

肺胞上皮は周期的な過伸展により、人工呼吸器関連肺障害をはじめとした種々の肺疾患の病因となる肺胞上皮障害を来すとされ、その機序として酸化ストレスの関与が推測されている。一方で、肺胞上皮の周期的な過伸展による酸化ストレス発生の詳細な機序は知られていない。本研究の目的は、肺胞上皮細胞における周期的伸展による酸化ストレス発生の機序を解明することであり、また、その酸化ストレスと肺胞上皮細胞障害の関係についても検討した。

初めに、ヒトⅡ型肺胞上皮細胞である A549 細胞を用いて、周期的伸展刺激（伸展率 15%、20 回/分）を与えた後に、酸化ストレスのマーカーである 8-isoprostane および 3-nitrotyrosine の濃度を測定した。その結果、周期的伸展により、伸展時間依存性に 8-isoprostane および 3-nitrotyrosine の産生は著しく上昇し、周期的伸展による酸化ストレスの発生が確認された。

次に、A549 細胞の周期的伸展による酸化ストレスの発生機序を調べた。酸化ストレスを引き起こす主な活性酸素種である superoxide は、3つの機序、すなわち①xanthine oxidase、②ミトコンドリアでの産生、③NADPH oxidase (NOX)、により産生が調節されている。これらのうち A549 細胞の周期的伸展により、xanthine oxidase 活性およびミトコンドリア由来の superoxide 産生量は亢進しないことが確認され、一方、NOX の酵素活性は周期的伸展により有意に亢進した。さらに、NOX の阻害薬である DPI (diphenyleneiodonium) の添加により、周期的伸展による酸化ストレス発生は著しく抑制されたことから、周期的伸展による

酸化ストレス発生は主に NOX 依存性と考えられた。

NOX の isoform として NOX 1 - 5、DUOX 1 - 2 の合計 7 種類が知られており、どの isoform が周期的伸展による酸化ストレス発生に関与しているか調べた。A549 細胞の周期的伸展により、7 つの NOX isoform のうち NOX 2、4、5、DUOX 2 の 4 つの発現が亢進した。このうち選択的阻害薬が入手可能な NOX4 に着目したところ、NOX4 の選択的阻害薬である GKT137831 の添加により、DPI 同様に周期的伸展による酸化ストレス発生が著しく抑制されることが示され、NOX isoform のうち少なくとも NOX 4 の関与が示された。

さらに、周期的伸展により生じた酸化ストレスが細胞障害に寄与するかどうか、annexin V assay を用いて検討した。II型肺胞上皮細胞は apoptosis を来すことで、他の肺胞上皮や線維芽細胞の活性化、各種炎症性サイトカインの産生亢進、凝固活性亢進、血管新生などを生じ、数々の肺疾患の誘因となることが知られている。A549 細胞の周期的伸展により annexin V 陽性かつ PI 陽性細胞が増加したことから、late phase apoptosis/ necrosis が誘導されることが示された。また、NOX 阻害薬である DPI および GKT137831 の添加により周期的伸展による annexin V 陽性かつ PI 陽性細胞の増加が抑制されたことから、NOX 阻害薬が周期的伸展による late phase apoptosis/ necrosis を抑制することが示された。以上から、A549 細胞は周期的伸展により細胞障害を来し、NOX (かつ NOX isoform のうち少なくとも NOX 4)由来の酸化ストレスがその一因であることが示された。

本研究は、II型肺胞上皮細胞は周期的伸展により、酸化ストレスの発生ならびに細胞障害

を来し、その機序には周期的伸展によって誘導される NOX (少なくとも NOX 4)が主要な役割を果たすことを示した。また、本研究結果から、周期的伸展に伴う肺胞上皮障害に対して、NOX は治療のターゲット分子になる可能性が示唆された。