Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2026-07-25

Ventilator-induced lung injury is reduced in transgenic mice thatoverexpress endothelial nitric oxide synthase

竹中，かおり

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2006-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲3660
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003660

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

【 121 】

氏　　名・（本　籍）	竹中　かおり	（　兵庫県　）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学　位　記　番　号	博い第1743号	
学位授与の　要　件	学位規則第５条第１項該当	
学位授与の　日　付	平成18年3月25日	

【 学位論文題目 】

Ventilator-induced lung injury is reduced in transgenic mice that overexpress endothelial nitric oxide synthase
（人工呼吸器誘発性肺障害は内皮型一酸化窒素合成酵素過剰発現マウスにおいて抑制される）

審　査　委　員

主 査　教　授　杉村　和朗
教　授　前田　　盛
教　授　尾原　秀史

【緒　言】

人工呼吸器惹起性肺傷害(Ventilator-induced lung injury; VILI) はびまん性肺胞傷害と血管透過性亢進を特徴とする病態で、急性肺傷害の一種と考えられている。本来様々な基礎疾患において生命を救うべき手段として用いられる人工呼吸器それ自身が肺傷害を引き起こすということが、近年注目されている。侵襲的な人工呼吸により様々なサイトカインやケモカインが産生され、全身性の炎症反応も引き起こすという機序が重要と考えられている。その炎症に関わる要因として一酸化窒素(NO)が重要な役割を果たすことも知られている。この NO の合成酵素には、神経型(nNOS)、誘導型(iNOS)、内皮型(eNOS)の 3 種類があり、いずれのアイソフォームも肺内に存在する。iNOS は炎症によって誘導される蛋白であり、一方 eNOS は生理的環境下において気道上皮および肺血管内皮に発現し、肺内環境の恒常性維持の役割を持つ。VILI の病因に関しては多くの研究がなされてきたが、中でも NO は pro-inflammatory effect と anti-inflammatory effect の二面性があるとされ、その果たす役割については多くの議論がなされている。VILI のモデルにおいては iNOS が誘導され VILI は悪化するという報告がほとんどを占めており、eNOS 単独の役割に関する検討は少ない。今回我々は eNOS トランスジェニックマウスを用い、iNOS を誘導しない VILI のモデル作成に成功し、eNOS の過剰発現が VILI において果たす役割につき検討した。

【方　法】

7 から 10 週齢の eNOS トランスジェニックマウス (eNOS-Tg)とその野生型である C57BL/6(WT)を用いた。麻酔下に気管切開を行い高換気量群(20mL/kg)と低換気量群(7mL/kg)の 2 群に分けて機械換気を行った。コントロール群は自発呼吸のみとした。4 時間の換気中は 30 分おきに血圧測定を行った(tail-cuff 法)。その後、各マウスより採血、気管支肺胞洗浄(BAL)、肺湿乾重量 (Wet/Dry) 比測定、肺の病理組織作成を行い、以下の項目について検討した。BAL 液と血液のサンプルを用い、細胞数、細胞分画、サイトカイン(TNF-α、IL-6、MIP-2、MCP-1)、の測定を行った。肺の組織標本は HE 染色を行った。BAL 液の NO 濃度は測定感度下限で評価できなかったため、NO の下流にある cGMP を測定して NO の産生量を評価した。また、肺組織抽出蛋白中の iNOS、eNOS の発現と蛋白量について、定量 real-time PCR、ウエスタンブロッテイング法を行い、さらに NOS 活性も測定して検討を加えた。また、別の実験では NOS の非特異的阻害剤である L-NAME (N^{ω}-nitro-L-arginine methyl eater)を eNOS-Tg と WT の 2 種類のマウスに前投与し、同様の検討を行った。一部の WT マウスに LPS の腹腔内投与を行い、

iNOS の発現評価のためのコントロールを作成した。

【結　果】

1．高換気量群・WT マウスにおいて認められた VILI の病理組織学的変化である間質への炎症性細胞浸潤と肺胞隔壁の浮腫は eNOS-Tg マウスにおいてともに抑制され、その抑制は L-NAME 投与により打ち消された。BAL 液においても、高換気量群での総細胞数は eNOS-Tg マウスで有意に減少し、その変化は好中球比においてより顕著であった。

2．肺の浮腫性変化の評価として Wet/Dry 比を用いたが、これに関しても高換気量群・WT マウスではコントロール群に比し有意に上昇したが eNOS-Tg マウスではコントロール群とほぼ同程度の値を示していた。eNOS-Tg マウスに L-NAME を投与すると高換気量群・WT マウス同様の上昇を示した。

3．eNOS と iNOS の蛋白発現に関してウエスタンブロッテイング法を行ったところ、前者は eNOS-Tg マウスで有意な増加が認められ、機械換気による蛋白量の変化は認められなかった。一方後者は LPS 投与のコントロール群以外のいずれの群においても発現が確認できなかった。これは定量 PCR と iNOS 活性値でも同様の結果であった。また、eNOS 活性は eNOS-Tg マウスで有意に上昇し、L-NAME 投与により抑制された。cGMP 測定値もそれを反映し、同様の結果であった。

4．各種サイトカインの濃度を血漿と BAL 液にて測定した。まず炎症の指標として TNF-α、IL-6 を測定したところ、高換気量群・WT マウスにおいて両者とも血漿と BAL 液で有意に増加した。BAL 液の IL-6 のみ eNOS-Tg マウスと WT 群での差を認めなかったが、それ以外では eNOS-Tg マウスで有意に抑制され、L-NAME によってその作用は打ち消され、好中球遊走の指標として測定した MIP-2 でも同様の傾向であった。MCP-1 においても血漿では MIP-2 と同様の結果であったが、BAL 液では各群間に有意差を認めなかった。

【考　察】

高換気量の機械換気によりマウスの肺に浮腫と炎症がもたらされ、それはサイトカインやケモカインの流出を伴っていることが示された。一方、低換気量では「保護的人工換気」と称されるごとく、病理組織学的変化もほとんど認め

られなかった。高換気量によってもたらされる肺傷害の様々な変化が、eNOS-Tg マウスにおいて抑制された。

NO は 3 つのアイソフォームにより構成され、それぞれが様々な経路を通して相互作用を持ちながら炎症に関与するため、その病態解析は複雑であり、VILI に関しても様々な報告があるものの一定の見解が得られない現状である。しかし、多くの報告に共通するのは、iNOS が誘導されるモデルで、iNOS が肺傷害に悪影響を及ぼすというものであった。VILI において eNOS に関する研究としては、eNOS と iNOS それぞれのノックアウトマウスを用いて iNOS の方が影響を与えていたという報告、ヒツジを用いて 3 週間という長期にわたる機械換気で肺血管と気道上皮に存在する eNOS 由来の NO が保護的役割を果たしたという報告がある。しかし、本研究では iNOS を誘導することなく eNOS 由来の NO の果たす役割について検討できたため、以前報告された研究には認められない新しい知見を追加できると思われた。

本研究で用いたトランスジェニックマウスは肺内の血管内皮細胞と気道上皮細胞に eNOS の過剰発現が認められており、両者により産生される NO が VILI に対して保護的な役割を果たし、そのメカニズムとしていくつかの経路が可能性として考えられた。

まず第一に、好中球性の炎症細胞浸潤は VILI において中心的な役割のひとつとして報告されており、eNOS 由来の NO が好中球浸潤やマクロファージの活性化を抑制したという機序である。肺胞の過伸展により活性化されたマクロファージがサイトカインを放出し、好中球を遊走することは報告されており、その遊走を eNOS 由来の NO が抑制したと考えられた。

次に、NO がサイトカインやケモカインの放出や受容体の発現を変えたという機序である。CXC ケモカインである MIP-2 は肺内に好中球を遊走させ、CC ケモカインである MCP-1 はマクロファージの活性化作用を持つ。これらの受容体である CXC ケモカイン受容体－2 は、内皮への好中球の接着や浸潤に関わり、好中球性炎症を制御している。eNOS-Tg マウスにおいて MIP-2 や MCP-1 の濃度が低下しており、これらの変化は全て NOS 阻害剤の L-NAME によって打ち消されたことから、その機序に eNOS 由来の NO が関わった可能性が考えられた。

また、TNF-α、IL-6 は炎症の指標として測定し、その変化は eNOS-Tg マウスにおいて野生型に比し抑制され、BAL 液中より血漿中でより顕著であった。故に、VILI では局所のみならず、全身性の炎症性変化が引き起こされており、肺に対してより反応性が高いと考えられた。MIP-2 や MCP-1 の濃度に関しても同様のことが言えた。NO は炎症の場において血管接着因子との関わりも報告されており、VILI においても VCAM-1 や ICAM-1 の発現を制御し、炎症の進展を抑制している可能性も示唆され、今後の課題と考えられた。

NO の吸入がヒツジの VILI モデルで肺での炎症を軽減したという報告もあり、NO の抗炎症効果が治療として有用である可能性がある。しかし、臨床の場においては NO の吸入療法は急性肺傷害の生存率を改善しないと言われている。本研究において、慢性的に過剰発現した eNOS は主に血管内皮での作用が重要な役割を果たしたと考えられ、これを治療に応用できれば、NO の吸入療法とは違った効果が期待できるものと思われた。そのアプローチについては今後の研究課題である。

【結論】

慢性的に過剰発現させた eNOS 由来の NO は、好中球性炎症に関与するサイトカインやケモカインの産生を抑制し、VILI に対して保護的役割を果たした。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第1720号	氏　名	竹中　かおり
論文題目 Title of Dissertation	Ventilator-induced lung injury is reduced in transgenic mice that overexpress endothelial nitric oxide synthase 人工呼吸器誘発性肺障害は内皮型一酸化窒素合成酵素過剰発現マウスにおいて抑制される		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 杉村和朗 副　査 Vice-examiner 前田 益 副　査 Vice-examiner 尾島孝史		
審査終了日	平成 18 年 3 月 15 日		

（要旨は1，０００字～2，０００字程度）

1．序文

人工呼吸器惹起性肺傷害(Ventilator-induced lung injury; VILI) はびまん性肺胞傷害と血管透過性亢進を特徴とする病態で、急性肺傷害の一種と考えられている。侵襲的な人工呼吸により様々なサイトカインが産生され、全身性の炎症反応も引き起こすという機序が重要で、一酸化窒素(NO)が重要な役割を果たすことも知られている。NO の合成酵素には、神経型(nNOS)、誘導型(iNOS)、内皮型(eNOS)の 3 種類があり、いずれのアイソフォームも肺内に存在する。iNOS は炎症によって誘導され、eNOS は生理的環境下において気道上皮および肺血管内皮に発現している。VILI の病因に関しては多くの研究がなされてきたが、NO は pro-inflammatory effect と anti-inflammatory effect の二面性があり、その果たす役割については多くの議論がなされている。過去の研究では iNOS が誘導され VILI は悪化するという報告がほとんどを占め、eNOS 単独の役割に関する検討は少ない。我々は eNOS トランスジェニックマウスを用い、iNOS を誘導しない VILI のモデルを作成し、eNOS の過剰発現が VILI において果たす役割につき検討した。

2．方法

7 から 10 週齢の eNOS トランスジェニックマウス (eNOS-Tg)とその野生型 C57BL/6(WT)を用いた。麻酔下に気管切開を行い高換気量群(20mL/kg)と低換気量群(7mL/kg)の 2 群に分けて 4 時間の機械換気を行い各マウスより採血、気管支肺胞洗浄(BAL)、肺湿乾重量 (Wet/Dry) 比測定、肺の病理組織作成(HE 染色)を行った。BAL 液細胞数・細胞分画、BAL 液と血漿中のサイトカイン(TNF-α、IL-6、MIP-2、MCP-1)を測定した。cGMP を測定して NO の産生量を評価した。また、肺組織抽出蛋白中の iNOS、eNOS の発現について、定量 real-time PCR、ウエスタンブロッテイング法を行い、NOS 活性も測定して検討を加えた。また、NOS の非特異的阻害剤である L-NAME

(N$^{\omega}$-nitro-L-arginine methyl eater)を前投与するモデルも作成し、同様の検討を行った。コントロール群は自発呼吸のみとした。

3．結果

eNOS 蛋白発現は、eNOS-Tg マウスで有意に増加しており機械換気による蛋白量の変化は認められず、eNOS 活性、cGMP 測定値は eNOS-Tg マウスで有意に上昇し、L-NAME 投与により抑制された。一方 iNOS は蛋白、定量 PCR と iNOS 活性値いずれも認められなかった。よって iNOS を誘導せず eNOS の単独評価を行い得る VILI のモデルといえた。

高換気量群・WT マウスにおいて認められた VILI の病理組織学的変化、Wet/Dry 比、BAL 液中の総細胞数は eNOS-Tg マウスで有意に減少し、その変化は好中球比においてより顕著であった。その抑制は L-NAME 投与により打ち消された。血漿と BAL 液における各種サイトカインの濃度は TNF-α、IL-6（炎症全体の指標）MIP-2（好中球遊走の指標）、MCP-1（マクロファージ活性化の指標）においても同様の結果であった。BAL 液の IL-6 のみ eNOS-Tg マウスと WT 群での差を認めなかった。

4．考察

好中球性の炎症細胞浸潤は VILI において中心的な役割を果たすと言われ、本研究でも高換気量の機械換気によりマウスの肺に浮腫と好中球性炎症がもたらされ、それはサイトカインやケモカインの流出を伴っていることが示された。一方、低換気量換気は「保護的」と称される如く、病理組織学的変化もほとんど認めなかった。高換気量による肺傷害は eNOS-Tg マウスにおいて抑制され、eNOS 由来の NO が好中球浸潤やマクロファージの活性化を抑制したという機序が考えられた。また、肺内に好中球を遊走させる MIP-2 や MCP-1 の濃度が eNOS-Tg マウスにおいて低下しており、その変化は NOS 阻害剤の L-NAME によって打ち消されたことから、その機序に eNOS 由来の NO がサイトカインやケモカインの放出や受容体の発現を変えたという機序も考えられた。

本研究は、VILI において iNOS を誘導することなく eNOS 由来の NO の果たす役割について検討したものであるが、慢性的に過剰発現した eNOS は主に血管内皮での作用が特に重要な役割を果たしたと考えられ、これを治療に応用できれば、NO の吸入療法とは違った効果が期待できるものと思われ、従来臨床の場においても行われなかった VILI の予防において重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。