



Hypocapnic Alkalosis Enhances Oxidant-induced Apoptosis of Human Alveolar Epithelial Type II Cells

安藤, 俊弘

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2008-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4121

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004121>

※ 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。



氏 名	安藤 俊弘
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 1877 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 20 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Hypocapnic Alkalosis Enhances Oxidant-induced Apoptosis of Human Alveolar Epithelial Type II Cells（低二酸化炭素性アルカローシスはオキシダントによるヒト肺胞 2 型上皮細胞のアポトーシス誘導を増強する）

審 査 委 員

主 査	教 授	平田 健一
	教 授	黒田 嘉和
	教 授	丸尾 猛

Hypocapnic Alkalosis Enhances Oxidant-Induced Apoptosis of Human Alveolar Epithelial Type II Cells

低二酸化炭素性アルカローシスはオキシダントによる
ヒト肺胞2型上皮細胞のアポトーシスを誘導を増強する

【背景と目的】

肺胞2型上皮細胞(AEC-II)は1型上皮細胞に分化すること、肺胞内の水分を吸収すること、およびサーファクタントを産生することなどを介して肺胞構築や肺機能の維持に重要な役割を果たしている。急性肺傷害は広範な上皮損傷を特徴としており、活性酸素によるAEC-IIのアポトーシスがその上皮脱落に関与していると考えられている。高炭酸血症に伴うアシドーシスの環境下では活性酸素による肺傷害が軽減することが動物実験で示されている。一方、低二酸化炭素性アルカローシスの環境では肺傷害が増悪することが報告されている。またアシドーシスやアルカローシスは様々な細胞のアポトーシスに影響することが判っている。以上より酸塩基平衡異常は活性酸素によるAEC-IIのアポトーシスを誘導をも修飾するかもしれない。このことを検証するために培養液の条件(pH及びCO₂分圧)を5通りに設定してAEC-IIのアポトーシスの程度を評価した。

【方 法】

A549細胞(1ウェルあたり4万個)を20%酸素及び5%二酸化炭素で満たされたインキュベータ(37°C)内で培養し80%confluentの状態を得た。その後CO₂可変型インキュベータを用い以下の培養条件(標準条件、metabolic acidosis、metabolic alkalosis、hypercapnic acidosis、hypocapnic alkalosis)に変更して1.5 mmol/Lの過酸化水素を添加しさらに4時間培養を続けアポトーシスを誘導の程度を観察した。pHの調節には炭酸水素ナトリウム、塩酸を用いた。アポトーシスはdye-uptake bioassay (APOPercentage Apoptosis Assay Kit)を用いて検出した。またカスパーゼ陽性細胞は蛍光標識したカスパーゼインヒビターのマーカー(CaspACE FITC-VAD-FMK insitu marker)を用いて検出した。アポトーシスの誘導率とカスパーゼ活性陽性率を画像解析システム(Winroof)で評価した。統計処理はone-way ANOVA及びStudent-Newman-Keuls test(post-hoc test)を用いp<0.05を有意差ありとした。

【結 果】

過酸化水素を非存在下ではアシドーシス(pH=7.26-7.27)およびアルカローシス(pH=7.73-7.74)そのものがA549のアポトーシスを誘導することはなかった。1.5mmol/Lの過酸化水素を4時間曝露することにより標準培養条件(pH=7.45、PCO₂=41mmHg)においては2.5%のA549細胞にアポトーシスが誘導された。低二酸化炭素性アルカローシス(pH=7.74、PCO₂=22mmHg)は過酸化水素によるカスパーゼ活性とアポトーシスを有意に亢進した。一方、代謝性アル

カローシス(pH=7.73, PCO₂=43mmHg)は過酸化水素によるアポトーシス誘導を亢進したか有意ではなかった。アシドーシスの培養条件では代謝性(pH=7.26, PCO₂=41mmHg)においても高二酸化炭素性(pH=7.26, PCO₂=71mmHg)においても過酸化水素によるアポトーシスの増強はみられなかった。

【考 察】

カルシウムイオンはアポトーシスを含め細胞機能を制御する重要な因子である。過酸化水素は細胞外からカルシウムイオンの流入を刺激したり細胞内に貯蔵されているカルシウムイオンを動員して細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる。またカルシウムイオンはカスパーゼ活性のトリガーにもなり、過酸化水素はカスパーゼ依存性の経路を介してもアポトーシスを誘導する。今回の研究では細胞内のカルシウムイオンレベルを測定していないので低二酸化炭素性アルカローシスが過酸化水素による A549 のアポトーシスを亢進したメカニズムは決定できない。しかし、従来よりアルカリ環境下では細胞内のカルシウムイオンレベルが上昇することが示されており、筋細胞や骨細胞では細胞内カルシウムイオンの上昇が過酸化水素によるアポトーシスを増強することが報告されている。今回の実験では低二酸化炭素性アルカローシスの環境が過酸化水素刺激による細胞内カルシウムレベルの上昇を増強してアポトーシスを引き起こしたのかもしれない。他の機序としては活性酸素がミトコンドリアの損傷を引き起こすことやアルカリ環境においてはミトコンドリアの機能が低下することが知られているので、低二酸化炭素

性アルカローシスはミトコンドリアの機能不全を介して過酸化水素による A549 のアポトーシス誘導を亢進したのかもしれない。

一方、今回の研究では代謝性アルカローシスは過酸化水素によるアポトーシスの誘導を増強したものの有意ではなかった。これは標本数が少ないための type-II エラーかもしれないが、代謝性アルカローシスにおいては低二酸化炭素性(呼吸性)アルカローシスに比べ細胞内 pH の上昇に時間がかかることによる可能性もある。

集中治療においては肺傷害の発症や増悪を予防するような呼吸管理が必要である。近年、高二酸化炭素血症を伴う低容量換気戦略が急性肺傷害の予後改善に寄与することが示されている。動物研究においては過換気に伴う低二酸化炭素性(呼吸性)アルカローシスは虚血-再灌流、機械的伸展および高濃度酸素によってひき起こされた急性肺傷害を悪化させる。これらの肺傷害のメカニズムには大量に産生された活性酸素が関与している。活性酸素による AEC-II のアポトーシスは急性肺傷害における広範な肺胞構築の崩壊をもたらす。かくして低二酸化炭素性アルカローシスによる AEC-II のアポトーシス亢進は過換気に伴う急性肺傷害の増悪に関与しているのかもしれない。今回の研究結果は、健康肺においては酸塩基平衡の障害は AEC-II のアポトーシスを誘導しないが、酸化ストレスのかかるような環境においては呼吸性アルカローシスが代謝性アルカローシスと比較して肺胞上皮に対し傷害性が高いことを示唆している。実際、whole body を用いた動物実験では呼吸性アルカローシスは代謝性アルカローシスと比較して肺に対して傷害性が高いようである。今回の研究はこの報告をサポートするような結果である。我々の実験結果は急性肺傷害に対

する最適な呼吸管理戦略の確立に向けて基礎的知識を付け加えるものである。

しかし今回の研究にはいくつかの問題点があるので、現時点での臨床意義については論議できない。まず癌細胞を使用している点が指摘される。ただし、A549も正常細胞のAEC-IIと同様にサーファクタントやメディエータを産生・分泌する能力があり活性酸素でアポトーシスが誘導される点も同じである。しかしラットから分離培養した正常細胞はアポトーシスのバックグラウンドが高く、さまざまな培養条件がもたらす影響がA549と同一であるとは決められない。また今回の研究では単純な培養細胞システムを使用しておりアポトーシスに関わる生体内の複雑な細胞間相互作用を反映できないので、我々のデータを whole body に外挿することは差し控えるべきである。

【結 論】

アルカローシス環境はA549細胞における過酸化水素によるカスパーゼ活性とアポトーシス誘導を亢進した。特に低二酸化炭素性アルカローシスはこれらを有意に増強した。一方、アシドーシスの環境は過酸化水素によるA549細胞のアポトーシス誘導に対し有意な影響を及ぼさなかった。

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 1879 号	氏 名	安藤 俊弘
論文題目 Title of Dissertation	<p>Hypocapnic Alkalosis Enhances Oxidant-Induced Apoptosis of Human Alveolar Epithelial Type II Cells</p> <p>低二酸化炭素性アルカローシスはオキシダントによるヒト肺胞2型上皮細胞のアポトーシス誘導を増強する</p>		
審査委員 Examiner	<p>主 査 平田 健一 Chief Examiner</p> <p>副 査 黒田嘉和 Vice-examiner</p> <p>副 査 丸尾 勉 Vice-examiner</p>		
審査修了日	平成 19 年 10 月 17 日		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

集中治療においては肺傷害の発症や増悪を予防するような呼吸管理が必要である。近年、高二酸化炭素血症を伴う低容量換気戦略が急性肺傷害の予後改善に寄与することが示されている。動物研究において、過換気に伴う低二酸化炭素性（呼吸性）アルカローシスは、虚血-再灌流、機械的伸展および高濃度酸素によって引き起こされた急性肺傷害を悪化させることが報告されている。この肺傷害のメカニズムには、大量に産生された活性酸素が関与しており、活性酸素による肺胞2型上皮細胞（AEC-II）のアポトーシスが広範な急性肺傷害を生じると考えられている。また、高炭酸血症に伴うアシドーシスの環境下では活性酸素による肺傷害が軽減し、低二酸化炭素性アルカローシスの環境では肺傷害が増悪することが報告されている。したがって、申請者は、酸塩基平衡異常が活性酸素によるAEC-IIのアポトーシス誘導に影響を与えると仮定し、以下の検討を行った。AEC-IIであるA549細胞を20%酸素及び5%二酸化炭素で満たされたインキュベータ(37°C)内で培養し、その後、CO₂可変型インキュベータを用いて、以下の培養条件（標準条件、metabolic acidosis、metabolic alkalosis、hypercapnic acidosis、hypocapnic alkalosis）に変更して1.5 mmol/Lの過酸化水素を添加しさらに4時間培養を続けアポトーシス誘導の程度を観察した。pHの調節には炭酸水素ナトリウム、塩酸を用いた。過酸化水素を非存在下ではアシドーシスおよびアルカローシスそのものがA549のアポトーシスを誘導することとはなかった。1.5mmol/Lの過酸化水素を4時間曝露することにより標準培養条件(pH=7.45、PCO₂=41mmHg)においては2.5%のA549細胞にアポトーシスが誘導された。低二酸化炭素性アルカローシス

(pH=7.74, PCO₂=22mmHg)は過酸化水素によるカスパーゼ活性とアポトーシス誘導を有意に亢進した。一方、代謝性アルカローシス(pH=7.73, PCO₂=43mmHg)は過酸化水素によるアポトーシス誘導を亢進したが有意ではなかった。アシドーシスの培養条件では代謝性(pH=7.26, PCO₂=41mmHg)においても高二酸化炭素性(pH=7.26, PCO₂=71mmHg)においても過酸化水素によるアポトーシスの増強はみられなかった。今回の研究結果から、申請者は、健康肺においては酸塩基平衡の障害はAEC-IIのアポトーシスを誘導しないが、酸化ストレスのかかるような環境においては呼吸性アルカローシスが代謝性アルカローシスと比較して肺胞上皮に対し傷害性が高いことを示した。実際、whole bodyを用いた動物実験では呼吸性アルカローシスは代謝性アルカローシスと比較して肺に対して傷害性が高いとの報告も見られる。

以上、本研究の実験結果は、急性肺傷害に対する最適な呼吸管理戦略の確立に向けて基礎的知識を付け加える重要な知見を示したものであり、価値があると認める。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。