

学 位 論 文 の 要 約

三 重 大 学

所 属	三重大学大学院医学系研究科 甲 生命医科学専攻 病態制御医学講座 呼吸器内科学分野	氏 名	内藤 雅大
-----	---	-----	-------

主論文の題名

Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor Protects against Acute Lung Injury by Inhibiting the Complement System

(Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor は補体系を阻害することにより急性肺障害を軽減する)

Masahiro Naito, Osamu Taguchi, Tetsu Kobayashi, Takehiro Takagi, Corina N. D'Alessandro-Gabazza, Yuki Matsushima, Daniel Boveda Ruiz, Paloma Gil-Bernabe, Takahiro Matsumoto, Ayshwarya-Lakshmi Chelakkot Govindalayathil, Masaaki Toda, Atsushi Yasukawa, Osamu Hataji, John Morser, Yoshiyuki Takei, Esteban C. Gabazza

AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY
Vol 49, Iss. 4, pp 646 - 653, Oct 2013

主論文の要約

序

急性肺障害は、重度の低酸素血症を引き起こす死亡率が約 24～48%の重篤な疾患である。しかし、現時点で急性肺障害に対する有効な治療法は無く、急性肺障害の臨床的な予後を改善させる新たな薬の開発が待たれている。肺障害の病因は、肺胞と間質における凝固系の促進と線溶系の抑制に関連しているとされている。気道における凝固系の亢進は、生理的な状況の中では、局所の出血の制御、損傷した組織の修復において重要な役割を担っているが、過剰な凝固系の亢進は、気道の炎症、リモデリング、線維化の原因となる。急性肺障害においても、炎症によって誘発される過剰な凝固系の亢進はさらに炎症を増悪させることが知られている。

TAFI (thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor) は、主に肝臓で合成されるカルボキシペプチダーゼであり、不活性化した酵素前駆体として血流を循環する。TAFI は、トロンビンとトロン

ボモジュリンの複合体によって活性化され、活性化した TAFI は、フィブリンからリジン残基を分解し、組織型プラスミノゲンアクチベーターによるプラスミノゲンからプラスミンへの活性化を阻害することで、線溶系を抑制する作用を有している。さらに、活性化した TAFI には、炎症促進作用を持つ補体因子 C3a と C5a、オステオポンチンを不活性化することによる抗炎症作用があると報告されている。

今回われわれは、TAFI は補体因子 C5a を不活性化することによって、急性肺障害を抑制する役割があるとの仮説を立て、TAFI 遺伝子欠損マウスを用いて研究を施行した。

方法

8 週齢のオス TAFI 遺伝子欠損マウス(C57BL/6 background)と野生型マウス(C57BL/6)に大腸菌リポポリサッカライド(LPS)を経気管投与し急性肺障害を誘導し、24 時間後、肺胞洗浄液、血漿、肺組織を採取した。肺組織は切片を組織染色(H&E)、一部は破碎分解し、各種タンパク質の ELISA 法による定量に用い、一部は RNA 抽出後、RT-PCR に用いた。

C5a 受容体阻害剤の投与に当たっては、LPS を投与する 24 時間前にマウス 1 頭当たり 1mg の阻害剤を自動噴霧器を用いて吸入させた。

結果

低濃度(50 または 100 μg)の LPS 投与では補体系の活性化を誘導しないことが文献的に報告されていたので、まず、野生型マウスに高用量の LPS (100, 150, 200 μg) を経気管投与し、6 時間後と 24 時間後に肺胞洗浄液中の総細胞数、好中球数、肺組織中の C5a、Factor D 濃度を調べた。LPS 投与 6 時間後では、肺組織の C5a、Factor D は、LPS150 μg 投与群と 200 μg 投与群においてコントロール群と比較して有意に高値を示した。LPS 投与 24 時間後では、100, 150, 200 μg LPS 投与群においてこれらの値がすべて有意に増加することが認められたので、以後の実験では 150 μg の LPS を用いて補体系の活性化を伴う肺障害モデルを用いた。

急性肺障害における TAFI の役割を明らかにするため、TAFI 遺伝子欠損マウスと野生型マウスに LPS 150 μg を経気管投与することによって急性肺障害を誘発し、投与 24 時間後に肺胞洗浄液、血漿、肺組織を採取した。対照群には生理食塩水を投与した。

野生型マウスでは肺胞洗浄液中の総細胞数、好中球数、肺組織中の C5a、Factor D は、LPS 投与群において生理食塩水群と比較して有意な増加がみられた。LPS 処理 TAFI 遺伝子欠損マウスでは肺胞洗浄液中の総細胞数、好中球数が、LPS 処理野生型マウスと比較して有意に高値であった。肺胞洗浄液中の炎症性サイトカイン(IL-6、IL-1 β 、TNF- α)も TAFI 遺伝子欠損マウスで有意に高値であった。血漿中の IL-6 の値は、野生型マウスでは生理食塩水投与群と LPS 投与群の間に有意な差を認めなかったが、TAFI 遺伝子欠損マウスでは LPS 投与による有意な増加が認められた。また、肺胞洗浄液、血漿中の C5a 濃度は、TAFI 遺伝子欠損マウスにおいて野生型に較べ有意な高値が認められた。炎症による毛細血管の透過性亢進の指標である肺胞洗浄液中の総タンパク量も、LPS 処理野生型マウスと比較して LPS 処理 TAFI 遺伝子欠損マウスが有意に高値を示した。肺組織(H&E 染色)における染色細胞の定量解析では、LPS

処理野生型マウスと比較して LPS 処理 TAFI 遺伝子欠損マウスにおいてが有意に高値を示した。一方、凝固線溶系の指標である肺胞洗浄液中の TAT (Thrombin-antithrombin complex)、フィブリン分解産物 D-dimer、肺組織中の TAT 濃度は、野生型マウスと TAFI 遺伝子欠損マウスの間に、有意な差は認められなかった。血漿、肺胞洗浄液、肺組織の PAI-1(Plasminogen Activator Inhibitor-1)は、野生型マウスと比較して TAFI 遺伝子欠損マウスが有意に高値を示した。この結果は、線溶系の変動によるものではなく、TAFI が欠損したことによりプラスミンへの活性化が阻害された結果によると考えられた。以上により、TAFI 遺伝子欠損マウスにおいて野生型マウスと較べて急性肺障害の有意な増悪を認め、そこには凝固線溶系ではなく補体系の活性化が関与している可能性が示された。

さらに、急性肺障害の増悪における補体系、特に補体因子 C5a の役割を評価するために、マウスを C5a 受容体阻害薬の効果調べた。はじめに、試験管内でマウス肺上皮細胞 y LA-4 に対する蛍光標識 C5a の結合阻害を確認し、次にマウスを用いて C5a 受容体阻害剤の吸入処理が蛍光標識 C5a の組織への吸着を阻害することを組織切片の蛍光顕微鏡観察によって確認した。TAFI 遺伝子欠損マウスを用いて、C5a の受容体への結合を十分に阻害できる濃度(1mg/mouse)の C5a 受容体阻害剤で前処理した後 LPS による急性肺障害を誘発したところ、肺組織中の炎症性サイトカイン、ケモカイン(IL-6、IL-18、MCP-1)発現の低下、肺組織(H&E 染色)における染色細胞の減少を認め、C5a 受容体阻害薬は TAFI 遺伝子欠損マウスにおける肺障害の増悪を改善することが明らかとなった。同じ処理では野生型マウスにおいて C5a 受容体阻害剤の有意な効果は認められなかったが、阻害薬を頻回処理(1mg/mouse x 4 回)すると野生型マウスにおいても肺障害の各指標の値に改善が認められた。これらの結果から、TAFI 遺伝子欠損マウスでは C5a の活性が高く、急性肺障害を増悪させることが示された。

考察

補体系は自然免疫系の主要な液性因子として病原体に対する防御機構として重要な役割を担っているが、過剰な亢進状態は炎症性疾患の増悪に関与していると考えられる。急性肺障害では補体因子の増加が障害の予後に関係するとの報告がある。C5a は血管内皮細胞、平滑筋細胞を活性化し、種々の炎症性細胞の遊走・活性化を促すことによって炎症反応を促進すると考えられている。TAFI は補体因子 C5a のカルボキシル末端のアルギニン残基を切断することによって C5a を不活化し抗炎症効果を示す。本実験では TAFI 遺伝子欠損マウスを用いて TAFI が補体因子である C5a の活性を負に制御することによって、急性肺障害の増悪を抑制する役割を担っていることが示された。

急性肺障害の発症には C5a 以外にもさまざまな要因が考えられる。今回の研究でも、C5a 受容体阻害剤投与によって炎症の改善は認められたが、炎症を完全に抑制することはできなかった。急性肺障害では凝固系が亢進し、組織因子・トロンビンなどの増加が報告されている。トロンビンはその受容体を介して血管内皮細胞、気道上皮細胞を活性化し炎症性サイトカインを誘導するとともに、好中球・T 細胞などの炎症性細胞を活性化することによって炎症を促進する。また、LPS 誘導肺障害モデルでは LPS が直接 TLR を介して炎症の促進にはたらく。しかしながら、炎症性サイトカインの産生などが C5a 受容体阻害剤によって有意に抑制されたことは、C5a が LPS 誘導肺障害において重要なはたらきを持つことを示している。C5a 受容体阻害剤によって肺組織中の C5a

量が減少したことから、C5a は受容体に結合することにより、炎症を促進するとともに、補体系をさらに活性化している可能性も考えられる。

結論

本実験では TAFI は補体因子である C5a の活性を負に制御することによって、急性肺障害の増悪を抑制する役割を担っていることが示された。