

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¹、同第二病理²

梅 博久¹、笠倉尚人¹、楊 観虎¹、上田善道²、高橋敬治¹、大谷信夫¹

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が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は種々の肺細胞で產生され、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、気管支肺胞洗浄(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产生を抑制するか、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)において高頻度に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产生が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の产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ことが示唆された。