

●特集・酸素中毒をめぐる

酸素中毒—修復過程と組織の remodeling

辻 千鶴子*, 塩谷寿美恵**

はじめに

酸素中毒の病態は異なる動物種でも比較的類似しており、炎症細胞の肺への浸潤, endothelial cell, epithelial cell の傷害, 毛細血管透過性亢進による肺水腫が引き起こされることが知られている¹⁾。酸素治療を念頭においた研究の他に ARDS (acute respiratory distress syndrome) の動物モデルとして特に急性期の病態に関して多くの研究が行われてきた。近年, 急性炎症からの修復過程での組織の remodeling と肺の線維化や気腫化との関わりが注目されている。高濃度酸素曝露においても肺線維化, 気腫化が報告されている^{2),3)}が, 肺組織の修復過程と肺の線維化, 気腫化の進展機序との関係についてはまだ十分に解明されていない。本稿では酸素中毒における修復過程と組織の remodeling に関する最近の知見について解説する。

肺の修復過程における肺胞の epithelial type II cell の役割

高濃度酸素曝露を行うと肺胞表面の90%以上を覆う epithelial type I cell が傷害を受け, その数が減少すると type II cell の増殖がおこる。傷害を受けやすい type I cell にかわって増殖した type II cell は自身の機能を失いしだいに扁平な type I cell に分化することが知られている^{1),4)}。Type II cell は組織修復に最も重要な役割を果たす細胞であると考えられる。Type II cell の type I cell への分化は肺胞の再構築に重要であり, 早く再上皮化することで線維化への進展を防ぐことになる⁵⁾。近年 type II cell の分

離培養法が確立され, 詳細な研究が可能となり, 傷害やその修復と type II cell の関わりが次第に明らかになってきた。

1. Type II cell の増殖

Epithelial cell の増殖因子として, platelet-derived growth factor (PDGF) や epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF), insulin-like growth factor (IGF)-1, transforming growth factor (TGF) β 等が知られている他, まだ同定されていないものもいくつか報告されており, その数はかなり多い。しかし高濃度酸素曝露により PDGF, IGF-1, FGF, TGF β 1 の発現が誘導されるとの報告がある⁶⁾⁻⁹⁾ものの, このうちの因子が *in vivo* での type II cell の増殖にかかわるかについては十分にわかっていない。これらの増殖因子はおそらく細胞周期の調節系の上流にあつて細胞周期をコントロールする遺伝子の発現に関与するものと考えられる。最近, 高濃度酸素曝露により細胞周期に関わる遺伝子の発現が誘導されることも報告されている。高濃度酸素による type II cell の増殖に関与する可能性のある増殖因子および細胞周期に関わる因子の発現について簡単に説明する。

1) 増殖因子

① PDGF

PDGF には A-chain, B-chain の2種類のサブユニットがある。Powel らは, 高濃度酸素曝露により特に PDGF B-chain mRNA の発現増加が顕著であり, 時間的にもこの増加の時期が epithelial cell の増殖時期と一致することを報告している⁶⁾。彼らと同様に Han らは高濃度酸素により PDGF B-chain mRNA の発現が増加することを報告したが, 彼らは発現が観察される場所が間質であることから, PDGF は特に fibroblast の増殖に関わるものと考えている⁷⁾。現時点では PDGF

*東海大学医学部生理科学

**東海大学医学部呼吸器内科

が epithelial type II cell の増殖に関わるか否かはまだ明らかではない。

② FGF

FGF は比較的早くから高濃度酸素により誘導されること⁹⁾, epithelial cell の増殖や個体発生過程での type II cell の分化に関与すること¹⁰⁾が知られていた。近年 fibroblast growth factor (FGF) のスーパーファミリーである keratinocyte growth factor (KGF) が type II cell の増殖因子となることが解ってきた¹¹⁾。KGF は fibroblast などの間葉系の細胞で作られる。しかし、KGF レセプターは fibroblast には発現しておらず、epithelial cell に限局して発現していることから fibroblast 自身にはほとんど作用しないと考えられる¹²⁾。Panos らは recombinant human KGF (rh KGF) をラットの気管に投与すると type II cell が増殖すること、さらに rh KGF 投与により高濃度酸素による死亡率が低下すると報告している¹³⁾。死亡率低下の機序は不明であり、type II cell の増殖促進が死亡率の低下に関与しているのか否かは分からない。

高濃度酸素による endogenous な KGF の産生誘導を証明した報告はない。しかし KGF は tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin-1 (IL-1) 等のサイトカインによって誘導される¹⁴⁾との報告があり¹⁴⁾, 高濃度酸素による肺傷害においても何らかの役割を果たす可能性は高いものと考えられる。

③ TGF β

TGF β の役割については Buckley らの報告¹⁵⁾がある。彼らは48時間100%酸素に曝露後空気で recovery させたラットの肺から単離した type II cell を用いて、TGF β の産生量と細胞増殖との関係を検討した。Type II cell では TGF β の約7割が TGF β 3 であったが、TGF β 3 の産生は酸素曝露後コントロールよりも減少し、空気 recovery 24時間後に最低になったと報告している。TGF β 3 産生が最低となった時期は type II cell が最も増殖する時期と一致しており、かれらは TGF β 3 は正常状態では自己分泌性の調節因子として細胞の増殖を抑制するように働いているが、高濃度酸素曝露により TGF β 3 が減少し、調節因子としての作用が弱まると細胞増殖が進むのではないかと考えている。TGF β は細胞周期の

G1 から S 期へ移行するのを抑制することが知られ⁸⁾, 酸素中毒による type II cell の増殖の調節に関与している可能性は大きい。

2) 細胞周期に関与する因子

最近、細胞周期を制御する因子として発見された cyclin および、cyclin と結合してタンパクリン酸化活性を示す cyclin-dependent protein kinase (CDKs) の遺伝子およびタンパクの発現が高濃度酸素曝露により誘導されることが報告されている。Bui らは48時間100%酸素に曝露後空気で recovery させたラットの肺から単離した type II cell を用い、細胞増殖と cyclin, CDKs の発現および CDK のキナーゼ活性との関係を検討した¹⁶⁾。その結果空気での recovery 相で、S 期や G2/M 期に入っている細胞の割合が著明に増加し、cyclin A および D タンパクの発現、CDKs である CDC2 タンパク (p34^{cdc2}) の発現および p34^{cdc2} キナーゼ活性が増加することを報告している。

2. Type I cell への分化

古くから type I cell には増殖能がほとんどないことが知られており、type II cell が type I cell の前駆細胞となるのではないかと考えられていた⁴⁾が、これを証明することが困難であった。その理由はそれぞれの細胞に特異的な適切なマーカーが見つからなかったことなどによる。近年 Danto らは type I cell の特異的なマーカーを見出し、これを用いて、*in vitro* で type II cell を培養すると、次第に type II cell のマーカーが消失し、type I cell のマーカーが出現すること、またその逆もおこることを示し、type II cell が type I cell に可逆的に分化する可能性を示唆した¹⁷⁾。しかし、すべての type II cell が type I cell への分化能をもつのか、type I cell へ分化できるまだ認識されていない subpopulation が存在するのかは全く不明である。また、増殖から分化へどのような機序によって移行していくのかが重要なテーマであるが、この点に関してもほとんどわかっていない。増殖因子の中には発生段階での type II cell の分化に関与するものがあるが、傷害による type II cell から type I cell への分化にどの様に関与するのかは分かっていない。

最近 Paine らは cell-cell interaction と分化との関係について報告している¹⁸⁾。彼らは epithelial cell の分化を反映する細胞形の変化 (球状の type

II cell から扁平な type I cell への分化) を反映して中間径フィラメントであるサイトケラチンの発現パターンが変化することを利用して, type II cell を高密度で培養した場合(分化しにくい状態)と疎にして培養した場合(細胞は扁平化し, type I cell に類似した形状になる)とを比較した。高密度の場合には細胞間のデスモソームの形成が促進されること, デスモソームの形成を阻害すると高密度で優位となるサイトケラチンの発現が抑制されることを報告した。この実験結果はデスモソームを介した cell-cell contacts が細胞の形状—分化に何らかの影響を与えることを示唆している。Cell-cell contact と分化との関係は fibroblast と epithelial cell の場合にもあてはまる可能性が示唆されているが, fibroblast-epithelial cell interaction の項で解説する。

3. type II cell における接着因子の発現

高濃度酸素曝露により肺組織での intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 が増加することが知られている¹⁹⁾。近年 Kang らは抗マウス ICAM-1 抗体を用いてマウス肺の ICAM-1 の局在を検討し, normoxia では epithelial type I cell に分布しているが, hyperoxia では type II cell に強く発現していることを報告した²⁰⁾。さらに Piedboeuf らは ICAM-1 mRNA も高濃度酸素曝露により type II cell に強く発現するようになることを報告した²¹⁾。Type II cell の ICAM-1 発現が高濃度酸素による type I cell への分化の結果ではないかとも考えられるが, 彼らは ICAM-1 発現細胞には type II cell に特異的な SP-C mRNA が発現しており, type II cell が type I cell に分化した結果ではなく, 確かに type II cell に発現していることを証明している。type II cell に発現した ICAM-1 の役割は不明だが, 彼らはダメージをうけた type I cell の除去に関与し, repair に関わる可能性があるとして述べている。

4. Oxidant-induced growth arrest による epithelial cell の増殖抑制

1) に高濃度酸素による type II cell の増殖促進について述べてきたが, 逆に oxidant-induced growth arrest という現象も報告されている²²⁾。高濃度酸素曝露などの oxidant injury では細胞の増殖抑制が起こることが知られている。Oxidant 等による DNA 損傷からの防御機構として,

DNA が修復されるまで, 細胞の G1 期から S 期への進行が抑えられ, 細胞増殖が抑制される。しかし, type II cell の増殖が抑制され, type I cell への分化の開始が遅れると, 肺胞の再上皮化が遅れ, 肺線維化を招くことになると考えられる。Oxidant-induced growth arrest では特定の cyclin, cdk 等の抑制を介して増殖抑制がおこることが知られている²³⁾。Corroyer らは G1 期の進行に関わる cyclin E-CDK2 の活性が酸素曝露によって著しく低下していることを報告している²³⁾。彼らは CDK の阻害タンパク (CKIs) が同時に誘導され, CDK の活性を抑制していることを見いだした。さらに, TGF β 1 に対する抗体の投与により CDK の活性が回復することから TGF β 1 が CKIs の発現に関与する可能性を示唆している。TGF β 1 と同様に IGF も oxidant-induced growth arrest に関与するとの報告も見られる⁸⁾。TGF β や IGF が cyclin や cdk の発現に関与することはよく知られており^{24), 25)}, type II cell の増殖の調節に特に重要な役割を果たしているものと考えられる。

組織修復には oxidant-induced growth arrest の状態から脱して, type II cell の増殖が早く促進されることが重要であるが, 前述のように増殖促進機序, 再上皮化に必須の type I cell への分化の機序はまだ明らかではない。

Fibroblast の役割

高濃度酸素曝露により type II cell と同様に fibroblast の増殖がみられることが知られており¹⁾, 肺線維化の進展を引き起こす因子として重要であると考えられる。

1. Fibroblast の増殖

Fibroblast の増殖のメカニズムは明らかではないが, Kelleher らは高濃度酸素に曝露したラットから分離した fibroblast を用いて検討した結果, この fibroblast は air で飼育したラットから分離した fibroblast に比べて成長が早いことを報告している²⁶⁾。彼らはこの fibroblast は特定の growth factor は産生していないが, growth factor に対する感受性が増加している可能性を示し, さらに主に細胞周期の G1 期から S 期へ向かう時に合成される GTP-binding/hydrolysing protein をコードする c-Ha-ras 表現の増加が引

き起こされていることを報告した。高濃度酸素により産生増加する PDGF, IGF などの増殖因子が type II cell と同時に fibroblast の増殖を促進することも報告されている^{7),27)}。Fibroblast の増殖は修復機転として重要とは考えにくく、比較的高濃度酸素に対して感受性の低い細胞が異常増殖したものと考えられているようである⁹⁾。

2. Fibroblast-epithelial cell interaction

Type II cell と fibroblast が相互に関係しあっていることを示唆する多くの報告がある。Type II cell は fibroblast の成長を抑えるプロスタグランジン E2 を産生することが古い報告にあり²⁸⁾、type II cell が fibroblast の成長に関与することが知られている。また、fibroblast が type II cell の増殖、分化に関与することを示唆する報告もある。例えば、胎児肺の発生段階において、epithelial cell の増殖相から分化へ移行する時期に一致して球状の epithelial cell と fibroblast の cell-cell contact の発生率が増加すること²⁹⁾や、fibroblast-derived factor が胎児肺の type II cell のサーファクタント合成を誘導したとの報告がある¹⁰⁾。Adamson らは epithelial cell が傷害を受け、その修復が遅れると fibroblast の成長が促進されること、fibroblast と epithelial cell の contact が type II cell の成長、分化にとって重要な因子となることを示唆し、epithelial cell と fibroblast が相互に関係しあっている可能性について報告している³⁰⁾。Epithelial cell と fibroblast の interaction が酸素中毒での type II cell の増殖、分化に関与するか否かはわからないが、傷害に対する修復と線維化の進展の機序を知るうえでも今後興味をもたれるところである。

修復機転とアポトーシス

肺の修復と組織の remodeling は急性傷害の重傷度に強く影響されることは言うまでもない。Epithelial cell の傷害が長い期間継続したり、傷害の規模が大きくなると肺線維化が引き起こされやすいことが報告されている³⁰⁾。最近、急性炎症の緩和にアポトーシスが関与することが報告された。酸素中毒では肺への好中球の浸潤がおこるが、急性炎症で肺組織に集積したこれらの好中球は再び血管にもどらず、肺胞領域で破壊され(necrotic な細胞死)、その破片や膿は macrophage によっ

て処理されるものと考えられてきた。もちろんこの場合には好中球の細胞内にある多くのタンパク質分解酵素やミエロペルオキシダーゼ等の組織傷害性の物質が放出されることになり、生体にとって重大な問題となる。Cox らは Lipopolysaccharide (LPS) による肺急性傷害モデルを用いて、アポトーシスを引き起こしている好中球が増加すること、これらの apoptotic な好中球をマクロファージが貪食することを肺の組織で観察した³¹⁾。Apoptotic な好中球が生体にとって危険なメディエーターを細胞内に留めたままマクロファージに処理されることになるため、細胞内の危険なメディエーターが放出される necrotic な細胞死に比べて急性炎症の重傷度を緩和する機序となることが示唆される。細胞内の reactive oxygen species の増加によりアポトーシスが誘導されることが知られており³²⁾、高濃度酸素曝露においても同様の機序が働く可能性がある。

おわりに

酸素傷害の発生機序や修復過程、肺の線維化、気腫化の進展機序については未解決の点も多い。本稿では特に肺傷害の修復機転について述べた。近年、細胞の単離法の確立や細胞マーカーの開発、免疫組織化学や遺伝子解析などの手法が一般化したため、より詳細な研究ができるようになった。肺酸素傷害についてもさらに新しい手法を用いた新しい視点での研究が期待される。

【参考文献】

- 1) Klein J Normobaric pulmonary oxygen toxicity. *Anesth Analg*, 70, 195-207, 1990
- 2) Chvapil M, Peng YM Oxygen and lung fibrosis. *Arch Environ Health* 30: 528-832, 1975
- 3) Peagle RD, Spain D, Davis S. Pulmonary morphology of chronic phase of oxygen toxicity in adult rats. *Chest* 66:supple 7S-9S, 1974
- 4) Nici L, Medina M and Frackelton AR. The epidermal growth factor receptor network in type 2 pneumocytes exposed to hyperoxia in vitro. *Am J Physiol* 270: L242-L250, 1996
- 5) Witch H. Responses of the lung to toxic injury. *Envir Health Persp* 85, 5-13, 1990
- 6) Powel PP, Wang CC and Jones R Differential regulation of the genes encoding platelet-derived growth factor receptor and its ligand in rat lung during microvascular and alveolar

- wall remodeling in hyperoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7: 278-285, 1992
- 7) Han RNN, Buch S, Freeman RA, Post M and Tanswell AK Platelet-derived growth factor and growth-related genes in rat lung. II. Effect of exposure to 85% O₂. *Am J Physiol* 262: L140-L146, 1992
 - 8) Cazals V, Mouhieddine B, Maitre B, Bouc YL, Chadelat K, Brody JS and Clement A Insulin-like growth factors, their binding proteins and transforming growth factor- β 1 in oxidant-arrested lung alveolar epithelial cells. *J Biol Chem* 269: 14111-14117, 1994
 - 9) Everett MM, King RJ, Jones MB and Martin HM Lung fibroblasts from animals breathing 100% oxygen produce growth factors for alveolar type II cells. *Am J Physiol* 259: L247-L254, 1990
 - 10) Smith BT and Post M Fibroblast-pneumonocyte factor. *Am J Physiol* 257: L174-L178, 1989
 - 11) Ulich TR, Yi ES, Longmuir K, Yin S, Biltz R, Morris CF, Housley RM and Pierce GF Keratinocyte growth factor is a growth factor for type II pneumocytes in vivo. *J Clin Invest* 93: 1298-1306, 1994
 - 12) Miki T, Fleming TP, Bottaro DP, Rubin JB, Ron D and Aaronson SA Expression cDNA cloning of the KGF receptor by creation of a transforming autocrine loop. *Science* 251: 72-75, 1991
 - 13) Panos RJ, Bak PM, Simonet WS, Rubin JS and Smith LJ Intratracheal instillation of keratinocyte growth factor decreases hyperoxia-induced mortality in rats. *J Clin Invest* 96: 2026-2033, 1995
 - 14) Chedid M, Rubin JB, Csaky KG and Aaronson SA Regulation of keratinocyte growth factor gene expression by interleukin 1. *J Biol Chem* 269: 10753-10757, 1994
 - 15) Buckley S, Bui KC, Hussain M and Warburton D Dynamics of TGF- β 3 peptide activity during rat alveolar epithelial cell proliferative recovery from acute hyperoxia. *Am J Physiol* 271: L54-L60, 1996
 - 16) Bui KC, Buckley S, Wu F, Uhal B, Joshi I, Liu J, Hussain M, Makhoul I and Warburton D Induction of A- and D-type cyclins and cdc2 kinase activity during recovery from short-term hyperoxic lung injury. *Am J Physiol* 268: L625-L635, 1995
 - 17) Danto SI, Shannon JM, Borok Z, Zabski SM and Crandall ED Reversible transdifferentiation of alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12: 497-502, 1995
 - 18) Paine R, Gaposchkin D, Kelly C and Wilcoxon SE Regulation of cytokeratin expression in rat lung alveolar epithelial cells in vitro. *Am J Physiol* 269: L536-L544, 1995
 - 19) Welty SE, Rivera JL, Elliston JF, Smith CV, Zeb T, Ballantyne CM, Montgomery CA and Hansen TN Increases in lung tissue expression of intercellular adhesion molecule-1 are associated with hyperoxic lung injury and inflammation in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9: 393-400, 1993
 - 20) Kang B-H, Crapo JD, Wegner CD, Letts LG and Chang L-Y Intercellular adhesion molecule-1 expression on the alveolar epithelium and its modification by hyperoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9: 350-355, 1993
 - 21) Piedboeuf B, Frenette J, Petrv P, Welty SE, Kazzaz JA, and Horowitz S In vivo expression of intercellular adhesion molecule 1 in type II pneumocytes during hyperoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15: 71-77, 1996
 - 22) Imlay JA and Linn S DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240: 1302-1309, 1988
 - 23) Corroyer S, maitre B, Cazals V and Clement A Altered regulation of G1 cyclins in oxidant-induced growth arrest of lung alveolar epithelial cells. Accumulation of inactive cyclin E-CDK2 complexes. *J Biol Chem* 271: 25117-25125, 1996
 - 24) Wu F, Buckley S, Bui KC, Yee A, Wu HY, Liu J and Warburton D Cell cycle arrest in G0/G1 phase by contact inhibition and TGF- β 1 in Mv1Lu lung epithelial cells. *Am J Physiol* 270: L879-888, 1996
 - 25) Furlanetto RW, Harwell SE and Frick KK Insulin like growth factor- I induces cyclin-D1 expression in MG63 human osteosarcoma cells in vitro. *Mol Endocrinol* 8: 510-517, 1994
 - 26) Kelleher MD, Naureckas ET, Solway J and Hershenson MB In vivo hyperoxic exposure increases cultured lung fibroblast proliferation and c-Ha-ras expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12: 19-26, 1995
 - 27) Cambrey AD, Kwon OJ, Gray AJ, Harrison NK, Yacoub M, Barnes PJ, Laurent GJ and Chung KF Insulin-like growth factor I is major fibroblast mitogen produced by primary cultures of human airway epithelial cells. *Clin Sci Colch* 89: 611-617, 1995
 - 28) Taylor L, Polgar P, McAteer JA and Douglas

- WHJ Prostaglandin production by type II alveolar epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 572: 502-508, 1977
- 29) Adamson IYR and King GM Sex differences in development of fetal rat lung: Quantitative morphology of epithelial-mesenchymal interactions. *Lab Invest* 50: 461-468, 1984
- 30) Adamson IYR, Hedgecock C and Bowden DH Epithelial cell-fibroblast interactions in lung injury and repair. *Am J Pathol* 137: 385-392, 1990
- 31) Cox G, Crossley J and Xing Z Macrophage engulfment of apoptotic neurophils contributes to the resolution of acute pulmonary inflammation in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12: 232-237, 1995
- 32) Johnson TM, Yu ZX, Ferrans VJ, Iowenstein RA and Finkel T Reactive oxygen species are downstream demiators of p53 - dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11848-11852, 1996