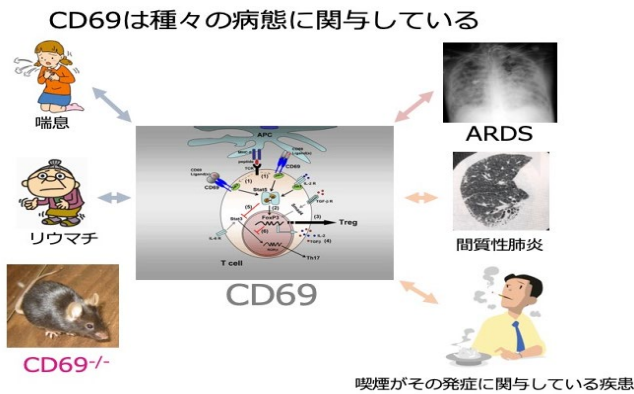


急性肺障害の発症機序・修復機転に関する研究

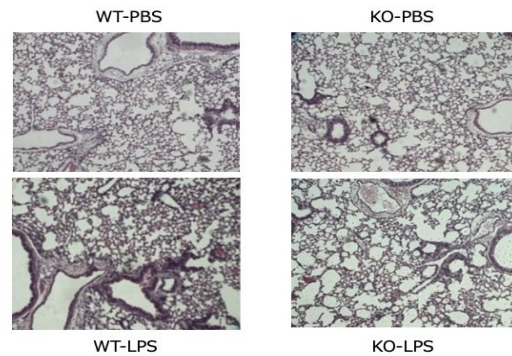
急性肺障害は臨床的にはARDSとして認識されている。急性肺障害の発症要因は菌血症を含み多彩であるが、肺傷害因子が肺血管内皮細胞傷害を惹起、血管透過性亢進型肺水腫病態を呈する。肺血管内皮細胞障害という観点では肺高血圧症と共通しており、肺血管床がその病態成立の舞台となっている。肺構造の改変が進展するとこの病態を元に修復させる有効な治療方法は現時点では確立されていない。急性肺障害とは何なのか、その病態の修飾因子は何なのか、細胞レベル・物質レベル・遺伝子レベルで何が惹起されているのかを探求する必要がある。

急性肺障害におけるCD69

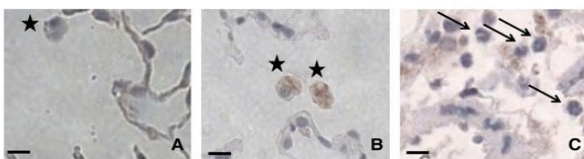
CD69は、活性化T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞(NK細胞)など多くの炎症細胞表面に発現しているCD分子のひとつである。CD69はシグナル伝達で機能するレセプターとして、リンパ球の増殖とその機能に関与していることから、免疫系がその病態に関与している多くの呼吸器疾患で何らかの役割を果たしているはずである。CD69KoマウスではLPSによる肺の好中球浸潤、MPO量、KCおよびMIP2などのサイトカイン・ケモカインの増加が抑制されていた。免疫蛍光染色では、LPSによるCD69の発現誘導は肺マクロファージに限局しており、それに伴いKCおよびMIP2の発現を認めた。マクロファージ上のCD69はLPS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



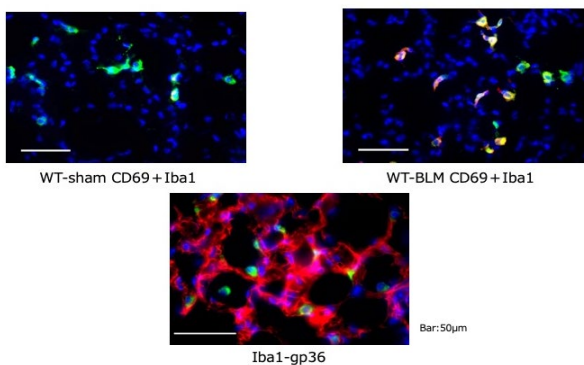
LPSによる急性肺傷害



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

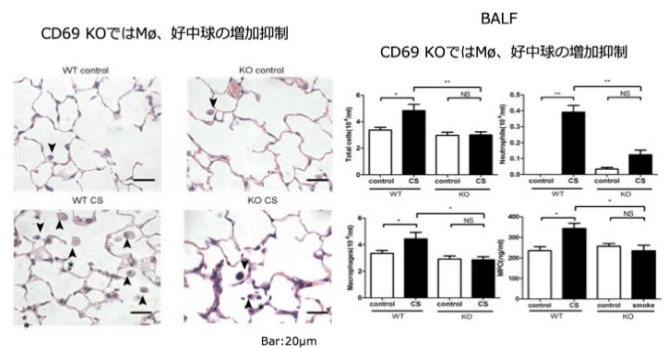
Ishizaki S, et al. Life Sci 2012;90:657-665.

BLM肺線維症モデル：肺マクロファージにおけるCD69の発現



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

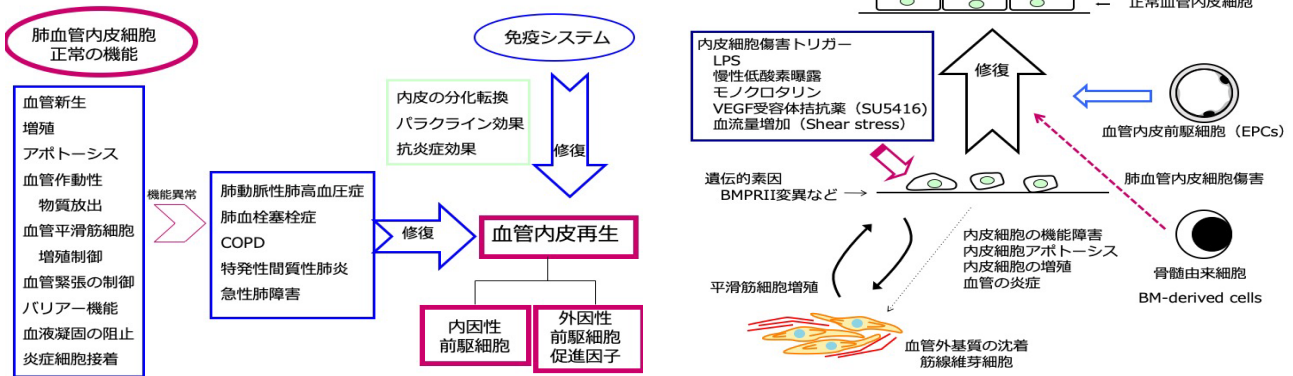
CD69欠損マウスにおける喫煙曝露による肺炎症の抑制



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

急性肺傷害における肺血管内皮細胞傷害とその修復

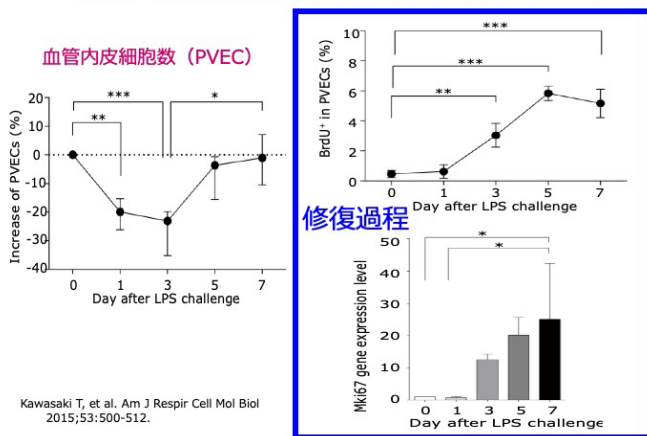
呼吸器疾患はすべて肺障害の結果として生じている。何らかの遺伝的素因を有している個体に傷害が加わり、傷害に対する生体防御反応を超えた反応が生じた場合、表現型は多彩となるが、広義に考えると肺障害が生じる。最初に傷害を受ける細胞は気道上皮・肺胞上皮・血管内皮など種々である。何らかの機能異常・形態障害が生じた時、生体には必ず修復反応が生じているはずである。何らかの病態成立は、その修復反応を超える反応が生じた場合である。健常人は、軽度の傷害に対する修復反応が常に適切に生じることにより、健常を維持していると考えられる。



肺胞構造への外からの傷害は肺胞上皮細胞が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。

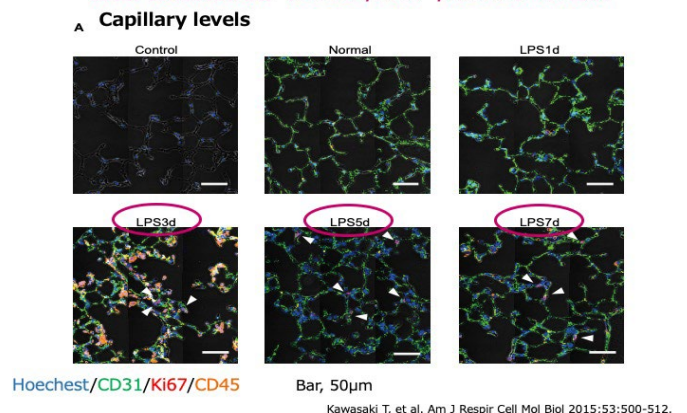
LPS はグラム陰性桿菌の菌体成分であり、マウスモデルにおいて、軽度傷害時（ARDS を惹起しない程度）に血管内皮細胞数の減少が一過性に生じるが、同時に BrdU ないしは Ki67 で表される修復機転が作用している。その時、CD45 陰性である骨髄由来細胞でない CD31 陽性、Ki67 陽性の血管内皮細胞が修復期に増加していた。これは軽度の肺血管内皮細胞傷害の時には、骨髄由来細胞でなく組織常在性の血管内皮前駆細胞が修復に働いていることを意味している（Am J Respir Cell Mol Biol 2015;53:500-512）。

LPS投与により血管内皮細胞数（PVEC）減少
BrdU、Ki67陽性細胞増加（修復過程は働いている）

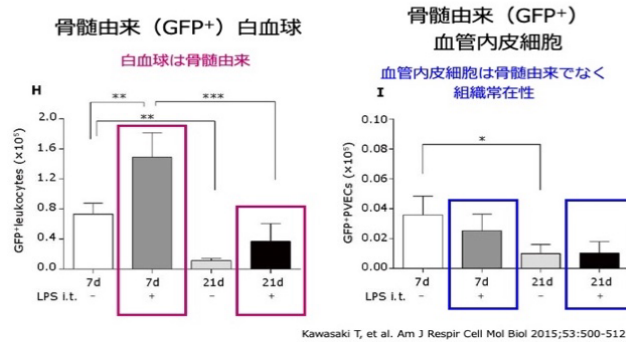


Kawasaki T, et al. Am J Respir Cell Mol Biol 2015;53:500-512.

LPS投与による肺血管内皮細胞傷害後の修復期には、
血管内皮前駆細胞（CD31+/Ki67+/CD45-）が増加



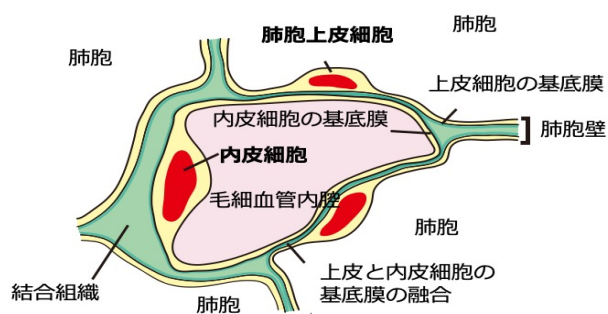
LPS投与後修復期の血管内皮前駆細胞は
骨髄由来 (GFP+) でなく、組織常在性の可能性が高い



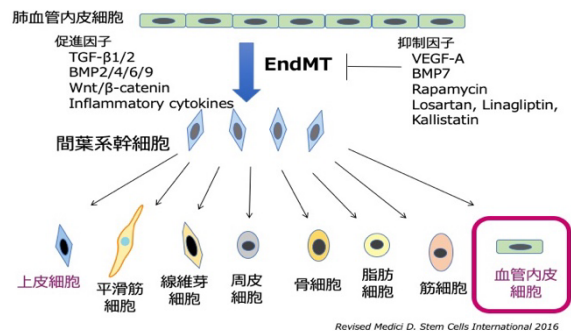
急性肺傷害における内皮間葉転換 (endothelial-mesenchymal transition/transformation : EndMT)

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



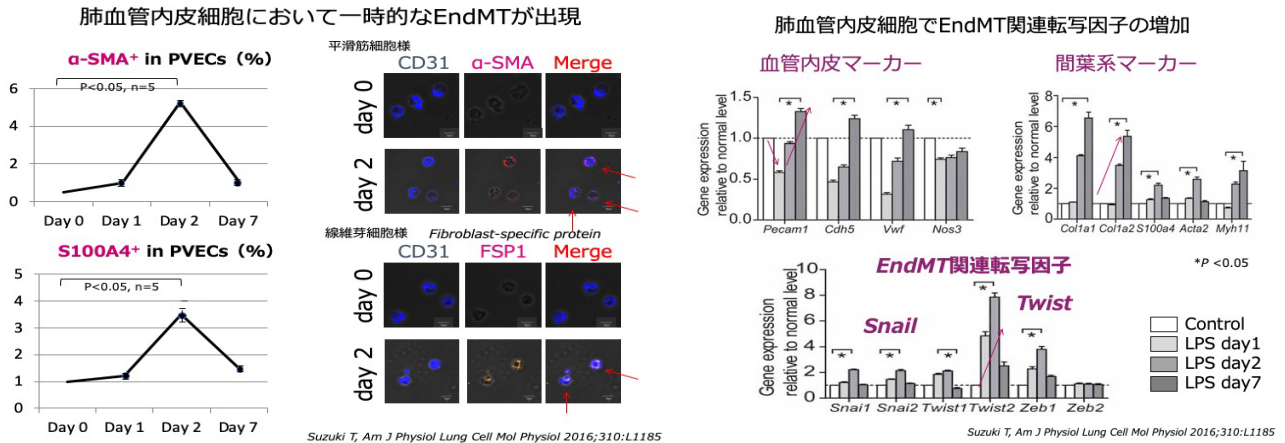
EndMTは間葉系細胞へ、そして血管内皮細胞に修復



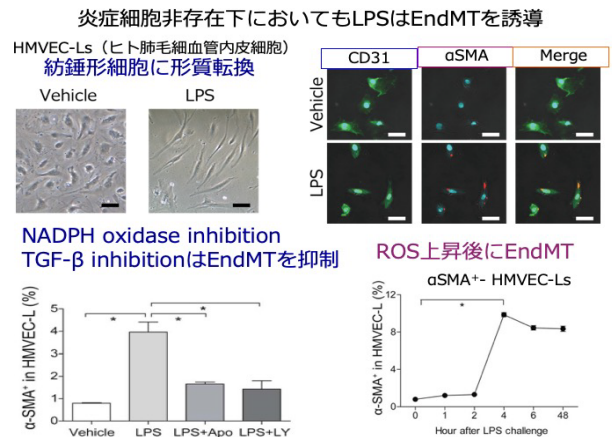
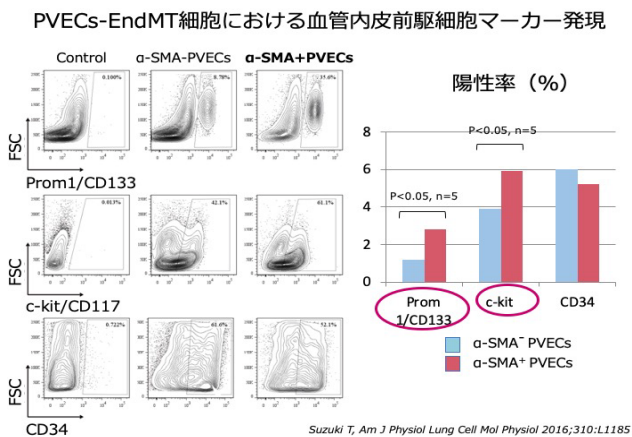
EndMT は、生体発生、がん、線維症を制御する基本的な細胞機序と考えられてきた。組織工学、再生医学の領域においては、幹細胞治療を支える概念とも考えられる。病態形成において生じている現象の分子機構の解明は、新規治療戦略としても有用と思われる。血管内皮細胞は EndMT を受けると、間葉系幹細胞様細胞に形質転換、そして多種類の細胞に分化しうると想定されている (Medici D. Stem Cells Int 2016;2016:6962801)。肺線維症、COPD などの気道/肺胞系疾患のみでなく、肺高血圧症においても、組織障害に対する修復機転/再生には、血管内皮細胞を含む多種類の細胞が必要と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

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しうるとされてきた。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しう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 TGFβ 1 依存性である。EMT は管腔形成に EndMT は血管形成に関与しう。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. *Arterioscler 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。

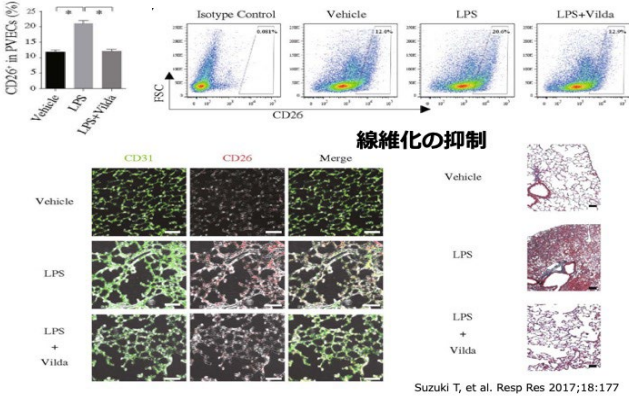


肺血管内皮細胞障害における CD26/DPP4

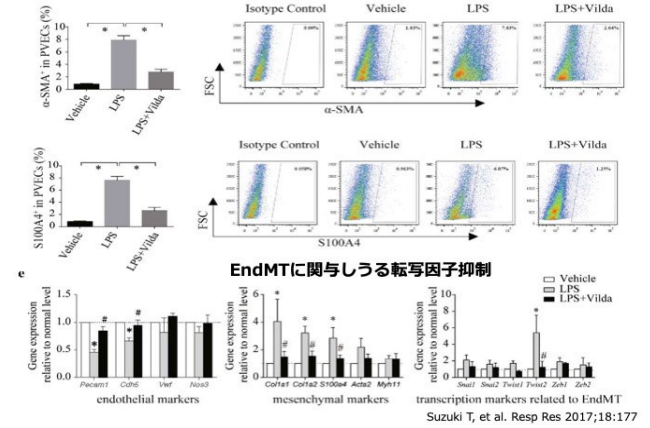
ARDS はその後遺症として肺の線維化を残すことが問題となっている。特発性肺線維症ではその進行抑制は抗線維化薬の登場によりある程度可能になっている。急性肺障害後の肺の線維化病態は、特発性肺線維症とは異なり、それに対する治療方策が必要になる。CD26 分子は T 細胞表面抗原として報告されており、活性化された T 細胞にその発現が強く誘導されることから T 細胞活性化抗原として認識されている。CD26 KO マウスの供与および血中 sCD26 測定に関して、順天堂大学免疫病学の森本幾夫教授の研究室と共同研究を遂行した。

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**

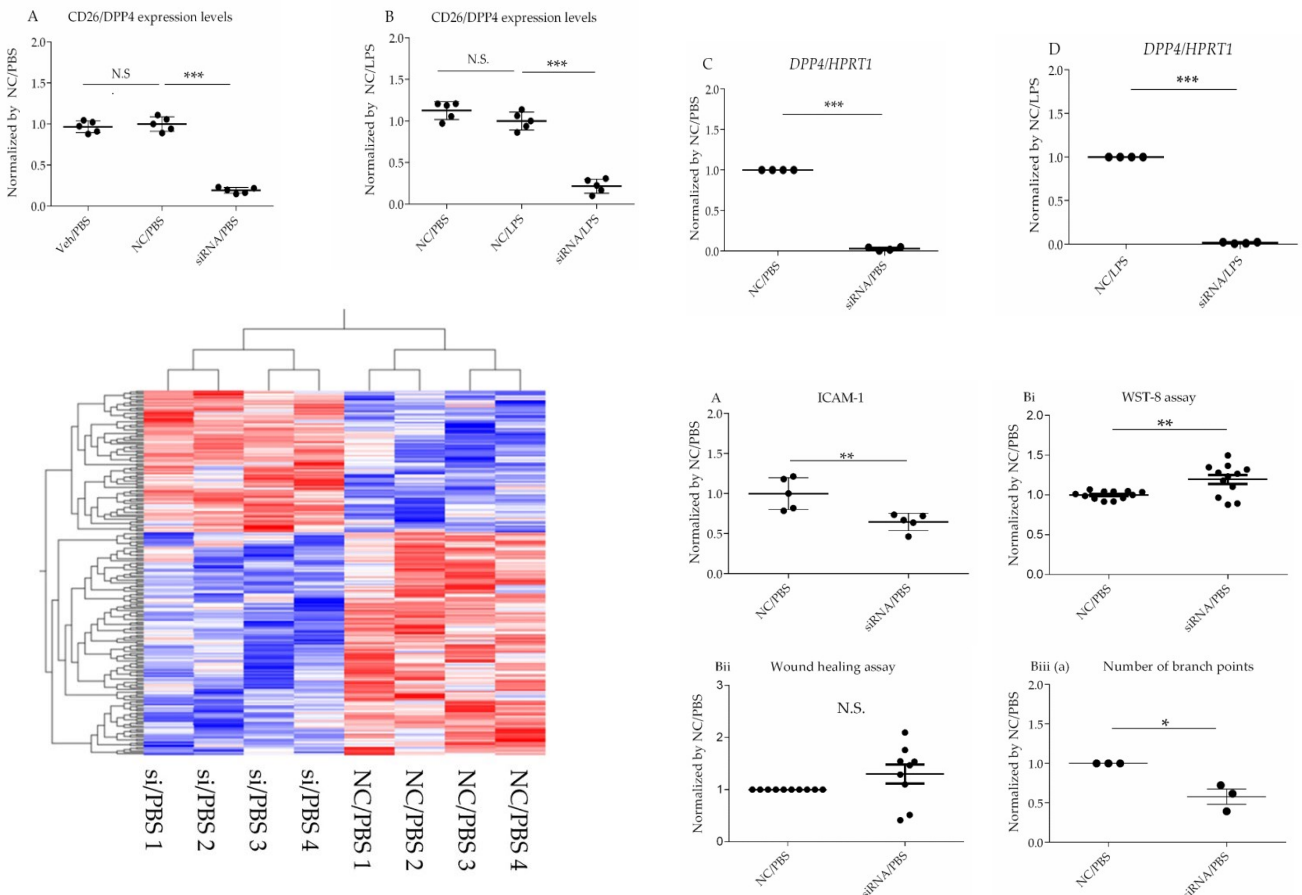


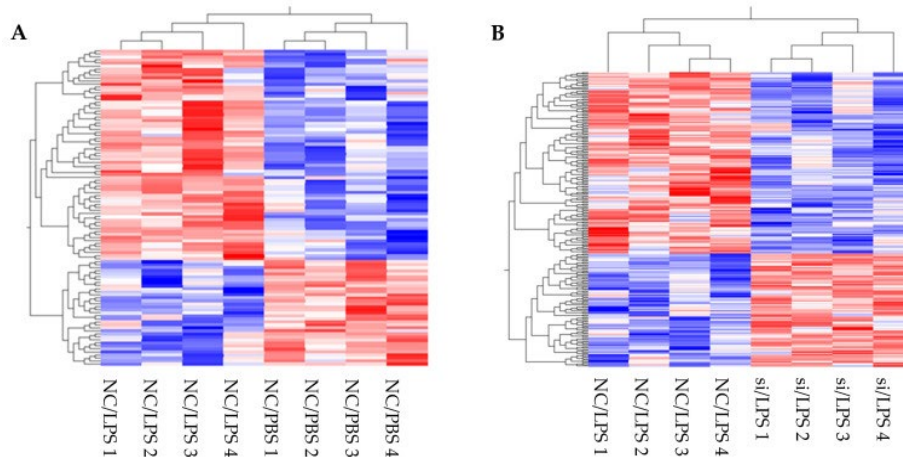
**LPS反復投与による肺の線維化病変に対してDPP-4阻害薬投与
EndMT抑制 (肺血管内皮細胞におけるαSMA, S100A4発現抑制)**



肺血管内皮細胞障害における CD26/DPP4

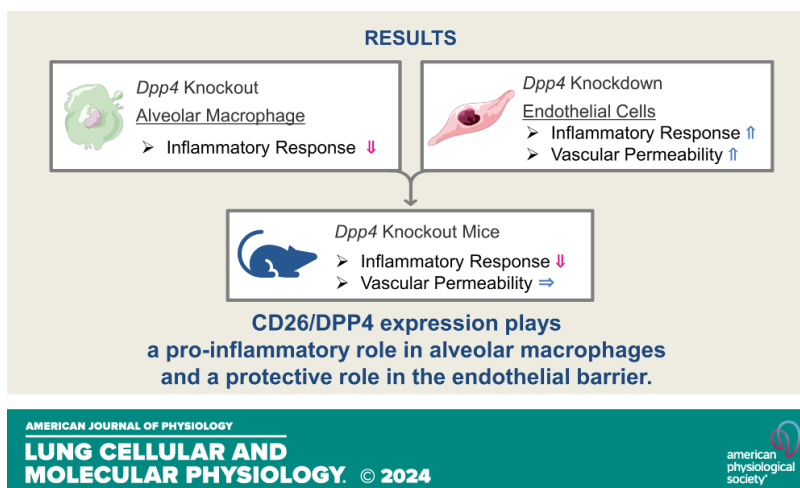
ARDS の発症原因は過剰な炎症とも言える。CD26/DPP4 は多方面の作用を有しており、いろいろな細胞の細胞膜に存在している蛋白である。マウスにおける LPS 誘導性肺傷害およびヒト微小肺血管内皮細胞において、CD26/DPP4 阻害は抗炎症作用を発揮する。しかし CD26/DPP4 阻害の作用機序は明らかになっていない。そこで CD26 siRNA を用いて肺血管内皮細胞における CD26/DPP4 の機能低下を惹起し、その状態で LPS 刺激による肺血管内皮細胞における CD26/DPP4 阻害の作用機序を、トランスクリプトーム解析により探索した。CD26/DPP4 機能は、炎症、粘膜防御機能、再生機能に関する RNA 発現の変化に反映されていることが示された。RNA 発現の変化を PCR, ELISA, flow cytometry, dextran permeability assay, WST-8 assay, wound healing assay, tube formation assay で確認した。CD26/DPP4 機能は肺血管内皮細胞傷害に関与する多方面の機能に影響しており、肺血管傷害を含む炎症性肺疾患の新規治療目標になりうることを示された (Cells 2021;10:3508)。





LPS 誘発肺傷害における CD26/DPP4 の機能的役割

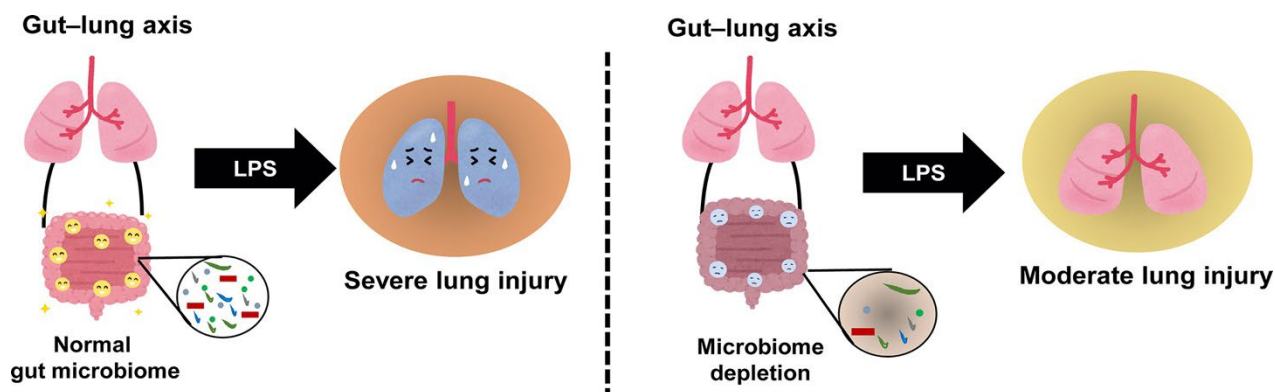
The Roles of CD26/DPP4 in Lipopolysaccharide-induced Lung Injury



難治性呼吸器疾患の一つである急性呼吸窮迫症候群 ARDS における CD26/Dipeptidyl peptidase-4 (DPP4) の役割を探索した。ARDS 病態の特徴は過剰な炎症および肺微小血管の透過性の亢進である。CD26/DPP4 は、多種細胞の表面に発現し多機能を有する II 型膜たんぱく質である。われわれは以前 DPP4 阻害薬であるシタグリプチンの投与がマウスにおける LPS 誘発肺傷害を軽減することを報告した。本研究では、マウス、単離された肺泡マクロファージ、および培養された肺微小血管内皮細胞を用いて、LPS 誘発肺傷害における CD26/DPP4 発現の機能的役割を解明した。LPS 誘発肺傷害において、Dpp4 ノックアウト (Dpp4 KO) マウスでは炎症反応(気管支肺泡洗浄液 BALF 中の好中球数および炎症性サイトカインレベル)が低下していた。しかし、肺微小血管の透過性を解析した結果、Dpp4 KO マウスと野生型マウスの間で違いは認められなかった。Dpp4 KO マウスから単離された肺泡マクロファージでは、LPS 刺激による TNF- α および IL-6 の産生が抑制されていた。対照的に、siRNA 投与により CD26/DPP4 発現を抑制したマウス肺微小血管内皮細胞 (MLMVECs) では、LPS 刺激による ICAM-1 および IL-6 の発現が増加していた。さらに、Dpp4 siRNA を投与された MLMVECs は、LPS 刺激により肺血管細胞単層の透過性が亢進していたため、CD26/DPP4 が内皮バリア機能の防御的役割を果たすことが示唆された。本研究は、Dpp4 の遺伝子欠損がマウスにおいて LPS 誘発肺傷害における炎症反応を軽減することを示したが、透過性亢進は軽減されませんでした。これらのことは、肺の構成細胞によって CD26/DPP4 が異なる機能的役割を持つ可能性を示唆しています。CD26/DPP4 は ARDS の潜在的な治療標的であり、CD26/DPP4 が有する ARDS の病態に関連する多様な役割をさらに探索する必要がある (Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2024;326:L562-L573.)。

急性肺障害と腸内細菌

抗生剤カクテルを投与して腸内細菌を死滅させた8週齢のC57/BL6にLPS (lipopolysaccharide) を気管内投与して作成したLPS誘発性急性肺障害モデルを作成、糞便中の腸内細菌叢の構成、消化管内の腸内細菌によって産生される代謝物である短鎖脂肪酸との関連を、血液のメタボローム解析等にて検討した。飲用水に抗生剤（アンピシリン 1g/L、ネオマイシン 1g/L、メトロニダゾール 1g/L）を溶解した抗生剤カクテル（ABX）を14日間投与し、Day 15にLPS（5 mg/kg）を気管内投与した。LPS投与24時間後に糞便を採取し、その後血液サンプルや気管支肺胞洗浄液などの各種検体を採取した。評価項目は気管支肺胞洗浄液、肺組織病理、糞便中の腸内細菌・短鎖脂肪酸の構成、血液サンプル中の代謝物とした。Vehicle + LPS群とABX + LPS群において、肺病理のHE染色における肺障害スコア、気管支肺胞洗浄液の細胞数・総タンパク量・LDH活性・IL-6において有意差を認め、ABXによる腸内細菌の死滅が肺障害を有意に抑制することが示唆された。また、腸内細菌の α 多様性、 β 多様性においてもVehicle + LPS群とABX + LPS群で有意差を認め、いくつかのSCFAsにおいても有意差を認めた。KEGG解析において、LPSとABXがいくつかの炎症性経路で関連を認めた。Vehicle + LPS群とABX + LPS群で一部の腸内細菌と血漿中の代謝物で関連を認めた。BALF中のIL-6と一部の腸内細菌、代謝物で関連を認めた。抗生剤カクテルによって腸内細菌を死滅させることで、腸肺相関を介してLPS誘発性急性肺障害が抑制される可能性が示唆された（Life Sci 2022;307:120885）。



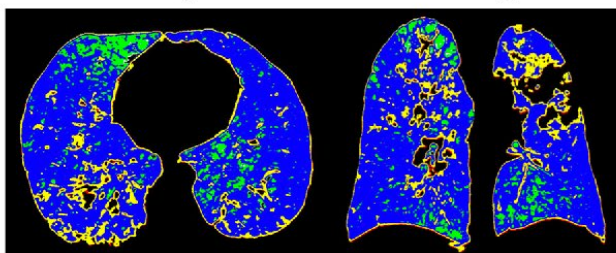
ARDS 換気良好領域に注目した予後との関係

ARDSの胸部画像においては透過性亢進型肺水腫部分が注目されている。しかし、胸部画像の黒い部分、すなわち換気が比較的維持されていると推定される領域には注目されていない。そこで含気が保たれている領域をCTで評価して、ARDS患者予後との関係を検討した。ARDSにおいて含気良好部分の体積はARDS患者の予後と関係していた（Eur J Radiol. 2020;122:108748）。

A: 28-day survivor

A1: Axial image

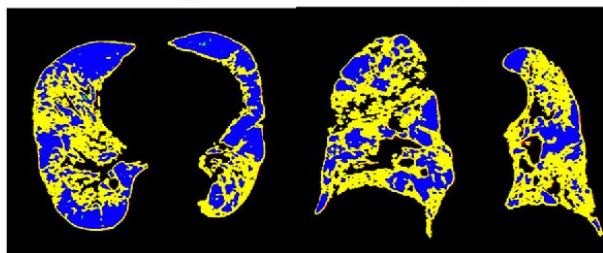
A2: Coronal image



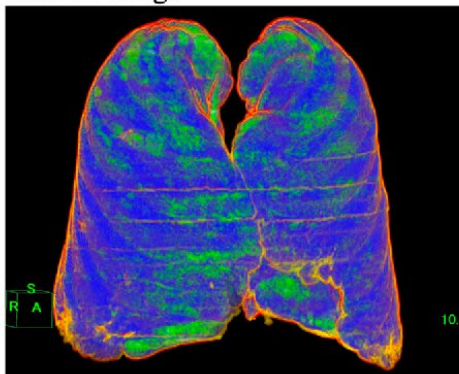
B: 28-day non-survivor

B1: Axial image

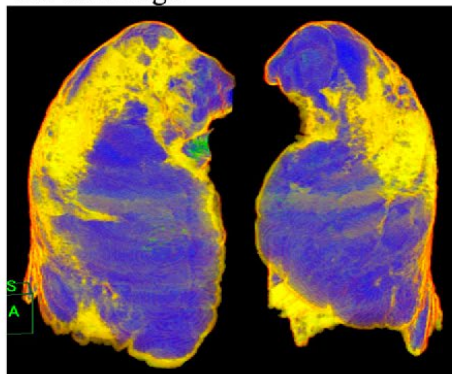
B2: Coronal image



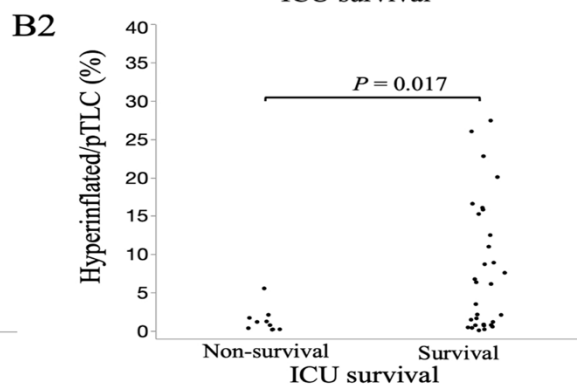
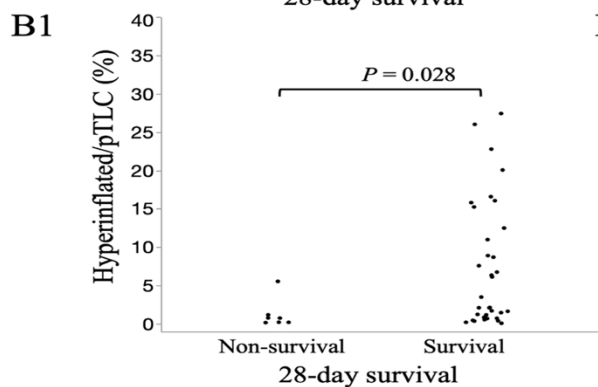
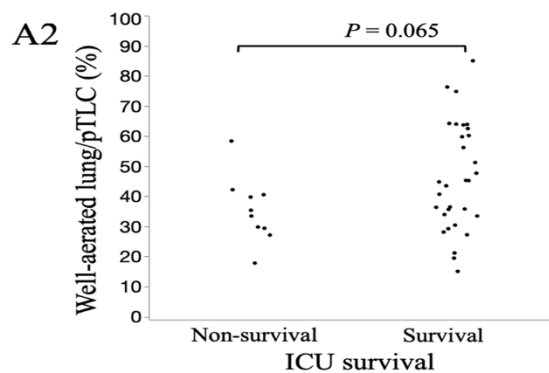
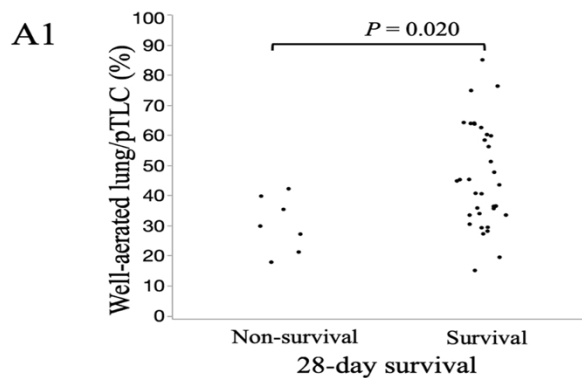
A3: 3D image



B3: 3D image



CT イメージで緑色は過膨張領域、青が換気良好領域、黄色が換気低下領域、赤が換気のない領域



肺全体に占める換気良好領域および過膨張領域は 28 日生存率で有意に高値であった

【急性肺障害】

1. Ishizaki S, Kasuya Y, Kuroda F, Tanaka K, Tsuyusaki J, Yamauchi K, Matsunaga H, Iwamura C, Nakayama T, Tastumi K. Role of CD69 in acute lung injury. Life Sci 2012;90:657-665.

2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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 α 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.
15. Meliton LN, Zhu X, Brown M, Epshtein Y, Kawasaki T, Letsiou E, Dudek SM. Degradation of group V secretory phospholipase A2 in lung endothelium is mediated by autophagy. *Microvasc Res* 2020;129:103954.
16. Takahashi Y, Kawasaki T, Sato H, Hasegawa Y, Dudek S.M, Ohara O, Tatsumi K, Suzuki T. Functional roles for CD26/DPP4 in mediating inflammatory responses of pulmonary vascular endothelial cells. *Cells* 2021;10:3508.

17. Hashimoto Y, Eguchi A, Wei Y, Shinno-Hashimoto H, Fujita Y, Ishima T, Chang L, Mori C, Suzuki T, Hashimoto K. Antibiotic-induced microbiome depletion improves LPS-induced acute lung injury via gut-lung axis. *Life Sci* 2022;307:120885.
18. Sato S, Kawasaki T, Hatano R, Koyanagi Y, Takahashi Y, Ohnuma K, Morimoto C, Dudek SM, Tatsumi K, Suzuki T. Functional roles of CD26/DPP4 in lipopolysaccharide-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2024;326:L562-L573.

(2024.9.24 巽浩一郎)

