

## S III-2 ALI とアポトーシス：NO との関連から

金沢医科大学呼吸器内科<sup>1</sup>、同第二病理<sup>2</sup>

梅 博久<sup>1</sup>、笠倉尚人<sup>1</sup>、楊 観虎<sup>1</sup>、上田善道<sup>2</sup>、高橋敬治<sup>1</sup>、大谷信夫<sup>1</sup>

急性肺傷害(ALI)の発症と病態の進行に種々の肺細胞のアポトーシスに関わっている可能性があるが、その細胞局在と誘導機構はよく知られていない。NO は種々の肺細胞で産生され、superoxide ( $O_2^-$ )と反応して peroxynitrite ( $ONOO^-$ )を生成し、シグナル伝達と組織傷害に関わる。ヒト急性呼吸窮迫症候群 (ARDS)および ALI 動物モデルを用いて肺細胞のアポトーシスとその誘導機構を解析し、NO-superoxide 抑制による治療の可能性について検討した。

臨床的に ARDS、かつ病理組織学的にびまん性肺細胞傷害と診断された27例の剖検肺組織を用い、H-E 染色像から ARDS の病期を浮腫・浸出期、硝子膜形成期、増殖期に分けて検討した。新鮮凍結肺から DNA を抽出し電気泳動を行い、アポトーシスが起こっているか観察した。Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)法によりアポトーシス細胞の染色と計数を行った。アポトーシス関連因子、遺伝子として誘導型 NO 合成酵素(iNOS)、tyrosine が  $ONOO^-$ によってニトロ化された nitrotyrosine、bax/bcl-2、c-myc、p53、Fas/Fas ligand(FasL)、caspase 1(ICE)、caspase 3(cpp32)の発現を RT-PCR、Western blot、免疫染色で検討した。エンドトキシン(LPS)0.1~30mg をラット気管内に投与することにより ALI を誘発した。3~72 時間後肺を摘出し、H-E 染色、湿乾重量比の測定、気管支肺泡洗浄(BAL)細胞の解析により ALI の程度を評価するとともに、DNA 電気泳動、TUNEL 法によるアポトーシスの定量、および、免疫染色により iNOS、nitrotyrosine の発現を検討した。さらに、

LPS 投与前に iNOS 拮抗薬である aminoguanidine または L-NAME を投与することにより NO 産生を抑制するか、あるいは、SOD を投与することにより superoxide を抑制したとき、ALI の重症度とアポトーシスの程度が変化するかを検討した。

ヒト ARDS の硝子膜形成期~増殖期の肺から抽出した DNA の電気泳動では ladder 形成が認められ、また TUNEL 法による肺組織染色では肺胞上皮、特に II 型肺胞上皮細胞(II 型細胞)において高頻度のアポトーシスが生じていた。II 型細胞と肺胞マクロファージには iNOS および nitrotyrosine の発現が検出された。また、同時期の肺胞上皮には bax/bcl-2、c-myc、caspase 1、3 の発現が観察された。浮腫・浸出期の肺では主として p53、Fas/FasL の発現が肺胞上皮に見られた。LPS をラット気管内に投与すると12時間後から ALI が誘導された。全肺の DNA 電気泳動では ladder が見られ、TUNEL 法では肺胞上皮、好中球にアポトーシスが観察された。肺胞上皮とマクロファージに iNOS と nitrotyrosine の発現が見られた。SOD および aminoguanidine は LPS による肺傷害を軽減し、アポトーシスを抑制し、nitrotyrosine の発現を抑制した。

以上から、ALI、ARDS では NO-superoxide 産生が p53、bax などの関連遺伝子を誘導し、caspase 1、3 の発現を介して肺胞上皮細胞のアポトーシスを誘導するという分子機構が想定された。SOD や iNOS 拮抗薬は NO-superoxide の産生とアポトーシスを抑制することにより、肺傷害を軽減する薬剤となりうる事が示唆された。