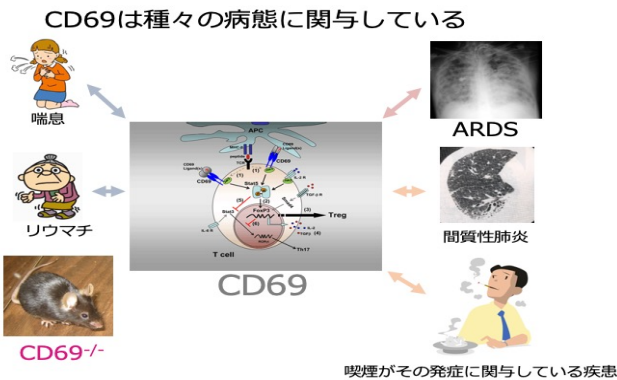


# 急性肺障害の発症機序・修復機転に関する研究

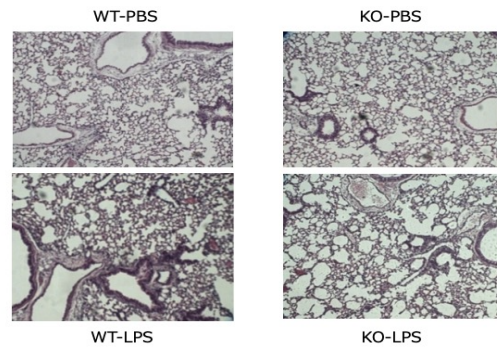
急性肺障害は臨床的にはARDSとして認識されている。急性肺障害の原因は肺内・肺外と分けられ、さらに多彩な原因となりうる病態がその発症に関与している。最終的な結果として肺障害が生じ血管透過性亢進型肺水腫病態を呈する。肺構造の改変が進展するとこの病態を元に修復させる有効な薬物療法は存在しない。急性肺障害とは何なのか、その病態の修飾因子は何なのか、細胞レベル・物質レベル・遺伝子レベルで何が惹起されているのかを探求する必要がある。

## 急性肺障害におけるCD69

CD69は、活性化T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞(NK細胞)など多くの炎症細胞表面に発現しているCD分子のひとつである。CD69はシグナル伝達で機能するレセプターとして、リンパ球の増殖とその機能に関与していることから、免疫系がその病態に関与している多くの呼吸器疾患で何らかの役割を果たしているはずである。CD69KoマウスではLPSによる肺の好中球浸潤、MPO量、KCおよびMIP2などのサイトカイン・ケモカインの増加が抑制されていた。免疫蛍光染色では、LPSによるCD69の発現誘導は肺マクロファージに限局しており、それに伴いKCおよびMIP2の発現を認めた。マクロファージ上のCD69はLPS急性肺障害(好中球性炎症)において重要な役割を果たしており、急性肺障害治療目標になる可能性があることを示した(Life Sci 2012;90:657-665)。喫煙暴露マウス研究では、CD69分子は喫煙による肺炎症に関与していた(J Receptors and Signal Transduction 31: 434, 2011)。ブレオマイシン肺線維症モデルでは、LPS急性肺障害モデルと同様に、肺マクロファージにCD69分子の発現を認めた(Respir Res 2011;12:131-140)。これら一連のCD69研究は、黒田文伸、粕谷善俊博士の指導により達成した。

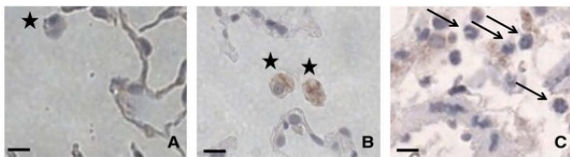


## CD69欠損マウスにおけるLPSによる肺炎症の抑制



Ishizaki S, et al. Life Sci 2012;90:657-665.

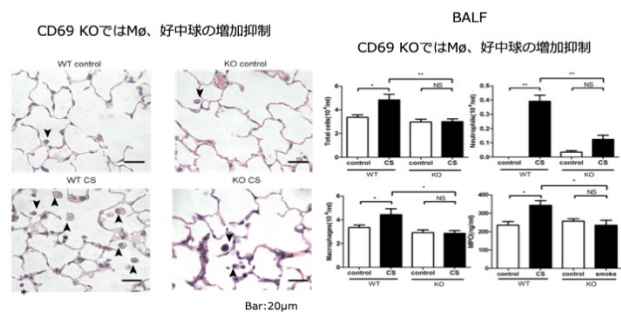
## LPSによる急性肺傷害



マクロファージ特異的にCD69分子が陽性になる  
好中球にはCD69分子は発現しない

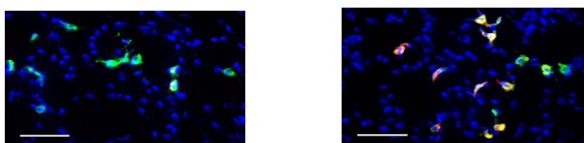
Ishizaki S, et al. Life Sci 2012;90:657-665.

## CD69欠損マウスにおける喫煙曝露による肺炎症の抑制



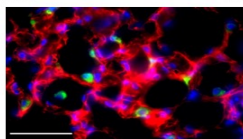
Tsuyusaki J, et al. J Receptors and Signal Transduction 31: 434, 2011

## BLM肺線維症モデル：肺マクロファージにおけるCD69の発現



WT-sham CD69 + Iba1

WT-BLM CD69 + Iba1

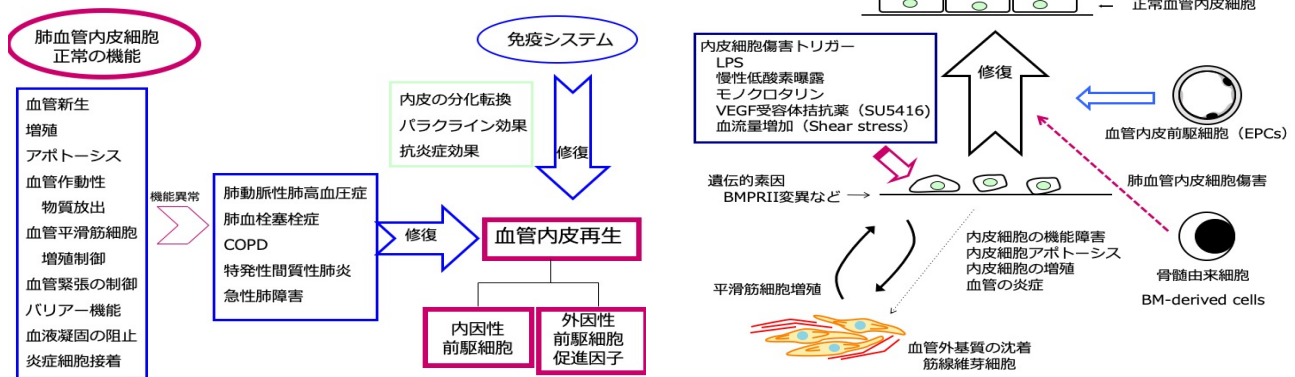


Iba1-gp36

Yamauchi K, et al. Resp Res 12: 131, 2011

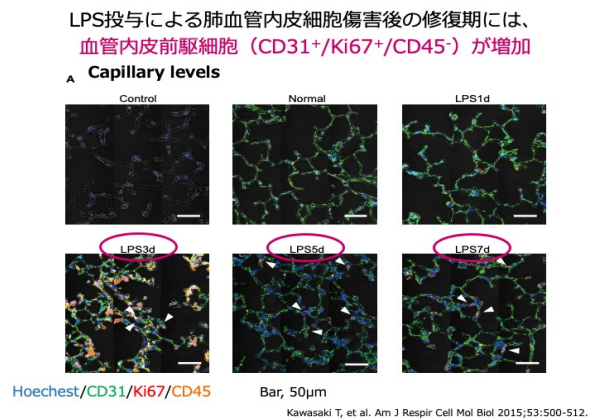
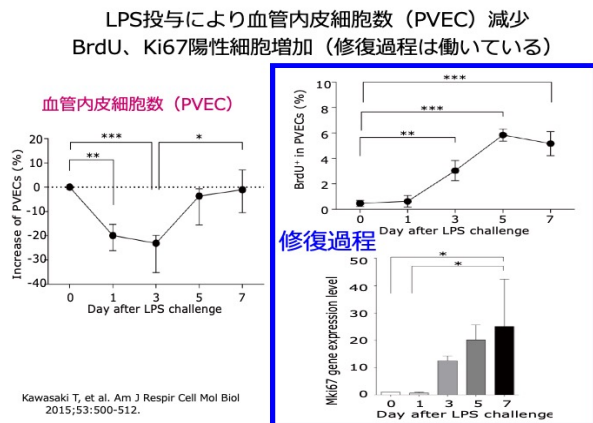
## 急性肺傷害における肺血管内皮細胞傷害とその修復

呼吸器疾患はすべて肺障害の結果として生じている。何らかの遺伝的素因を有している個体に傷害が加わり、傷害に対する生体防御反応を超えた反応が生じた場合、表現型は多彩となるが、広義に考えると肺障害が生じる。最初に傷害を受ける細胞は気道上皮・肺胞上皮・血管内皮など種々である。何らかの機能異常・形態障害が生じた時、生体には必ず修復反応が生じているはずである。何らかの病態成立は、その修復反応を超える反応が生じた場合である。健常人は、軽度の傷害に対する修復反応が常に適切に生じることにより、健常を維持していると考えられる。

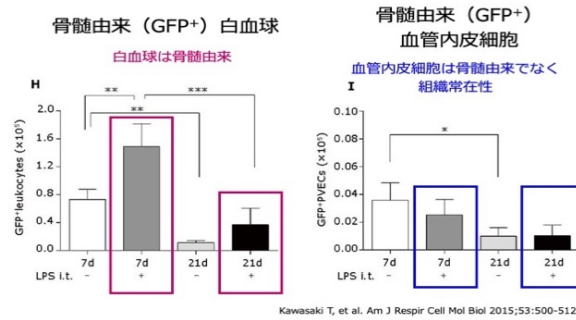


肺胞構造への外からの傷害は肺胞上皮細胞か血管内皮細胞が最表面に存在しているので、傷害の最初のターゲット細胞になっているはずである。血管内皮細胞の傷害に対しては修復反応が生じ血管内皮の再生が起こる。その時に内因性的の前駆細胞がその役割を担うのか、外因性（骨髄からと想定される）の前駆細胞促進因子が働くのか、さらにそれには免疫システムの監視が行われているはずである。血管内皮細胞の修復には、軽度の傷害に対しては組織常在性の血管内皮前駆細胞（EPCs）が、それを超える傷害に対しては骨髄由来細胞が動員されるという仮説を立てている。

LPS はグラム陰性桿菌の菌体成分であり、マウスモデルにおいて、軽度傷害時（ARDS を惹起しない程度）に血管内皮細胞数の減少が一過性に生じるが、同時に BrdU ないしは Ki67 で表される修復機転が作用している。その時、CD45 陰性である骨髄由来細胞でない CD31 陽性、Ki67 陽性の血管内皮細胞が修復期に増加していた。これは軽度の肺血管内皮細胞傷害の時には、骨髄由来細胞でなく組織常在性の血管内皮前駆細胞が修復に働いていることを意味している。



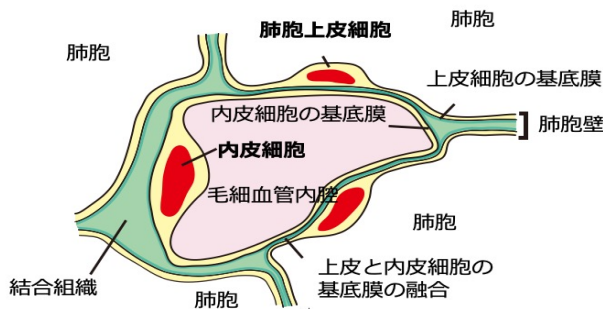
LPS投与後修復期の血管内皮前駆細胞は  
骨髄由来 (GFP+) でなく、組織常在性の可能性が高い



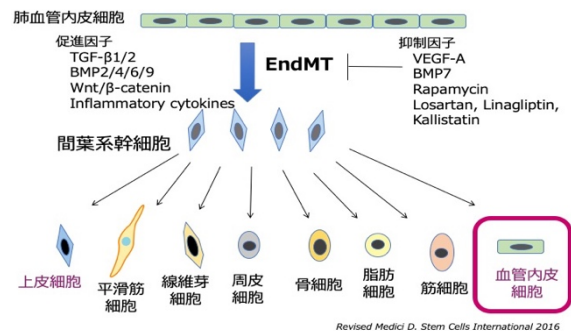
## 急性肺傷害における内皮間葉転換 (endothelial-mesenchymal transition/transformation : EndMT)

呼吸器疾患の成立を考えると、内因性の遺伝的素因 (疾患感受性遺伝子) がそれぞれの疾患成立のための必要条件である。その疾患感受性遺伝的素因の上に、何らかの外的刺激が加わり生体に対する傷害が生じる。外的刺激の呼吸器系への入り口は、気道上皮細胞/肺胞上皮細胞ないしは血管内皮細胞である可能性が高い。呼吸器疾患の分子病態を考える時、ミクロの構造において、上皮細胞と血管内皮細胞は基底膜を介して構造的に近接していることの認識が必要である。傷害が上皮細胞のみに限定、内皮細胞のみに限定するとは考えにくい。たとえ最初の傷害が上皮細胞/内皮細胞のどちらかに限定していたとしても、オートクライン/パラクライン機構などを介して、上皮細胞/内皮細胞の双方、さらには周辺の種々細胞群に傷害が及びうると考えられる。傷害に対する修復過程を考えてみると、上皮細胞障害に対して、内皮細胞由来の内皮間葉転換 (endothelial-mesenchymal transition/transformation : EndMT) を起こした細胞が修復機転に関与する可能性もある。

### 上皮細胞と内皮細胞は基底膜を介して近接



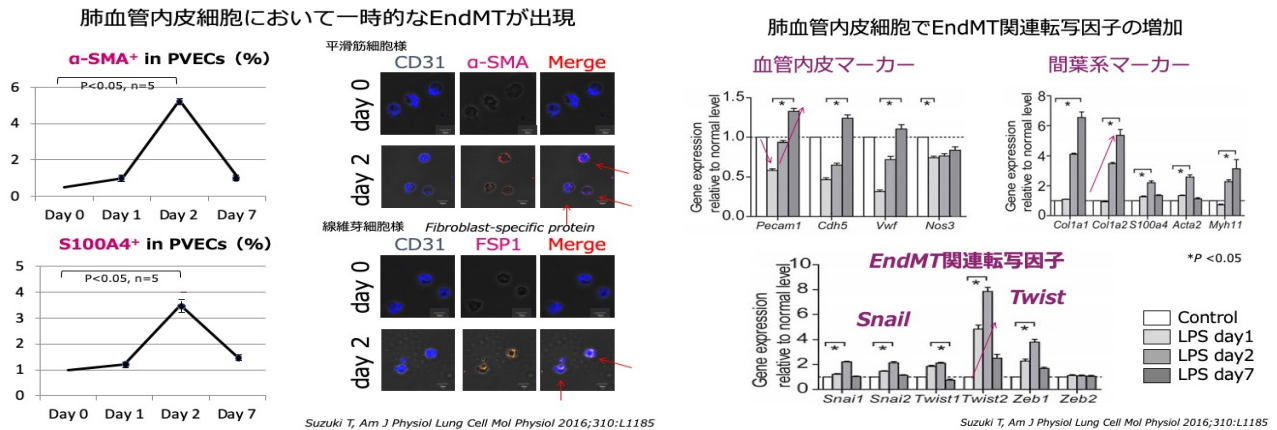
### EndMTは間葉系細胞へ、そして血管内皮細胞に修復



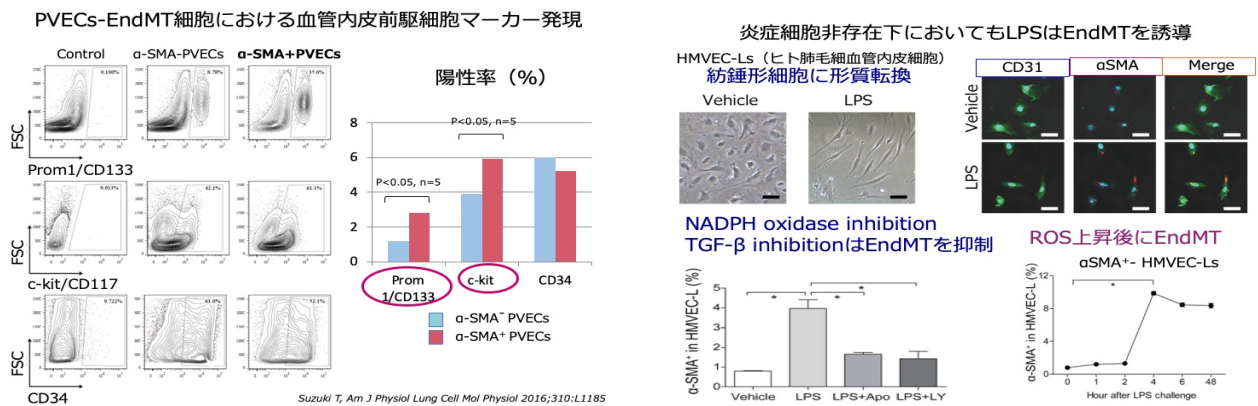
EndMT は、生体発生、がん、線維症を制御する基本的な細胞機序と考えられてきた。組織工学、再生医学の領域においては、幹細胞治療を支える概念とも考えられる。病態形成において生じている現象の分子機構の解明は、新規治療戦略としても有用と思われる。血管内皮細胞は EndMT を受けると、間葉系幹細胞様細胞に形質転換、そして多種類の細胞に分化すると想定されている (Medici D. Stem Cells Int 2016;2016:6962801)。肺線維症、COPD などの気道/肺胞系疾患のみでなく、肺高血圧症においても、組織障害に対する修復機転/再生には、血管内皮細胞を含む多種類の細胞が必要と考えられる。単一細胞の修復/増殖のみでは、いかなる病態も回復しない。

肺の上皮細胞、血管内皮細胞は、種々の病態において、そのままの細胞形態・機能でそこに留まることはなく、細胞の形態、機能を変化させる、すなわち形質転換が起こると考えられる。従来、上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition/transformation : EMT) は、生体の発達 (development) および種々の病態に関与するとされてきた。同様な細胞内シグナル、転写因子により、EndMT が、がんに関与した線維芽細胞、心臓弁の形成などに関与することが最初に報告されている。EMT、EndMT 共に細胞極性/細胞接合が失われ、静的でなく動的な細胞になる。EndMT と EMT は同じ転写因子 Snail, Slug, Twist, Zeb1, Zeb2 を共有することが知られており、EMT/EndMT 共に TGFβ1 依存性である。EMT は管腔形成に EndMT は血管形成に関与する。血管形成過程において内皮細胞は細胞接合を一端壊す形で隣接した内

皮細胞になりうる (partial EndoMT)、full EndoMT では間葉系細胞に形質転換しうる、この過程において細胞接合に関係する Notch シグナル経路が、partial と full EndoMT の過程に関与している可能性がある。これらは完全に確立された概念でないのは、細胞の追跡 (lineage-tracing analysis) が困難なためである (Welch-Reardon KM, et al. Anterioscler Thromb Vasc Biol 2015;35:30)。肺高血圧症、肺線維症などの呼吸器疾患の病態形成には、EndMT と EMT が重要な役割を果たしていると考えられる。



LPS 肺障害時には肺血管内皮細胞 (CD31 陽性) にαSMA ないしは S100A4 陽性の EndMT を起こした細胞が一過性に出現してくる。肺血管内皮細胞はそのまま修復しうるのではなく、一過性であるが EndMT という形質転換を起こして、間葉系マーカーも発現するような細胞に形質転換する。それらの細胞では Prom1/CD133 ないしは c-kit が陽性となり、血管内皮前駆細胞様に変化する。この in vivo における EndMT 反応は、炎症細胞が存在しない in vitro でも生じていた。In vitro においても、LPS 刺激を受けた血管内皮細胞は ROS 上昇後に形質転換 EndMT を起こしていた。

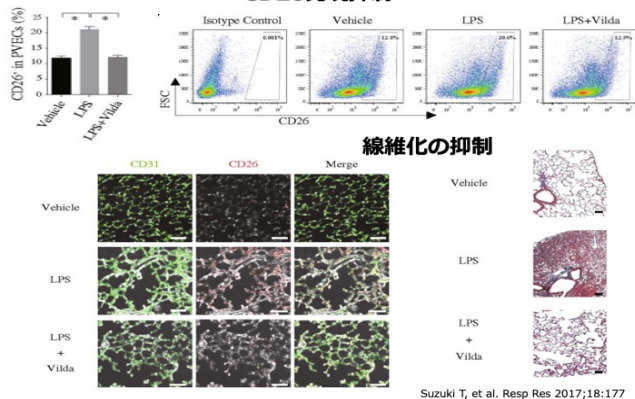


### 急性肺障害後の肺線維化に対する治療の試み

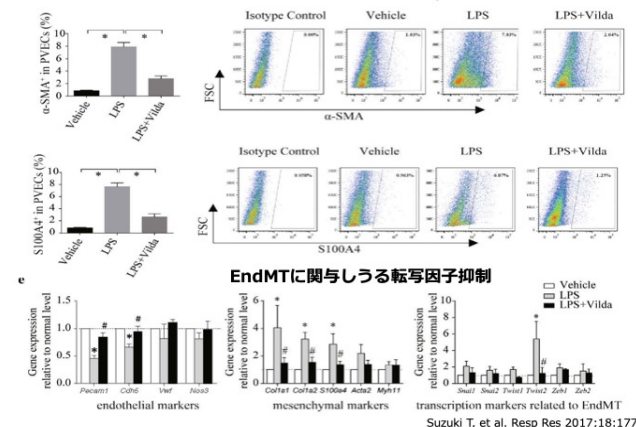
ARDS はその後遺症として肺の線維化を残すことが問題となっている。通常の特発性肺線維症もその進行抑制は抗線維化薬の登場によりある程度可能かもしれないが、Reverse することは困難である。急性肺障害後の肺線維症に対する治療戦略を模索している。CD26 分子は T 細胞表面抗原として報告されており、活性化された T 細胞にその発現が強く誘導されることから T 細胞活性化抗原として認識されている。CD26 KO マウスの供与および血中 sCD26 測定に関して、順天堂大学免疫病の森本幾夫教授の研究室と共同研究を遂行中である。

LPS 反復投与による肺の線維化組織では CD26 の発現が増強しており、vildagliptin (DPP-4 阻害薬) の投与により CD26 の発現抑制、また線維化抑制が認められた (Respir Res 2017;18:177)。その一つの機序として DPP-4 阻害薬による EndMT の抑制が関与していることが考えられた。

LPS反復投与による肺の線維化病変に対してDPP-4阻害薬投与  
CD26発現抑制



LPS反復投与による肺の線維化病変に対してDPP-4阻害薬投与  
EndMT抑制 (肺血管内皮細胞における $\alpha$ SMA, S100A4発現抑制)



【急性肺障害 原著論文】

- Ishizaki S, Kasuya Y, Kuroda F, Tanaka K, Tsuyusaki J, Yamauchi K, Matsunaga H, Iwamura C, Nakayama T, Tatsumi K. Role of CD69 in acute lung injury. *Life Sci* 2012;90:657-665.
- Tsushima K, Yokoyama T, Koizumi T, Kubi K, Tatsumi K. The concept study of recombinant human soluble thrombomodulin in patients with acute respiratory distress syndrome. *Int J Clin Med* 2013;4:488-495.
- Tsushima K, Yokoyama T, Matsumura T, Koizumi T, Kubo K, Tatsumi K, Acute Lung injury Group in Nagano. The potential efficacy of noninvasive ventilation with administration of a neutrophil elastase inhibitor for acute respiratory distress syndrome. *J Crit Care* 2014;29:420-425.
- Tsushima K, Yamaguchi K, Kono Y, Yokoyama T, Kubo K, Matsumura T, Ichimura Y, Abe M, Terada J, Tatsumi K. Thrombomodulin for acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis: A proof of concept study. *Pulm Pharmacol Ther* 2014;29:233-40.
- Nishimura R, Kawasaki T, Sekine A, Suda R, Urushibara T, Suzuki T, Takayanagi S, Terada J, Sakao S, Tatsumi K. Hypoxia-induced proliferation of tissue-resident endothelial progenitor cells in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2015;308:L746-58.
- Kawasaki T, Nishiwaki T, Sekine A, Nishimura R, Suda R, Urushibara T, Suzuki T, Takayanagi S, Terada J, Sakao S, Tatsumi K. Vascular repair by tissue-resident endothelial progenitor cells in endotoxin-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2015;53:500-512.
- Abe M, Tsushima K, Matsumura T, Ishiwata T, Ichimura Y, Ikari J, Terada J, Tada Y, Sakao S, Tanabe N, Tatsumi K. Efficacy of thrombomodulin for acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis and nonspecific interstitial pneumonia: a nonrandomized prospective study. *Drug Des Devel Ther* 2015;9:5755-5762.
- Suzuki T, Tada Y, Nishimura R, Kawasaki T, Sekine A, Urushibara T, Kato F, Kinoshita T, Ikari J, West JD, Tatsumi K. Endothelial-to-mesenchymal transition in lipopolysaccharide-induced acute lung injury drives a progenitor cell-like phenotype. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2016;310:L1185-L1198.
- Ichimura Y, Tsushima K, Matsumura T, Abe M, Tatsumi K. Thrombomodulin for acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis. *Chron Obstruct Pulmon Dis* 2017;2;24.
- Tasaka S, Tatsumi K, Assembly of Pulmonary Circulation and Lung Injury, the Japanese Respiratory Society. Clinical practice of acute respiratory distress syndrome in Japan: A nationwide survey and scientific evidences. *Respir Investig* 2017;55;257-263.

11. Suzuki T, Tada Y, Gladson S, Nishimura R, Shimomura I, Karasawa S, Tatsumi K, West J. Vildagliptin ameliorates pulmonary fibrosis in lipopolysaccharide-induced lung injury by inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition. *Respir Res* 2017;18:177.
12. Umezawa H, Naito Y, Tanaka K, Yoshioka K, Suzuki K, Sudo T, Hagihara M, Hatano M, Tatsumi K, Kasuya Y. Genetic and pharmacological inhibition of p38 $\alpha$  improves locomotor recovery after spinal cord injury. *Front Pharmacol* 2017;8:72.
13. Kawasaki T, Chen W, Htwe YM, Tatsumi K, Dudek SM. DPP4 inhibition by sitagliptin attenuates LPS-induced lung injury in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2018;315:L834-845.
14. Nishiyama A, Kawata N, Yokota H, Sugiura T, Matsumura Y, Higashide T, Horikoshi T, Oda S, Tatsumi K, Uno T. A predictive factor for patients with acute respiratory distress syndrome: CT lung volumetry of the well-aerated region as an automated method. *Eur J Radiol* 2019;122:108748.

#### **【急性肺障害 総説】**

1. Tsushima K, Tatsumi K. Noninvasive mechanical ventilation and neutrophil elastase inhibitor: A new potential approaching to acute hypoxemic failure. *J Crit Care* 2014; 29:1124-5.