

顆粒球エラストラーゼによる肺サーファクタントの転換促進と表面活性阻害

(分担研究：新生児の慢性肺疾患の予防と治療に関する研究)

研究協力者：清水 浩

共同研究者：五十嵐葉子、田中理砂

要約：慢性肺疾患では、好中球遊走因子・エラストラーゼ放出刺激因子であるインターロイキン8によって肺に集積した好中球が、顆粒球エラストラーゼ等の蛋白分解酵素を放出して、肺組織のコラーゲンやエラスチンを分解して、肺組織障害の一因をなしていると考えられている。本研究では、顆粒球エラストラーゼが肺サーファクタントのサブタイプ転換に及ぼす影響について surface area cycling 法を用いて検討し、顆粒球エラストラーゼが、肺サーファクタントサブタイプの転換を促進することを証明した。また cycling 後の検体の表面活性を測定し、顆粒球エラストラーゼがサーファクタント活性を阻害することを示した。顆粒球エラストラーゼのサーファクタント蛋白質への影響は、ウエスタンブロット法にて検討され、SP-A、SP-B が減成 (degradation) されていることが示された。このことから、顆粒球エラストラーゼは、肺組織の構築を直接障害する他、肺サーファクタントの代謝・表面活性に影響して、新生児の呼吸障害を引き起こしている可能性が示唆された。

見出し語：慢性肺疾患、顆粒球エラストラーゼ、肺サーファクタント、*in vitro* surface area cycling 法

緒言：気管支肺胞洗浄液に回収される肺サーファクタント画分には、その比重によって3つのサーファクタントサブタイプ (ultraheavy, heavy, light subtype) が含まれている。Ultraheavy, heavy subtype は、large aggregate (LA) サーファクタントと呼ばれ、ラメラ封入体や管状ミエリンを含み、表面活性が高い。このLAは、サーファクタント転換酵素の作用によって、表面活性の低い small aggregate (SA) サーファクタントに転換される。慢性肺疾患では、その気道吸引液中において、インターロイキン8 (好中球遊走因子・エラストラーゼ放出刺激因子) と顆粒球エラストラーゼが上昇しており、インターロイキン8によって肺に集積した好中球が、顆粒球エラストラーゼ等の蛋白分解酵素を放出して、肺組織のコラーゲンやエラスチンを分解して、肺組織障害の一因をなしていると考えられている。本研究では、ヒト顆粒球エラストラーゼが、肺サーファクタントサブタイプの転換に及ぼす影響について surface area cycling 法を用いて検討し、また cycling 後の検体の表面活性を測定して、顆粒球エラストラーゼのサーファクタント表面活性への影響を検討した。また、顆粒球エラストラーゼのサーファクタント蛋白質 (SP-A、SP-B) への影響をウエスタンブロット法にて検討した。

研究方法：

- 1) 肺サーファクタント LA の精製：ブタ摘出肺から回収した気道洗浄液の低速遠心上清を40000×g、15分間で遠心分離後、その沈渣を0.8Mシヨ糖/生理食塩水に重層し、再度同条件にて遠心して、得られた界面をLAとして回収した。
- 2) *In vitro* surface area cycling 法：LAまたはsurfactant TA (STA) (いずれもリン脂質として1.25mg) を2mlのTris buffer (0.15M NaCl, 0.01M Tris-HCl, 1mM CaCl₂, 0.1mM EDTA, pH 7.4) に懸濁し、12×75mmのポリスチレンチューブに入れて回転板に固定後、37°Cで40回転/分、6時間ないし24時間回転させた。回転終了後、40000×g、15分間の遠心により、SAに相当する上清とLAに相当する沈渣に分離し、脂質抽出した後に各分画のリン含量を定量し、LAからSAへの転換を%SA=SA/(SA+LA)にて評価した。
- 3) 表面張力の測定：Cycling終了後の検体の表面活性 (表面吸着、最小表面張力、最大表面張力) は、気泡型表面張力計 (pulsating bubble surfactometer) で測定した。
- 4) ウエスタンブロット法：Cycling終了後の検体を電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、サーファクタント蛋白質 SP-A、SP-B量をそれぞれの特異的抗体を用いてウエスタンブロット法で検討した。

研究成績：

1) 顆粒球エラストラーゼによるサーファクタントサブタイプ転換促進：ブタ肺 LA または STA に、ヒト顆粒球エラストラーゼ (16000 units/mg protein, Elastin Products Co., Inc.) を16, 80, 160 units/ml (蛋白量として1, 5, 10 μg/ml) で添加し、surface area cycling を6時間ないし24時間行った後に、%SAを算定した。ブタ肺 LA では、エラストラーゼ濃度に依存して%SAが増加し、80 units/ml以上の濃度では%SA値はプラトーに達した (図)。また6時間と24時間のcyclingの比較では、24時間群の%SAが増加していた。一方、STAの%SAはエラストラーゼ添加を行わない場合でも、既に25%を示しており、エラストラーゼ添加によっても%SAの大きな変化はみられ

なかった。

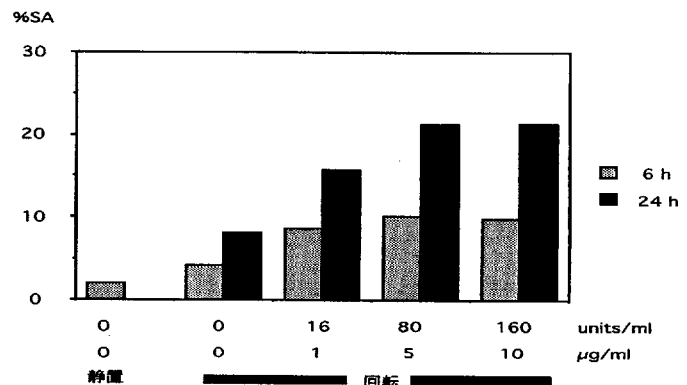
2) 顆粒球エラストラーゼによる表面活性阻害：ブタ肺 LA、STAのいずれにおいても、エラストラーゼを添加して、surface area cyclingを行った群において、表面活性 (表面吸着、最小表面張力、最大表面張力) が最も阻害されていた。

3) 顆粒球エラストラーゼによるサーファクタント蛋白質 SP-A、SP-Bの減成 (degradation)：ブタ肺 LA では、エラストラーゼを添加して、surface area cyclingを行った群において、SP-A、SP-Bが最も減成していた。特にSP-Aの減成の程度が強かった。一方、STAにおいても、エラストラーゼを添加して、surface area cyclingを行った群において、SP-Bが最も減成していた。

考察：肺サーファクタントの機能的欠如は、これまでサーファクタントの表面活性の阻害という面からの検討が多いが、サーファクタントサブタイプ転換促進もサーファクタントの機能的欠如に大きな影響を及ぼしている可能性が高い。本研究で用いた *in vitro* surface area cycling 法は、サーファクタントサブタイプ転換を容易に評価できる手法であり、今回、顆粒球エラストラーゼのサーファクタントサブタイプ転換促進作用を証明することができた。サーファクタント蛋白質 SP-A、SP-Dは、コレクチンと呼ばれるC型レクチンファミリーに属する。これらの親水性サーファクタント蛋白質は、サーファクタントの表面活性発現への関与は少ないが、chemotaxis や phagocytosis を促進し、活性酸素産生やサイトカイン放出の調節を行い、肺における感染防御に関与していると考えられている。今回の検討で示された顆粒球エラストラーゼによるサーファクタント蛋白質の減成は、肺局所の免疫能の低下に関与している可能性を示唆している。

結論：顆粒球エラストラーゼが、1) 肺サーファクタントサブタイプの転換を促進すること、2) 肺サーファクタントの表面活性を阻害すること、3) サーファクタント蛋白質 (SP-A、SP-B) を減成することが示された。顆粒球エラストラーゼは、肺組織の直接的な障害に加えて、肺サーファクタントの代謝・表面活性に影響して、新生児の呼吸障害を引き起こしている可能性が示唆された。

図 顆粒球エラストラーゼによるブタ肺LAのSAへの転換促進





検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要約:慢性肺疾患では,好中球遊走因子・エラスターゼ放出刺激因子であるインターロイキン8によって肺に集積した好中球が,顆粒球エラスターゼ等の蛋白分解酵素を放出して,肺組織のコラーゲンやエラスチンを分解して,肺組織障害の一因をなしていると考えられている。本研究では,顆粒球エラスターゼが肺サーファクタントのサブタイプ転換に及ぼす影響について surface area cycling 法を用いて検討し,顆粒球エラスターゼが,肺サーファクタントサブタイプの転換を促進することを証明した。また cycling 後の検体の表面活性を測定し,顆粒球エラスターゼがサーファクタント活性を阻害することを示した。顆粒球エラスターゼのサーファクタント蛋白質への影響は,ウエスタンブロット法にて検討され,SP-A, SP-B が減成(degradation)されていることが示された。このことから,顆粒球エラスターゼは,肺組織の構築を直接障害する他,肺サーファクタントの代謝・表面活性に影響して,新生児の呼吸障害を引き起こしている可能性が示唆された。