Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Neutrophil elastase inhibitor (sivelestat) attenuates subsequentventilator-induced lung injury in mice

坂下, 明大

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2008-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲4131
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004131

※ 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	坂下　明大
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学　位　記　番　号	博い第 1882 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 】

Neutrophil elastase inhibitor (sivelestat) attenuates subsequentventilator-induced lung injury in mice(好中球エラスターゼ阻害剤（sivelestat）はマウスにおける人工呼吸惹起性肺障害を抑制する)

審　査　委　員

主　査　　教　授　平田　健一
　　教　授　前川　信博
　　教　授　石井　　昇

【緒 言】

本来、機械的人工呼吸 (mechanical ventilation; MV) は急性呼吸促迫症候群のような重症の呼吸不全患者の治療に有効な手段ではあるが、それ自身が人工呼吸惹起性肺障害 (Ventilator-induced lung injury; VILI) を引き起こす可能性がある。低換気量でのMVが急性呼吸促迫症候群による死亡率を抑えたと報告がされているが、VILIに対する治療法については明らかではない。VILIは瀰漫性の肺胞傷害と好中球優位な炎症反応を伴う血管透過性の亢進を特徴とする病態である。

以前、我々は慢性的に過剰発現させた内皮型一酸化窒素合成酵素由来の一酸化窒素が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すことを報告した。今回我々は、好中球エラスターゼ阻害剤がVILIのマウスモデルにおいて、炎症の抑制にどのように関与するかについて検討した。

【方 法】

7～10 週齢の C57BL/6 マウスを全身麻酔下に気管切開し、高換気量(20ml/kg), 換気回数 80 回/分の設定で4時間人工呼吸管理をした。sivelestat 投与群は人工呼吸開始 30 分前に sivelestat 100mg/kg を腹腔内投与した。4 時間の人工呼吸管理後各マウスについて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、好中球エラスターゼ (NE) 活性、細胞数、細胞分画、サイトカイン(IL-6、TNF-α、MIP-2)の測定を行った。肺の組織標本は HE 染色を行い、肺損傷の程度を VILI score にて評価した。好中球浸潤の指標として、myeloperoxidase (MPO) acitivity を測定した。また、肺組織抽出蛋白中の mitogen-activated protein kinases (MAPKs) のリン酸化の評価のためウエスタンブロッテイング法を行い、さらに early growth response gene-1 (Egr-1) の発現量を定量 real-time PCR を用いて測定し検討を加えた。また、肺組織のアポトーシスの評価のため TUNEL 染色を行い検討した。

【結 果】

1. まず、好中球エラスターゼ阻害剤の VILI に対する抑制効果を調べるために異なる容量で sivelestat を投与し NE 活性を測定した。高換気量群では NE 活性は有意に上昇していたが、sivelestat 投与群 (100 mg/kg, 200 mg/kg) では有意に低下が認められた。しかし、sivelestat (50 mg/kg) 投与群では十分に抑制されなかったため、以後の実験において sivelestat 100 mg/kg を投与することとした。また、MPO 活性について高換気量群では有意に上昇がみられ、sivelestat 投与により有意に低下していた。

2. 高換気量群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 sivelestat 投与により軽減された。BAL 液においても、高換気量群で総細胞数、好中球数は有意に増加し、sivelestat 投与群では有意に減少していた。

3. Wet/Dry 比に関しても高換気量群では有意に上昇し、sivelestat 投与によりコントロール群とほぼ同程度の値を示した。

4. まず炎症の指標として TNF-α、IL-6 を測定したところ、高換気量群において血清と BAL 液共に有意に増加し、sivelestat 投与群では有意に減少した。次に MIP-2 においても同様に高換気群で有意に増加していたが sivelestat 投与群では著明に減少していた。

5. MAPKs のリン酸化については、高換気量群において JNK p54 protein のリン酸化が著明に増加していた。ERK のリン酸化については MV により亢進していたが、高換気量群と sivelestat 投与群では差が認められなかった。p38 MAPK のリン酸化については MV による変化はみられなかった。次に、Egr-1 の発現量を測定したところ、高換気量群ではコントロール群と比較して著明に発現が亢進していたが、sivelestat 投与群では有意に低下していた。

6. 全群において炎症細胞や肺胞上皮細胞に TUNEL 陽性細胞が認められた。アポトーシス陽性率は高換気量群で著明に増加していた。sivelestat 投与群では有意にアポトーシス陽性率は低下していた。アポトーシス細胞の比率については、炎症細胞や肺胞上皮細胞では特に違いは見られなかった。

【考 察】

MV はマクロファージの活性化を引き起こし、好中球の循環血漿中から肺胞腔内への遊走や、NE と活性酸素種の放出を促進する。肺胞—毛細血管膜の障害が引き続き起こり、活性化された好中球が肺の血管透過性を亢進し肺水腫を起こすといわれている。4 時間の高換気量の MV で、活性化された好中球の瀰漫性の浸潤が見られるが、好中球を除去した動物モデルでは炎症が軽減したという報告もある。それ故、好中球の浸潤は VILI の病態で中心的な役割を果たしている。マクロファージも肺の炎症において重要な因子の一つであるが、我々のモデルではマクロファージよりも

好中球数の変化の方が著明であった。

NE は結合組織中の主要な構成要素であるエラスチン、コラーゲンやプロテオグリカンなどを分解する蛋白分解酵素であり、血管内皮と肺胞上皮の透過性を亢進させ、肺水腫をきたすといわれている。sivelestat は好中球遊走因子、炎症性サイトカインやその他の接着促進分子の放出を抑制することにより間接的に好中球の浸潤を抑制すると報告されている。これらの結果から MV が好中球の浸潤をきたし、VILI の病態形成において好中球が NE の標的になっているものと思われる。

MIP-2/IL-8 は好中球遊走因子であり、肺組織中では肺胞上皮細胞や肺胞マクロファージなどの様々な細胞で産生される。in vitro の実験では cyclic stretch が肺胞上皮細胞とマクロファージからの IL-8 の放出を増加させ、また2型肺胞上皮細胞において、NE により刺激された IL-8 の放出が好中球エラスターゼ阻害剤により濃度依存性に抑制されたと報告されている。血管内皮と平滑筋細胞において炎症性刺激により IL-8 が分泌されるが、MV による機械的ストレスに対してこれらの反応が起こる機序は依然として明らかにはなっていない。

Mechanosensors としては stretch-activated イオンチャンネル、インテグリン受容体、focal adhesion complex や成長因子受容体などがあり、これらは MAPKs を活性化し、AP-1, ATF-2, ELK-1 や Egr-1 といった転写因子を活性化する。Egr-1 は TNF-αのプロモーター領域に結合し TNF-αの転写活性に必要である。さらに、ラットのモデルで低換気と高換気では JNK と ERK1/2 の活性に差があるのに対して、p38 MAPK は活性化されないとの報告もある。我々のモデルにおいても同様に JNK と ERK1/2 のリン酸化は著明に増加したが、p38 MAPK のリン酸化はみられなかった。

炎症の経路の一つとして JNK とそれに続く転写因子の AP-1 の活性化がある。MV により2型肺胞上皮の JNK が活性化され、JNK 阻害により MIP-2 の産生と VILI が抑制されたとの報告がある。さらに、vitro においてストレッチにより誘導された IL-8 のプロモーター領域への AP-1 の結合は JNK の活性化に依存しているといわれている。我々のモデルにおいても、sivelestat が MIP-2/IL-8 の産生に関与する JNK の活性化を抑制していた。これらの結果は虚血再環流モデルにおいて好中球エラスターゼ阻害剤が好中球の活性を抑制するという報告と一致する。

機械的ストレスが肺胞上皮細胞にアポトーシスを起こすといわれている。NE は肺胞上皮細胞のアポトーシスを誘導する。また、JNK の活性化とアポトーシスの誘導に強い相関があることが種々のストレス反応に対する様々な組織で有ることが明らかとなっている。JNK の活性化と c-Jun のリン酸化が AP-1 のプロモーター領域を通じて Fas ligand を調節していると報告されている。我々も sivelestat が JNK の活性化と Egr-1 の発現を抑制することにより炎症細胞や肺胞上皮細胞のアポトーシスを減少させるという新たな作用を有することを発見した。これらの結果から sivelestat は NE 活性を抑制するだけでなく、細胞膜に対して直接的な薬理学的な効果を持つことが示唆

された。今回我々が用いた容量では sivelestat が傷害肺における細胞死に対して保護的に作用したと考えられる。

我々の VILI モデルによる実験結果から、好中球エラスターゼ阻害剤の VILI に対する新たな治療の可能性が示唆された。VILI の治療においてどのような患者に sivelestat の投与が有効か、また sivelestat の最適な投与方法についてさらなる臨床的なアプローチが必要である。

【結論】

好中球エラスターゼ阻害剤は NE 活性を抑制するとともに細胞内シグナルにも影響し、VILI に対して保護的作用を有することが示唆された。

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 1883 号	氏　　名	坂下　明大
論文題目 Title of Dissertation	Neutrophil elastase inhibitor(sivelestat)attenuates subsequent ventilator-induced lung injury in mice 好中球エラスターゼ阻害剤（sivelestat）はマウスにおける人口呼吸惹起性肺障害を抑制する		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 平田健一 副　査 Vice-examiner 前川信博 副　査 Vice-examiner 石井昇		
審査修了日	平成 19 年 12 月 19 日		

（要旨は 1,000 字ー2,000 字程度）

機械的人工呼吸（mechanical ventilation; MV）は重症の呼吸不全患者の治療に有効であるが、人工呼吸惹起性肺障害（Ventilator-induced lung injury; VILI）を引き起こすことがあり、現在 VILI に対する有効な治療法については明らかではない。本研究は、好中球エラスターゼ阻害剤 sivelestat が VILI のマウスモデルにおいて、炎症の抑制にどのように関与するかについて検討したものである。

本研究では、7～10 週齢の C57BL/6 マウスを全身麻酔下に気管切開し、高換気量(20ml/kg)，換気回数 80 回/分の設定で 4 時間人工呼吸管理をした。sivelestat 投与群は人工呼吸開始 30 分前に sivelestat 100mg/kg を腹腔内投与した。まず、好中球エラスターゼ阻害剤の VILI に対する抑制効果を調べるために異なる容量で sivelestat を投与し、好中球エラスターゼ（NE）活性を測定した。高換気量群では NE 活性は有意に上昇していたが、sivelestat 投与群（100 mg/kg，200 mg/kg）では有意に低下が認められ、高換気量群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軽減した。

まず炎症の指標として TNF-α、IL-6 を測定したところ、高換気量群において血清と肺胞洗浄液共に有意に増加し、sivelestat 投与群では有意に減少した。次に MIP-2 においても同様に高換気群で有意に増加していたが sivelestat 投与群では著明に減少していた。MAPKs のリン酸化については、高換気量群において MIP-2/IL-8 の産生に関与する JNK p54 protein のリン酸化が著明に増加していた。Egr-1 は、高換気量群ではコントロール群と比較して著明に発現が亢進していたが、sivelestat 投与群では有意に低下していた。全群において炎症細胞や肺胞上皮細胞に TUNEL 陽性細胞が認められた。アポトーシス陽性率は高換気量群で著明に増加していた。sivelestat 投与

群では有意にアポトーシス陽性率は低下していた。アポトーシス細胞の比率については、炎症細胞や肺胞上皮細胞では特に違いは見られなかった。さらに、sivelestat が MIP-2/IL-8 の産生に関与する JNK の活性化を抑制していた。これらの結果は虚血再環流モデルにおいて好中球エラスターゼ阻害剤が好中球の活性を抑制するという報告と一致する。これらの結果から sivelestat は NE 活性を抑制するだけでなく、細胞膜に対して直接的な薬理学的な効果を持つことが示唆された。今回の結果から sivelestat が傷害肺における細胞死に対して保護的に作用したと考えられる。

以上、本研究は、好中球エラスターゼ阻害剤の人工呼吸惹起性肺障害に対する新たな治療薬になる可能性を示したものである。さらに、好中球エラスターゼ阻害剤が好中球エラスターゼ活性を抑制するとともに細胞内シグナルにも影響し、人工呼吸惹起性肺障害に対して保護的作用を有すること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。