

主論文の要旨

**Protective effects of intratracheally administered
quercetin on lipopolysaccharide-induced acute lung injury**

LPSによる急性肺傷害モデルに対する
ケルセチン気管内投与の保護効果の検討

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 呼吸器内科学分野

(指導：長谷川 好規 教授)

高嶋 浩司

【緒言】

急性呼吸促迫症候群 (ARDS)はいまだに死亡率が非常に高い疾患であるにもかかわらず、有効な治療法が確立されていない。ARDS の進展には好中球の肺への流入と活性化が重要であるが、肺胞マクロファージ (AM)や肺胞上皮細胞、気管支上皮細胞も関与している。特にAMは炎症反応の調節に寄与しており、AMより分泌されたTNF- α 、IL-1 β 、IL-6は好中球を刺激し、活性化した好中球がオキシダント、プロテアーゼ、ロイコトリエンなどを放出して、結果的にARDSが進展していく。

野菜や果物に含まれているケルセチンはフラボノイドの一種であり、さまざまな細胞や組織に抗炎症・抗酸化などの保護効果を示す。ケルセチンが作用する際には heme oxygenase (HO)-1 を発現増強させ、HO-1 の酵素作用が保護効果に関与することが明らかになっている。

ケルセチンは無害で、生体に投与可能であるために、ARDS 発症の予防や治療に対して使用するのに適していると考えられる。またケルセチンは容易に吸収されないため肺局所への投与が最も効果的と考えられる。ARDS は挿管中の患者でしばしば発症することから、ケルセチンのARDS発症に対する予防的効果を調べることにした。

本研究では、LPSによる急性肺傷害モデルに対する気管内投与時のケルセチンの作用およびケルセチンが誘導するHO-1の関与について検討した。

【方法】

急性肺傷害モデルは、BALB/c マウスにLPSを経気管的に投与し作製した。ケルセチンの保護効果は、肺傷害の指標となる wet lung-to-body ratio、病理組織、気管支肺胞洗浄液 (BALF)中の細胞数で評価した。次にケルセチンを気管内に投与した際にHO-1を発現増強する細胞を免疫染色で同定した。マウス肺胞マクロファージ細胞株AMJ2-C11細胞、およびマウスBALF中の細胞を用いてLPS刺激に対するケルセチンの効果およびHO-1の関与をTNF- α 、IL-1 β 、IL-6の炎症性サイトカインの発現および産生で評価した。さらに発症後のケルセチンの保護効果を確認するために、急性肺傷害モデルより回収したBALF中の細胞にケルセチンを作用させ、MMP-9活性やTNF- α 、IL-1 β 、IL-6の産生について評価した。

【結果】

ケルセチンの気管内投与により急性肺傷害モデルにおける wet lung-to-body ratio が低下した (Figure 1)。肺の病理組織やBALF中の細胞数は有意差を認めなかったが、炎症が軽減されるようであった。ケルセチン投与後の肺ではHO-1の産生が増強しており、免疫染色によりAM、肺胞上皮細胞、気管支上皮細胞で特に産生増強が観察された (Figure 2)。これらの細胞種由来の細胞株でもケルセチンによってHO-1の発現、および産生の誘導が確認された (Figure 3)。AMJ2-C11細胞株においてケルセチンの前処理は、LPS刺激によって増強したTNF- α 、IL-1 β 、IL-6のmRNA発現およびタンパク質産生を抑制し、これらの抑制はHO-1阻害剤により解除された (Figure 4)。またマ

ウスの BALF 中の細胞でも同様にケルセチンは、LPS 刺激によって増強した TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 の発現および産生を抑制した (Figure 5)。さらに急性肺傷害モデルより回収した BALF 中の細胞にケルセチンを添加すると、MMP-9 の酵素活性や TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 の産生を抑制した (Figure 6)。

【考察】

ケルセチンは吸収や代謝の問題で、普段の食事から摂取される量では保護効果を示す十分な血清濃度が得られない。しかし肺に直接作用させることで、傷害が起きている肺局所においてケルセチンを十分な濃度で保つことが可能になると考え、気管内に投与した。

ケルセチンの予防的気管内投与は、急性肺傷害モデルにおける wet lung-to-body ratio を低下させた。肺浮腫の指標である wet lung-to-body ratio は肺傷害の重症度と関連している。肺浮腫は ARDS の主要な病態であり、気道上皮細胞と血管内皮細胞の二つの細胞バリアの傷害と関連しているが、ケルセチンはどちらのバリア機能も改善することが示されている。また ARDS の患者で増加している TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 といった炎症性サイトカインは炎症カスケードの開始と進展に重要な役割を果たしているが、ケルセチンがこれらの炎症性サイトカインの産生を抑制することによって肺傷害を軽減していることを示した。

HO-1 はヘムを一酸化炭素、ビリベルジン、鉄に分解する律速酵素で、HO-1 の抗炎症効果は有害なヘムを分解するだけでなく、細胞保護効果を持つ一酸化炭素やビリルビンを産生することで発揮される。ケルセチンは肺において AM や上皮細胞から HO-1 を十分に誘導することができた。これらの細胞は ARDS の肺局所で炎症性サイトカインを産生する可能性があるため、ケルセチンにより抗炎症効果を持つ HO-1 を発現させることは理に適っている。

MMP-9 は好中球や AM といった炎症細胞から主に産生され、ARDS 患者で上昇し、好中球の遊走に関与する主要な因子である。MMP-9 欠損マウスや MMP-9 を抑制すると、肺傷害が軽減することが報告されている。本研究では、すでに炎症が起きた状態でもケルセチンは MMP-9 の活性や炎症性サイトカインの産生を抑制しており、ケルセチンは予防的投与だけでなく、治療薬としても有益な効果を示す可能性を示した。

【結論】

ケルセチンは急性肺傷害に対して保護効果を持ち、HO-1 を介する機序が関与することが示唆された。気管内投与はケルセチンの保護作用を効果的に発揮させるために望ましい方法であり、肺傷害に対する予防および治療として新たな戦略となる可能性がある。