肺胞上皮細胞の再灌流傷害における IL-8 及び細胞骨格の役割とポリフェノールの効果

（研究課題番号　13470272）

平成 13 年度～平成 14 年度科学研究費補助金（基盤研究 B）研究成果報告書

平成 15 年 5 月

研究代表者　板東　徹
（京都大学医学研究科助手）

京都大学図書
9810058230
附属図書館

はしがき

臨床肺移植において、術後早期のグラフト機能不全を引き起こす最大の原因は肺の虚血再灌流傷害と考えられる。この虚血再灌流傷害の抑制に、抗酸化力と cytostatic な作用を併せ持つ緑茶ポリフェノールが有効である可能性がある。肺胞上皮細胞は酸化ストレスによって IL-6、IL-8、RANTES 等のサイトカインを分泌し、このうち特に IL-8 は再灌流傷害において重要な役割を果たしている。本研究では肺胞上皮細胞からの IL-8 産生に対する緑茶ポリフェノールの抑制効果を検討した。

研究組織

研究代表者：板東　徹（京都大学医学研究科助手）

研究分担者：和田洋巳（京都大学医学研究科教授）

研究経費

平成 13 年度　2,900 千円

平成 14 年度　3,500 千円

計　6,400 千円

研究発表

学会誌等

1) Tanaka T, Nakamura H, Nishiyama A, Hosoi F, Matutani H, Wada H & Yodoi J: Redox regulation by Thioredoxin superfamily. Protection against Oxidative Stress and Aging. Vol 33. 851-855, 2001.

2) Hirata T, Fukuse T, Ishikawa S, Hanaoka S, Chen Q, Shoji T, and Wada H: "Chemical Precondition" by 3-nitropropionate reduces ischemia-reperfusion in cardiac-arrested rat lung. Transplantation. Vol 71. 352-359, 2001.

3) Isowa N, Wada H: Oxidative stress and ischemia-reperfusion induced acute lung injury. New Surgery. 1(1): 52-60, 2001

4) Fukuse T, Hirata T, Ohmasa M, Ishikawa S, Shoji T, Yosimura T, Hanaoka N, Chen Q, LIu CJ, Wada H: Effect of ATP sensitive potassium channel openers on lung preservation. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 163(5):331, 2001

5) Matsumoto S, Hirata T, Fukuse T, Ueda H, Isiwa N, Li M, Tanaka F, Bando T, Hasegawa S, Inui K, Wada H : Ultrasonographic evaluation for small noduls in peripheral lung during video-assisted surjery(VATS). American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 163(5):701, 2001

6) Matsuoka K, Isowa N, Yosimura T, Wada H : Green tea polyphenols inhibit H2O2-induced IL-8 production from alveolar epithelial cells through inactivation of JNK. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 163(5):943, 2001

7) Hirata T, Fukuse T, Hanaoka Shinji, Matsumoto S, Chen Q, Wada H: Mitochondrial respiration as an early marker of viability in cardiac-arrested rat lungs. Journal of Surgical Research . 96, 268-276 (2001)

8) Gon Y, Sasada T, Matsui M, Hashimoto S, Takagi Y, Iwata S, Wada H, Horie T, Yodoi J.: Expression of thioredoxin in bleomycin-injured airway epithelium. Possible role of protection against bleomycin induced epithelial injury. Life Sciences 68: 1877-1888 2001

9) Fukuse T, Hirata T, Ishikawa S, Shoji T, Yoshimura T, Chen Q, Matsukura T, Hanaoka N, and Wada H: Optimal alveolar oxygen concentration for cold storage of the lung. Transplantation. 72(2): 300-304, 2001

10) Omasa M, Hirata T, Shoji T, Bando T, Hasegawa S, Inui K, and Wada H : A case of repetitive intrapleural cancer chemotherapy using INFUSE-A-PORT for malignant mesothelioma. The Thoracic and Cardiovascular Surgeon. 49: 233-235, 2001

11) Yoshimura T, Kawashima M, Nakamura T, Isowa N, Bando T, Hasegawa S, Kondo H, Toyokuni S, Wada H: A novel selectin blocker alleviates oxidative stress of lung reperfusion injury. Journal of Surgical Research. 101:91-98 2001

12) Matsuoka K, Isowa N, Yoshimura T, Liu M, Wada H: Green tea polyphenol blocks H2O2-induced interleukin-8 production from human alveolar epithelial cells, Cytokine, 18: 266-273 (2002)

13) Shoji T, Oku Y, Ishikawa S, Wada H: Thoracoscopic electrode implantation for diaphragm pacing in dogs. Respiration. 69:69-74. 2002

14) Omasa M, Fukuse T, Matsuoka K, Inui K, Hyon SH, and Wada H: Effect of green tea extracted polyphenol on ischemia / reperfusion injury after cold preservation of rat lung. Transplanation Proceedings, 35: 138-139, 2002

15) Chen O, Yoshimura T, Kawashima M, Hanaoka N, Fukuse T, Bando T, Wada H: A novel sialyl Lewis X analogue attenuates ischemia reperfusion injury in rabbit lung . Thorac Cardiov Surg 50: 296-300, 2002

16) Wada H, Omasa M, Nakamura T: Development of new organ preservation solutions and their application. Recent Res Devel Resp Critical Care Med. 2: 181-193, 2002

口頭発表

1) 松岡勝成、磯和理貴、吉村誉史、庄司剛、大政貢、中村隆之、花岡伸治、板東徹、長谷川誠紀、乾健二、和田洋巳：肺胞上皮細胞からの IL-8 産生に対する緑茶ポリフェノールによる抑制効果、第 17 回日本肺および心肺移植研究会、2001.1.27. 東京

2) 松岡勝成、磯和理貴、吉村誉史、板東徹、長谷川誠紀、乾健二、和田洋巳：肺胞上皮細胞における酸化ストレスによる IL-8 産生と緑茶ポリフェノールによる抑制のメカニズム、第 101 回日本外科学会総会、2001.4.12.仙台

3) Matsuoka K, Isowa N, Yoshimura T, Wada H: Green tea polyphenol inhibits H2O2-induced IL-8 production from alveolar epithelial cells through inactivation of JNK, 97th ATS International Conference, 2001.5.23. San Francisco, USA

4) 松岡勝成、磯和理貴、吉村誉史、庄司剛、大政貢、中村隆之、花岡伸治、板東徹、長谷川誠紀、乾健二、和田洋巳： IL-8 産生と MAP キナーゼ活性化に対する緑茶ポリフェノールの抑制効果、第 37 回日本移植学会総会、2001.12.16. 東京

5) 松岡勝成、磯和理貴、吉村誉史、庄司剛、大政貢、中村隆之、花岡伸治、板東徹、長谷川誠紀、乾健二、和田洋巳：緑茶ポリフェノールによる IL-8 産生および MAP キナーゼ活性化に対する抑制効果、第 102 回日本外科学会総会、2002.4.12. 京都

6) Matsuoka K, Isowa N, Yoshimura T, Wada H: Green tea polyphenol inhibits H2O2-induced phosphorylation of mitogen activated protein kinases, 98th ATS International Conference, 2002.5.19. Atlanta, USA

7) Ikeyama K, Sakai H, Omasa M, Nakamura T, Bando T, Hasegawa S, Inui K, Wada H.: Effects of cold preservation lung respiratory mechanical properties of the rat.

12th European Respiratory Journal Annual Congress , 2002/9/15, Stockholm, Sweden

8) Omasa M, Fukuse T, Ikeyama K, Yoshimura T, Bando T, Hasegawa S, Inui K, Wada H: Glycine ameliorates ishemia/reperfusion injury after cold lung preservation. 12th European Respiratory Journal Annual Congress , 2002/9/16, Stockholm, Sweden

研究成果

（1）はじめに

肺移植は末期肺疾患の治療法として確立されているが、肺移植の術後成績はいまだ満足されるべきものではなく、早期のグラフト機能不全がレシピエントの 20%に認められている。グラフト機能不全の原因としては、拒絶反応や虚血再灌流傷害が重要な問題としてあげられる。虚血再灌流傷害の成因としては酸素化の際に生じる活性酸素が重要な働きをしていることが知られている。冷保存と再灌流は移植手術にとって避けることのできない過程であり、その傷害の抑制によって術後早期死亡率を下げることが可能となる。肺胞上皮細胞は H_2O_2 等の刺激で IL-6、IL-8、RANTES 等のサイトカインを分泌し、肺移植後の再灌流傷害において重要な役割を果たしている。特に好中球活性化サイトカインである IL-8 は重要であり、肺胞領域における局所的な IL-8 発現と好中球の組織内浸潤は密接にかかわっている。

ポリフェノールは様々な食品（お茶、ワイン、柑橘系果実など）に含まれ、体内で抗酸化的に働くことが知られている。中でも緑茶に多く含まれる Epigallocatechin gallate(EGCG)は転写因子抑制や DNA 合成抑制、細胞増殖抑制などの cytostatic な作用が報告されている。抗酸化力と cytostatic な作用を併せ持つ緑茶ポリフェノールは細胞を酸化ストレスから守り、酸化ストレスによる IL-8 産生を抑制できる可能性がある。IL-8 の産生を抑制することは、好中球の集積・活性化の抑制につながり、虚血再灌流傷害をコントロールする手段になり得る。そこで我々は肺胞上皮細胞の H_2O_2 刺激による IL-8 産生に対する緑茶ポリフェノールの作用を肺胞上皮 II 型細胞株である A549 細胞を用いて検討した。

（2）酸化ストレス刺激による IL-8 産生に対する緑茶ポリフェノールの効果

$1x10^5$/ml の A549 細胞を 24well dish で培養。緑茶ポリフェノール添加(0-0.2mg/ml)培地で 2 時間前処置したのち H_2O_2(400 μM)刺激を加え、1,3, 6 時間後の培地中 IL-8 濃度を ELISA 法を用いて測定した。培地中 IL-8 濃度は、緑茶ポ

リフェノール濃度依存的に減少した。緑茶ポリフェノールとH_2O_2を同時に投与した場合に比べ、緑茶ポリフェノールで前処置した場合のほうが、IL-８産生抑制が著明に認められた。

（３）酸化ストレス刺激による IL-8mRNA 発現に対する緑茶ポリフェノールの効果

$1x10^5$/ml の A549 細胞を 100mm dish で培養。緑茶ポリフェノール添加(0.2mg/ml)培地で 2 時間前処置したのち H_2O_2(400μM)刺激を加え、1,3,6 時間後の IL-8mRNA 発現を RT-PCR 法を用いて検討した。IL-8mRNA 発現は H_2O_2 刺激によって増強し、緑茶ポリフェノールを加えることにより、1,3,6 各時間において IL-8mRNA 発現の抑制が認められた。

（４）緑茶ポリフェノールによる H_2O_2 スキャベンジ作用

緑茶ポリフェノール含有培地(0-0.2mg/ml)に H_2O_2 (400μM)を添加し、30 分後の培地中 H_2O_2 濃度を測定した。緑茶ポリフェノールの濃度依存的に培地中 H_2O_2 濃度の減少が認められた。

（５）緑茶ポリフェノール添加後の細胞生存数の検討

$1x10^5$/ml の A549 細胞を 96well dish で培養。緑茶ポリフェノール(0-0.2mg/ml)及び H_2O_2 (400μM)を添加し、8 時間後の細胞生存数を計測した。本実験で使用した濃度の緑茶ポリフェノール及び H_2O_2 は A549 の生存率に影響を与えなかった。

（６）酸化ストレス刺激による mitogen activated protein kinase (MAPK)活性化に対する緑茶ポリフェノールの抑制効果

$1x10^5$/ml の A549 細胞を 60mm dish で培養。緑茶ポリフェノール添加(0.2mg/ml)培地で 2 時間前処置したのち H_2O_2(400μM)刺激を加え、15,30,60,120 分後の MAPK リン酸化を Western blot 法を用いて測定した。IL-8 産生に関与する３種

類の MAPK である Jun N-terminal kinase (JNK),p38,p44/42 に関して検討を行った。JNK,p38,p44/42 とも H_2O_2 刺激後 15,30,60,120 分でリン酸化が認められた。JNK は H_2O_2 刺激後 60 分で最も強いリン酸化を受け、p38 は H_2O_2 刺激後 30 分で最も強くリン酸化された。JNK と p38 は H_2O_2 刺激後 15,30,60,120 分とも緑茶ポリフェノールによってリン酸化の抑制が認められたが、p44/42 リン酸化は緑茶ポリフェノールによって影響を受けなかった。

（7）酸化ストレス刺激による JNK 活性化に対する緑茶ポリフェノールの濃度別効果

$1x10^5$/ml の A549 細胞を 60mm dish で培養。緑茶ポリフェノール添加(0-0.2mg/ml)培地で 2 時間前処置したのち H_2O_2(400 μ M)刺激を加え、60 分後の JNK リン酸化を Western blot 法を用いて測定した。JNK リン酸化は緑茶ポリフェノールによって有意に抑制されたが、濃度依存性は認められなかった。

（8）酸化ストレス刺激による p38 活性化に対する緑茶ポリフェノールの濃度別効果

$1x10^5$/ml の A549 細胞を 60mm dish で培養。緑茶ポリフェノール添加(0-0.2mg/ml)培地で 2 時間前処置したのち H_2O_2(400 μ M)刺激を加え、30 分後の p38 リン酸化を Western blot 法を用いて測定した。p38 リン酸化は緑茶ポリフェノールによって有意に用量依存的な抑制を受けた。

（9）まとめ

以上の結果から以下のことが判明した。1）緑茶ポリフェノールは H_2O_2 刺激によって引き起こされる肺胞上皮細胞 IL-8 産生を抑制する。緑茶ポリフェノールと H_2O_2 を同時に投与した群よりも、緑茶ポリフェノールで前処置を行った群の方がより強い IL-8 産生抑制を受けることから、緑茶ポリフェノールは単に培地中の H_2O_2 を scavenge することによって IL-8 産生抑制をもたらしているのではなく、細胞内の IL-8 産生系に対して、何らかの作用を行っていることが推察

された。2）ヒトの肺胞上皮細胞において酸化ストレスによるIL-8産生に関与するMAPKはJNK、p38、p44/42の3つが知られており、そのうち、JNKとp38の2つが緑茶ポリフェノールによって活性化の抑制を受けた。そのことから、緑茶ポリフェノールによるIL-8産生抑制にはJNKとp38の活性化抑制の経路が関与することが判明した。

緑茶ポリフェノールは肺胞上皮細胞において酸化ストレスによって誘導されるIL-8産生を、酸化ストレスの除去と細胞内刺激伝達系の抑制という2つのメカニズムによって抑制することが判明した。酸化ストレスによって産生されるIL-8を抑制することは虚血再灌流傷害の軽減に対して有効であると思われる。

添付論文リスト

1) Isowa N, Wada H: Oxidative stress and ischemia-reperfusion induced acute lung injury. New Surgery. 1(1): 52-60, 2001

2) Yoshimura T, Kawashima M, Nakamura T, Isowa N, Bando T, Hasegawa S, Kondo H, Toyokuni S, Wada H: A novel selectin blocker alleviates oxidative stress of lung reperfusion injury. Journal of Surgical Research. 101:91-98 2001

3) Matsuoka K, Isowa N, Yoshimura T, Liu M, Wada H: Green tea polyphenol blocks H2O2-induced interleukin-8 production from human alveolar epithelial cells, Cytokine, 18: 266-273 (2002)

4) Chen O, Yoshimura T, Kawashima M, Hanaoka N, Fukuse T, Bando T, Wada H: A novel sialyl Lewis X analogue attenuates ischemia reperfusion injury in rabbit lung . Thorac Cardiov Surg 50: 296-300, 2002