

Amphiregulin suppresses epithelial cell apoptosis in lipopolysaccharide-induced lung injury in mice

緒方, 彩子

<https://doi.org/10.15017/1831411>

出版情報 : 九州大学, 2017, 博士 (医学), 論文博士

バージョン :

権利関係 : © 2017 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license

氏 名：緒方 彩子

論 文 名：Amphiregulin suppresses epithelial cell apoptosis in lipopolysaccharide-induced lung injury in mice

(Amphiregulin は LPS 肺傷害マウスにおいて肺胞上皮細胞のアポトーシスを抑制する)

区 分：乙

論 文 内 容 の 要 旨

背景：ARDS は Ashbaugh らによって 1967 年にはじめて提唱された疾患で、好中球性炎症と上皮傷害によって特徴づけられる。ARDS の一般的な原因としては肺炎、胃酸誤嚥、敗血症、重症外傷等があり、そのリスクやメカニズムについても検討されているが依然として致死率は高いままである。LPS は肺傷害や ARDS に強く関与しており、マウスへの投与により好中球集簇やアポトーシスを起こすことが報告されている。EGF family の一つである Amphiregulin は細胞増殖に寄与しており、COPD、喘息患者の損傷を受けた肺組織や人工呼吸関連肺傷害マウスモデルの肺胞上皮にも発現していることが報告されている。また近年 Amphiregulin は LPS による肺傷害を抑制することが報告されているが、そのメカニズムについては報告されていない。本研究において我々は LPS 肺傷害マウスのアポトーシスにおける Amphiregulin の役割を検討した。

方法：C57BL/6 マウス、雌、7 週令に対して LPS0.5 mg/kg を経鼻投与し急性肺傷害を起こした。このマウスに対しリコンビナント Amphiregulin7.5 μg/body もしくは PBS を、LPS を投与する 6 時間前、0.5 時間前と 3 時間後に腹腔内投与を行った。LPS 投与 6、24 時間後にこれらのマウスに対し組織学的検査、免疫染色、気管支肺胞洗浄液、Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end label (TUNEL) 染色を施行した。またマウス肺胞上皮細胞の cell line である LA-4 細胞に Amphiregulin 0、10、100 nM を 3 時間投与したのち PBS で洗浄し、LPS 0、50 μg/ml を投与した。24 時間後に細胞を回収しフローサイトメトリー、ウエスタンブロッティングを行い、Amphiregulin のアポトーシスやその経路における効果を検討した。

結果：LPS 肺傷害マウスの肺組織においては炎症細胞浸潤、浮腫、肺胞出血が見られたが、これらの変化は Amphiregulin 投与によって軽減された(Fig. 1A, B)。また LPS を投与されたマウスの肺胞洗浄液中の総細胞数、好中球数、肺血管透過性亢進を示す蛋白濃度はコントロールマウスと比較して有意に上昇し、Amphiregulin 投与によって有意に抑制された(Fig. 1C, D)。肺胞洗浄液中の炎症性サイトカイン (IL-1β、IL-6、TNFα) やケモカイン(CXCL-1、CCL2) は LPS 投与によって有意に上昇し、Amphiregulin 投与によって IL-6、CCL2 は軽度抑制されたものの有意差は見られなかった。6、24 時間後に LPS 投与

マウスではコントロールマウスと比較して ICAM-1 が有意に上昇し、LPS 投与 24 時間後には Amphiregulin 投与によって有意に抑制された。TUNEL 染色では、LPS 投与によって上皮細胞のアポトーシスが見られるが、Amphiregulin 投与によって有意にアポトーシスは抑制された。*In vitro* において、LPS 投与 24 時間後に LA-4 細胞の $12.39 \pm 0.58\%$ にアポトーシスが見られたが、LPS 投与前に Amphiregulin 100 nM を投与すると有意に抑制された (Fig. 2A)。ウェスタンブロット法では、Amphiregulin 投与によってカスパーゼ 11 に変化はなかったものの活性型カスパーゼ 8,3 は有意に抑制していた (Fig. 2B,C)。

考察：Amphiregulin は肝障害やブレオマイシン肺傷害の抑制において重要な役割を担う事は報告されている。今回我々は、LPS マウス肺傷害において Amphiregulin は肺胞上皮細胞のアポトーシスを抑制し、*In vitro* においてもカスパーゼ 8 の活性を阻害することでアポトーシスを抑制することを示した。しかし炎症とアポトーシスのいずれも調整しているカスパーゼ 11 については Amphiregulin 投与によって抑制されていなかったことから Amphiregulin は LPS 肺傷害の上皮細胞のアポトーシスにおいて中心的な役割を果たしてはいるが完全ではないことが考えられた。また肺胞洗浄液中の炎症性サイトカイン (IL-1 β 、IL-6、TNF α) やケモカイン (CXCL-1、CCL2) を有意に抑制しなかったが、過去の報告との LPS の投与方法の違いのためと考えられた。LPS 肺傷害マウスにおいて NF- κ B を介して肺組織中の ICAM-1 の mRNA が増加し、結果として好中球の集簇がおこるとの報告があるが、今回我々は Amphiregulin 投与によって有意に ICAM-1 が抑制されることを報告した。しかしその機序については不明であり、更なる研究が必要と考えられた。

結語：本研究結果より、Amphiregulin は LPS による肺傷害において肺胞上皮細胞のアポトーシスを抑制し、その治療手段になり得ると考えられた。

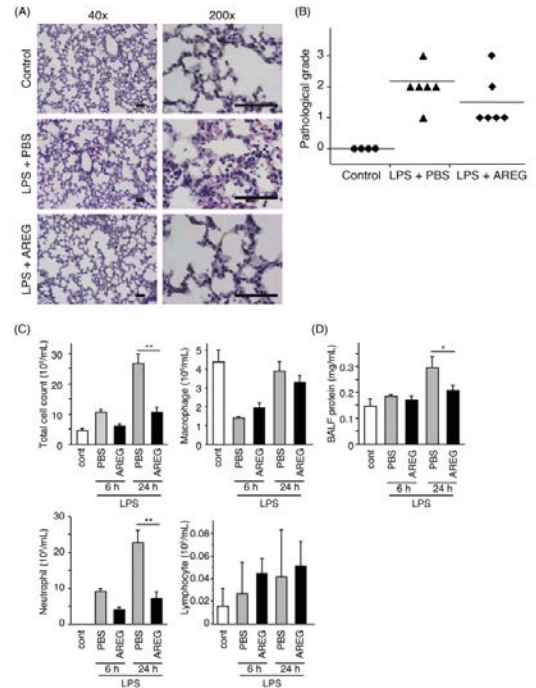


Figure 1. Amphiregulin は LPS によるマウスの急性肺傷害を軽減した

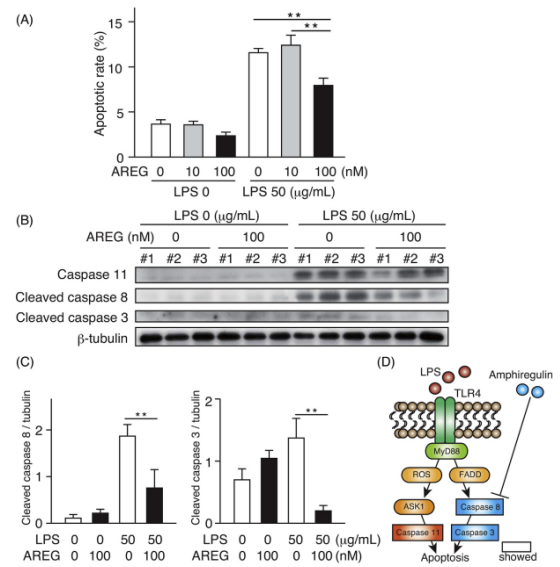


Figure 2. Amphiregulin は LPS による LA-4 細胞のアポトーシスを抑制する