して有意に増加していた。4時間後の肺組織において、PBS群と比較してLPS群では肺胞腔や肺間質組織に炎症細胞の浸潤が見られ、LPS群において、TDAG8-KOマウスではWTマウスと比較して、炎症細胞浸潤、肺組織傷害が増悪していた。

(5) LPS群の2時間後の肺において、PBS群と比較してサイトカイン(TNF- α 、IL-6)、ケモカイン(KC/CXCL1、MIP-2/CXCL2)mRNAが増加しており、LPS群においては、TDAG8-KOマウスではWTマウスと比較してKC/CXCL1とIL-6が有意に増加していた。LPS投与2時間後の肺胞洗浄液において、TDAG8-KOマウスではWTマウスと比較してKC/CXCL1が有意に増加していた。

4. 考察

本研究では、TDAG8欠損によりLPS投与2時間後の肺におけるKC、IL-6 mRNAの発現亢進ならびに肺胞洗浄液中のKCが増加し、LPS投与4時間後以降の肺における好中球数の増加が観察された。さらに、TDAG8欠損により肺傷害が増悪した。KCはマクロファージから産生される好中球の遊走を促す主要な走化因子のひとつであり、TDAG8欠損においては、KC産生が増加したことにより肺に浸潤した好中球数が増加し、それにより肺傷害が増悪したと考えられた。経気道的に投与されたLPSと最初に接触するのは、肺胞マクロファージまたは気道上皮細胞が想定されるが、TDAG8の発現はマクロファージや好中球の様な血液細胞に限定されており、本研究における病態の変化に主要な役割を果たしたのは肺胞マクロファージと考えられる。

経気道的LPS投与後早期において肺への好中球浸潤は多くないことから、好中球におけるTDAG8の役割について、本研究では言及していない。しかし、好中球はプロテイナーゼや活性化酸素種の産生により組織傷害をきたすため、ALIの病態において重要な役割を果たしている。過去に好中球からのスーパーオキシドアニオン産生は、TDAG8を介して低pH環境下で抑制されることが報告されており、この点からも好中球におけるTDAG8がALIの病態にどのように関わっているかを検討することは今後の課題と考えている。

5. 結論

ALI/ARDSモデルにおいてTDAG8は急性炎症に対して抑制的に機能している可能性が考えられた。肺胞マクロファージ由来のKC産生が重要な役割を担っていると考えられるが、好中球における役割の解析は今後の課題である。