

# Lipopolysaccharide (LPS) による肺炎症の 誘導機構と喫煙の影響

川 添 彩 香  
竹 内 実

(平成 25 年 9 月 6 日提出  
平成 25 年 11 月 29 日修正  
平成 25 年 12 月 19 日再修正)

## 要 旨

グラム陰性菌の内毒素である Lipopolysaccharide (LPS) は、様々な免疫活性を有し、大気中やタバコ煙にも含まれ、呼吸により肺胞領域に取り込まれる。肺胞領域に取り込まれた LPS は、肺に常在する肺胞マクロファージ (AM) と直接接触することが考えられる。また LPS の吸入は、肺に好中球を誘導し肺炎症を引き起こす。好中球は貪食や殺菌を行う免疫細胞で、好中球の集積や過剰な活性酸素種 (ROS) 産生は、周辺組織の傷害を引き起こし、炎症を増悪させることが考えられる。しかし、その機構については、まだ十分に解明されていない。そこで、LPS による肺への好中球の誘導機構と機能及びアポトーシスについて検討した。

マウスに LPS 60  $\mu$ g を経鼻投与後、気管支肺胞洗浄 (BAL) を行い、BAL 細胞を回収した。BAL 細胞数は LPS により有意に増加し、投与 24 時間後をピークに減少した。BAL 細胞の Dot Plot 解析の結果、LPS により好中球集団の出現が確認された。肺胞腔と肺間質に好中球の浸潤による炎症性変化が病理組織学的に認められた。好中球の肺への誘導機構を解明するため、AM の LPS 認識レセプターである TLR4 と CD14 の細胞表面発現とサイトカイン mRNA について検討した。TLR4 陽性細胞比率は、LPS により有意な差は認められなかったが、CD14 陽性細胞比率は有意な増加が認められ、また IL-1 $\beta$  と TNF- $\alpha$  及び CXCL1mRNA 発現も有意に増加した。AM の CXCL1mRNA 発現の増加が認められたため、肺好中球に対する AM 培養上清の走化活性について検討した。好中球の走化活性の指標である Direction (平均移動方向) と Velocity (平均移動速度) は、LPS 刺激 AM 培養上清で有意に増強した。好中球機能について末梢血と肺の好中球のサイトカインとサイトカインの産生に関する転写因子の mRNA 発現を検討した。肺好中球の IL-1 $\beta$  と TNF- $\alpha$  及び c-JUN mRNA 発現は、末梢血の好中球に比べ有意に増加したが、NF- $\kappa$ B mRNA 発現は有意な差は認められなかった。LPS が AM 以外に肺上皮細胞を刺激し好中球を誘導した可能性について、肺上皮細胞株 (LL/2) を用いて検討したところ、LPS 刺激により LL/2 は CXCL1mRNA 発現を有意に増加した。LPS により好中球の誘導が認められたことから、TLR4 欠損マウスを用いて検討したところ、LPS による好中球の肺への流入は認められなかった。

LPS 経鼻投与 48 時間後に好中球の減少が認められたことから、アポトーシスの可能性について検討した。Caspase-3 mRNA 発現比率と活性は、末梢血の好中球と比較して肺好中球で有意に増加し、肺好中球のアポトーシスが認められた。次にアポトーシス経路について外因性経路に含まれる Death receptor (CD95) 発現を検討したところ、肺好中球で有意な減少が認められた。一方、内因性経路の生産物である ROS 産生とその誘導酵素の NOX2mRNA 発現は、肺好中球で有意に増加した。

タバコ煙が AM の貪食能やサイトカイン産生能などの免疫機能を抑制することが報告されているが、LPS による好中球の誘導に対するタバコ煙の影響についてはまだ解明されていない。

そこで、マウスにタバコ主流煙を 10 日間曝露後、LPS 経鼻投与を行い、タバコ主流煙による好中球誘導への影響について検討した。

喫煙により AM の TLR4 と CD14 の発現が減少し、好中球の肺への誘導が抑制された。好中球機能について検討したところ、ROS 産生は喫煙により有意に増加したが、サイトカイン、ケモカイン及び関連する核転写因子 mRNA 発現の喫煙による影響は認められなかった。

以上より、LPS が肺内に入ると、AM と肺上皮細胞が TLR4 と CD14 を介して LPS を認識し IL-1 $\beta$  や TNF- $\alpha$  を産生することが明らかになった。さらに、これらのサイトカインによって活性化された AM が CXCL1 を産生することで、末梢血から肺間質を経て好中球が肺胞腔に誘導される可能性が示された。そして、肺に誘導された好中球は、c-JUN と NF- $\kappa$ B を介して IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  を産生し、Death receptor ではなく好中球内で産生された ROS によって Caspase-3 が活性化されアポトーシスを生じ、肺内の好中球が減少し炎症を収束させたと考えられる。また、喫煙は AM の LPS 認識機能を低下させ肺への好中球誘導を減少させたが、誘導された好中球機能には影響を及ぼさなかった。

キーワード：Lipopolysaccharide (LPS), 好中球, 肺胞マクロファージ, 免疫機能, 喫煙

## 1. 緒言

LPS はグラム陰性菌の細胞壁外膜の構成成分であり、主に多糖側鎖、オリゴ糖、リピド A が共有結合している大きな分子である。リピド A は、通常時細菌の細胞壁外膜の内側に存在し、細胞が破壊された時や宿主自然免疫に対して攻撃する時に放出され、宿主細胞に認識されて免疫機能が活性化される [1]。LPS は生活環境のありとあらゆる所に存在し、大気中やタバコ煙にも含まれている [2]。肺は外気と接する唯一の臓器である。大気中に含まれる細菌、ウイルス及び異物は、呼吸により肺の肺胞領域に達する。肺胞には、肺の恒常性を維持するために、免疫細胞である肺胞マクロファージ (AM) が多数在住している。AM の主な機能は、細菌や異物の貪食と活性酸素種 (ROS) 産生による殺菌、抗原提示、サイトカイン産生などである [3]。呼吸と共に LPS が取り込まれ肺胞領域に達し、AM と直接接触することが考えられる。LPS を吸入することにより肺炎症が誘導され、肺間質と肺胞内に好中球が浸潤することが知られているが [4-7]、まだその詳細な機構については解明されていない。

LPS による免疫応答は、LPS が細胞表面の補助因子である CD14 に結合して複合体を形成し、その複合体が TLR4 に結合することでシグナルが細胞内に伝達される [2]。それに引き続き、下流の核転写因子を活性化し、サイトカイン・ケモカインが産生される [8]。これら核転写因子には、c-JUN, NF- $\kappa$ B などがある。c-JUN は、MAPK カスケードの一つである c-Jun N-terminal kinase (JNK) にリン酸化されることにより転写活性が増大する癌原遺伝子である [9]。JNK 経路は、炎症性サイトカインやストレスにより活性化され、サイトカイン産生やアポトーシスに関わっていることが知られている [10]。NF- $\kappa$ B は、TLR4 シグナルの下流に存在する核転写因子であり、c-JUN と同様にサイトカインの産生やアポトーシスに関与している [9-11]。また LPS は

AM を刺激し、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインや好中球の走化性因子である CXCL1、CXCL2 ケモカインを産生させることが知られている。IL-1 $\beta$  は、単球やマクロファージなどから産生される内因性発熱物質である。TNF- $\alpha$  は主にマクロファージや好中球から産生され、IL-1 $\beta$  なども含めて炎症性サイトカインと総称される。これらの炎症性サイトカインは、細菌感染時の生体の初期防御因子として働く。CXCL1 は炎症時に局所へ好中球を遊走させるケモカインの一つであり、マウスでは GRO、KC、MIP-2 が含まれ [12]、これらのケモカインが LPS による肺への好中球の誘導に関係している。

好中球は、細菌感染やウイルスなどの様々な刺激に対して末梢血から組織に浸潤し、貪食や殺菌を行う免疫細胞であり、顆粒内の強力な殺菌能を有する細胞融解酵素や ROS を生成することで病原体の殺菌を行っている [13]。また、好中球の寿命は数時間とも言われ非常に短命で [9]、役目を終えた好中球はアポトーシスを引き起こし、マクロファージによって処理され細菌感染防御に対する反応を収束する [14]。アポトーシスの誘導は、外因性経路と内因性経路がある。外因性経路は、Fas や TNFR1 といった Death receptor が細胞外のリガンドと結合して多量体を形成し、これらレセプターの細胞内領域にあるドメインに Caspase-8 が結合する。この Caspase-8 により、アポトーシスの実行因子である Caspase-3 が活性化されることでアポトーシスを誘導する。一方、内因性経路は、ROS や DNA 損傷などで起こったミトコンドリアの傷害によってチトクロム C が放出され、これが Apaf-1 と結合することでアポトソームが形成される。このアポトソームにより、Caspase-9 が活性化され、Caspase-3 の活性化に至りアポトーシスが生じる [15–17]。好中球のアポトーシスの遅れや過剰な ROS の産生は、周辺組織の傷害を引き起こし、炎症を増悪させることが知られている [4, 18]。喫煙関連肺疾患である Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)、喘息及び Acute Respiratory Distress Syndrome/Acute Lung Injury (ARDS/ALI) などにおいて好中球数の増加が認められ、好中球はこれら肺疾患の発症及び増悪と深く関わっていると考えられている [19–21]。肺における好中球の誘導機構、機能及び細胞死を解明することは、炎症の慢性化を防ぐことに繋がるため、非常に意義があり、また LPS によって肺に誘導された好中球の機能とアポトーシスについては、まだ十分解明されていない。

喫煙は呼吸によって肺腔に到達するため、肺腔内に常在する AM に対して影響を及ぼす。我々の研究室では、以前より喫煙者の AM による NK 細胞活性の抑制や喫煙によるマウス AM の貪食能、サイトカイン産生能、抗原提示能及び抗体産生能などの免疫機能の抑制や喫煙曝露 AM による LPS 刺激 B 細胞増殖の抑制、ROS 産生増強とそれに伴う AM の DNA 損傷やアポトーシスの抑制を報告してきた [22–28]。しかし、LPS によって引き起こされた肺炎症及び誘導された好中球の機能に対する喫煙の影響については解明されていない。そこで今回、LPS 経鼻投与による好中球の誘導、機能及びアポトーシスについて検討すると共にタバコ主流煙曝露による肺炎症及び好中球機能への影響について検討した。

## 2. 材料及び方法

### 2.1 実験動物

実験動物は、8～10 週齢の C57BL/6 雌マウス（日本 SLC）を使用した。また、C3H/HeJ（日本 SLC）雌マウスを、TLR4 遺伝子欠損マウスとして使用した。尚、本研究の動物実験に関しては、京都産業大学動物実験規定に基づき同大学動物実験委員会により承認されたものである。

### 2.2 Lipopolysaccharide (LPS) の調製

LPS は、ナカライテスク株式会社より購入した。LPS を RPMI1640 (-) [(ナカライテスク), 100 U/ml ペニシリン（明治製菓）, 100  $\mu$ l/ml ストレプトマイシン（明治製菓）を含む, 以下 R(-) とする] で 10 mg/ml に希釈し、-20°C で保存した。

### 2.3 タバコ

タバコは、タバコ研究用標準タバコであるフィルター付き紙巻きタバコ CORESTA APPROVED MONITOR No.6（ニコチン 14.4 mg, タール 1.3484 mg, Borgwaldt technik）を使用した。

### 2.4 LPS の経鼻投与

LPS 経鼻投与は、前述したように希釈した LPS をクリーンベンチ内で 1 mg/ml になるように PBS(-) でさらに希釈した。マウスの腹腔内に PBS(-) で 20 倍希釈したソムノベンチル（共立製薬）0.3 ml を注射し麻酔をした後、マウス鼻腔に LPS 1 mg/ml を 10  $\mu$ l 滴下し、この操作を 6 回行い計 60  $\mu$ g/mouse 投与した。これを LPS 群とし、LPS 非投与マウスをコントロール (Control) 群とした。

### 2.5 タバコ主流煙のマウスへの曝露

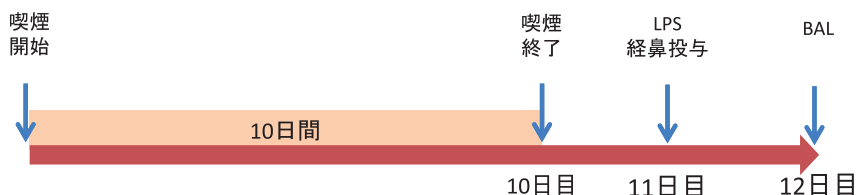
タバコ主流煙曝露は、タバコ主流煙発生装置 (M.I.P.S.) を用いて行った。マウスを一匹ずつチャンバーの中に入れ装置に差し込み、1 puff/35 ml/2 秒の主流煙（空気:タバコ煙 = 7:1）を 1 日 20 本、10 日間、曝露した。喫煙曝露 10 日間終了後、マウスに前述と同様に LPS を経鼻投与し、喫煙-LPS (Cigarette Smoke-LPS: CS-LPS) 群とした（図 1）。

### 2.6 気管支肺胞洗浄 (Broncho Alveolar Lavage: BAL)

LPS 経鼻投与後にマウスを麻酔死させた後、ハサミとピンセットを用いて腹部から頸部にかけて皮膚を切開し、肺及び気管を露出した。メスで気管に穴を開け、そこにノンベベル針 21G（テルモ）を差し込み、手術糸でノンベベル針を固定した。固定した針から 1 ml シリンジを用いて PBS(-) 1 ml を肺へ注入し、回収する操作を 5 回繰り返すことで BAL を行った。この回収



## a) 実験スケジュール



## b) マウスへの喫煙



喫煙装置 : 主流煙自動喫煙装置 (M.I.P.S.)

タバコ : CRESTA MONITOR No.6

(タール:14.40 mg,ニコチン:1.3484 mg)

喫煙条件 : 20 cigarettes/day

1 puff/2 sec/35 ml

air:smoke=7:1

図1 実験スケジュールとタバコ主流煙のマウスへの曝露

液を気管支肺胞洗浄液 (Broncho Alveolar Lavage Fluid: BALF) とした。

## 2.7 BAL 細胞の調製

前述の方法で得た BALF を 1000 rpm, 10 分, 4°C で遠心後, 上清を取り除き RPMI1640(+) [(ナカライテスク), 10%FCS, 100 U/ml ペニシリン (明治製菓), 100  $\mu$ l/ml ストレプトマイシン (明治製菓) を含む, 以下 R(+) とする] 0.5 ml で沈渣を懸濁した。この細胞浮遊液 10  $\mu$ l に 0.2% トリパンブルー 10  $\mu$ l を加え, 色素細胞排除試験法により生細胞数を測定し, 各細胞濃度に調整した。

## 2.8 サイトスピン標本の作製

サイトスピン標本の作製は, 前述の方法で得た BAL 細胞を R(+) で  $5 \times 10^5$  個/ml に調整した後, 100  $\mu$ l をスライドガラス上の遠心法浮遊細胞収集装置に滴下し, 500 rpm, 5 分間遠心し, 細胞をスライドガラスに貼り付け, ドライヤーで乾燥させた。その後メチルアルコールを滴下し 2 分放置し, メチルアルコールを乾燥させ, ギムザ染色液を滴下し, 30 分間染色した。染色後, スライドガラスの裏側から染色液を水道水で洗い流し, 乾燥させ, サイトスピン標本作製した。細胞形態を顕微鏡下で観察し, BAL 細胞 100 個を数え, 各細胞の比率を求めた。

## 2.9 肺泡マクロファージ (Alveolar macrophages: AM) の培養

96 穴細胞培養プレートに、2.7 節で得た AM を  $5 \times 10^5$  個/ml となるよう R(+) で調整した細胞浮遊液 100  $\mu$ l を加え、R(-) 100  $\mu$ l あるいは R(-) で 20  $\mu$ g/ml に希釈した LPS 100  $\mu$ l をそれぞれ加え、全量を 200  $\mu$ l/well にし、37°C のインキュベーターで 24 時間培養した。培養後、上清を取り除き、沈殿した細胞に SolutionD (4 M グアニジンチオシアン酸塩、25 mM クエン酸ナトリウム、0.5% N-ラウロイルサルコシナトリウム、0.1 M 2-メルカプトエタノール) 200  $\mu$ l を加えて細胞を溶解させ、-20°C で冷凍保存した。また、好中球の走化活性を測定するために、同様に AM を 3 時間培養後、培養上清を -80°C で保存した。

## 2.10 好中球の分離

末梢血好中球は、後大静脈より採血した末梢血から以下のとおり分離した。ヘパリン加 21G 付き注射器 (テルモ) を用いて採血した血液を等量の PBS(-) で希釈した。この希釈した血液を 3.5% デキストランでさらに等倍希釈し、室温で 30 分間静置し赤血球を沈降させた。30 分後、二層に分かれた内の白血球が含まれている上層を取り出し、PBS(-) 5 ml を加え、1000 rpm、5 分、4°C で遠心洗浄を行った。遠心後、上清を取り除き R(+) で 4 ml に再懸濁し、3 ml のリンパ球分離液 (ナカライテスク) の上に静かに重層させ、1500 rpm、30 分、20°C で遠心した。遠心後、三層の内の下層のみを残し、PBS(-) 5 ml を加え、1000 rpm、5 分、4°C で遠心洗浄を行った。遠心後、再度同様の方法で分離を行った。遠心後、得られた沈査に Lysis Solution ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , EDTA) 500  $\mu$ l を加え、赤血球を溶血後、1000 rpm、10 分、4°C で遠心した。遠心後、沈査に PBS(-) 5 ml を加え、1000 rpm、10 分、4°C で遠心洗浄し、得られた細胞を好中球とした。分離した好中球は、 $1 \times 10^5$  個/ml に調整した。その細胞浮遊液 100  $\mu$ l を 1.5 ml チューブに入れ、1000 rpm、10 分、4°C で遠心した。遠心後、沈査に SolutionD 200  $\mu$ l を加えて細胞を溶解させ、-20°C で冷凍保存した。尚、分離した好中球の純度は 95% 以上であった。

## 2.11 Lewis Lung Carcinoma 2 細胞 (LL/2) の培養

継代維持した LL/2 を DMEM(+) で  $1 \times 10^5$  個/ml に調整した。この細胞浮遊液 1 ml を DMEM(+) 1 ml が入った 12 穴細胞培養プレート (CORNING) に播き、細胞を 24 時間培養した。培養終了後、上清を取り除き、DMEM(+) 1 ml と DMEM(-) あるいは DMEM(-) で 10  $\mu$ g/ml に希釈した LPS を 1 ml ずつ添加し、24 時間培養した。培養後、上清を取り除き、冷たい PBS(-) を 1 ml 添加し、プレートシェイカーで 30 秒間振盪した。振盪後、よくピペettingし、細胞を回収した。同様の方法でもう一度細胞を回収し、色素細胞排除試験法により生細胞数を測定した。測定後、細胞を  $1 \times 10^6$  個/ml に調整し、そのうち 100  $\mu$ l を 1.5 ml チューブに入れ、1000 rpm、4°C、10 分で遠心した。遠心後、上清を取り除き、沈査に SolutionD 200  $\mu$ l を加えて細胞を溶解させ、-20°C で冷凍保存した。

## 2.12 Dot Plot と細胞表面抗原

Dot Plot と細胞表面抗原を測定するため、BAL 細胞に Lysis Solution 500  $\mu$ l を加えて赤血球を溶血後、1000 rpm、5 分、4°C で遠心した。遠心後、上清を取り除き、沈査に PBS(-) 5 ml を加えて遠心洗浄し、上清を取り除き、沈査に R(+) を加え、 $5 \times 10^6$  個/ml となるよう調整した。Dot Plot は、この細胞浮遊液 100  $\mu$ l を FACS Calibur (BD) で取り込み、FSC (Forward Scatter: 前法散乱光) 値と SSC (Side Scatter: 側方散乱光) 値を測定し、Control 群と LPS 群を比較した。細胞表面抗原は以下の操作を行い測定した。細胞浮遊液 100  $\mu$ l に、PE (Phycoerythrin) 標識の抗 Gr-1 抗体 (BD Bioscience)、抗 CD14 抗体 (BD Bioscience)、抗 TLR4 抗体 (eBioscience)、抗 CD95 抗体 (BD Bioscience) をそれぞれ 0.5  $\mu$ g/2.5  $\mu$ l を加え、PBS(-) を全量 200  $\mu$ l になるように加え、45 分、4°C、暗所で反応させた。反応後、FACS Buffer 2 ml を加え、1000 rpm、10 分、4°C で遠心し、上清を取り除いた。その後、沈査に FACS Buffer を 300  $\mu$ l 加え、FACSCalibur により各サンプル 5000 個の細胞を取り込み、FL-2 (Fluorescence-2: 赤色蛍光) の値を測定し陽性細胞の比率を求めた。

## 2.13 サイトカイン、ケモカイン、核転写因子、Caspase-3 及び NOX2 の mRNA 発現

### 2.13.1 全 RNA の抽出

2.9, 2.10, 2.11 節で得た細胞抽出液から AGPC 法により全 RNA を抽出した。細胞抽出液 200  $\mu$ l, H<sub>2</sub>O-phenol 200  $\mu$ l, 2 M Sodium Acetate 20  $\mu$ l, CIAA 80  $\mu$ l を加えて混合し、15000 rpm、4°C、5 分間遠心した。遠心後、上清 180  $\mu$ l を新しい 1.5 ml チューブに取り 100%エタノール 400  $\mu$ l を加え、攪拌した後-20°C で 1 時間静置した。1 時間後、15000 rpm、4°C、30 分間遠心し、上清を取り除き、solutionD 300  $\mu$ l, Phenol/CIAA 300  $\mu$ l を加え、攪拌した後、15000 rpm、20°C、5 分間遠心した。遠心後、100%エタノール 700  $\mu$ l が入った 1.5 ml チューブに上清 300  $\mu$ l を加え、攪拌した後-20°C で 1 時間静置した。1 時間後、15000 rpm、4°C、20 分間遠心し上清を取り除き、75%エタノール 1000  $\mu$ l を加え、攪拌した後、15000 rpm、4°C、10 分間遠心した。遠心後、上清を取り除き、アスピレーターを用いて減圧下で 15 分間乾燥させ、これを全 RNA とした。

### 2.13.2 cDNA の作製

上記で調製した全 RNA に、dH<sub>2</sub>O 10  $\mu$ l, Random Hex (宝酒造) 1  $\mu$ l を加えて攪拌し、65°C、5 分静置し、5 分後氷上でさらに 5 分間静置した。その後、25 mM dNTP 0.8  $\mu$ l, 0.1 M DTT (invitrogen) 4  $\mu$ l, 5 $\times$ First-Strand Buffer (invitrogen) 8  $\mu$ l, dH<sub>2</sub>O 15.2  $\mu$ l, MLV (invitrogen) 1  $\mu$ l を順に加え、攪拌し 15000 rpm で軽く遠心後、37°C で 45 分間静置し、全 RNA から cDNA への逆転写反応を行った。この後、65°C 10 分間の熱処理により MLV を失活させ、10 分間氷中で静置した。これを cDNA サンプルとした。

## 2.13.3 PCR

PCR は、前項で示した方法で得た cDNA 1  $\mu$ l を 0.2 ml チューブにとり、sense, anti-sense (in-vitrogen) プライマー ( $\beta$ -actin, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , CXCL1, Caspase-3, NOX2, NF- $\kappa$ B, c-JUN) をそれぞれ 0.75  $\mu$ l, dH<sub>2</sub>O 7.5  $\mu$ l, Go-Taq 10  $\mu$ l 加え攪拌し、軽く遠心後 PCR 装置を用いて cDNA を増幅させた。なお 1 サイクルは 95°C denature, 56°C annealing, 72°C extension を各 30 秒とし、指数関数的増幅の範囲内で 30~35 サイクル PCR を行い半定量的な mRNA 発現を求めた。プライマーは以下の配列のものを使用した。

$\beta$ -actin (250 bp) サイクル数：30

sense 5'-GCATTGTTACCAACTGGGAC-3'

antisense 5'-TCTCCGGAGTCCATCACAAT-3'

IL-1 $\beta$  (290 bp) サイクル数：30

sense 5'-AGCTACCTGTGTCTTTCCCG-3'

antisense 5'-GTCGTTGCTTGTTCTCCTT-3'

TNF- $\alpha$  (253 bp) サイクル数：30

sense 5'-GATGCTACCAAACCTGGAGATAATC-3'

antisense 5'-GGTCCTTAGCCACTCCTTCTGTG-3'

CXCL1 (107 bp) サイクル数：35

sense 5'-AACCGAAGTCATAGCCACAC-3'

antisense 5'-ACTTGGGGACACCTTTTAGC-3'

Caspase-3 (242 bp) サイクル数：30

sense 5'-CTCCCTACGGTGGGATTACA-3'

antisense 5'-AGCTGCAGAGCCTTCTCAAG-3'

NOX2 (278 bp) サイクル数：30

sense 5'-GACTGCGGAGAGTTTGGAAG-3'

antisense 5'-ACTGTCCACCTCCATCTTG-3'

NF- $\kappa$ B (283 bp) サイクル数：34

sense 5'-CTCCCTACGGTGGGATTACA-3'

antisense 5'-AGCTGCAGAGCCTTCTCAAG-3'

c-JUN (163 bp) サイクル数：30

sense 5'-CATAGCCAGAACACGCTTCC-3'

antisense 5'-AGTTGCTGAGGTTGGCGTAG-3'

#### 2.13.4 電気泳動

40% アクリルアミド 7 ml, dH<sub>2</sub>O 27.75 ml, 10×TBE 1.75 ml, TEMED 44 μl, 10% APS 350 μl を混合し, 8% アクリルアミドゲルを作製した. その後, 前述したように得られた PCR 産物 18 μl をゲルの溝に流し込み, 40 mA, 120 分で電気泳動を行った. 分子量マーカーは, pBR322 DNA-MSP I Digest 1 μl を使用し, 同様に電気泳動を行った. 電気泳動後, ゲルをエチジウムブロマイドで 20 分間染色し, 蒸留水で軽く洗浄したのち, 遺伝子定量解析システムで PCR 増幅産物のバンドを検出した. 検出したバンドは Scion Image (Scion Corporation) を使用して解析を行い, それぞれの半定量的サイトカイン mRNA の発現は, サイトカイン mRNA/β-actin の比率で示した.

#### 2.14 走化活性

好中球の走化活性は, LPS によって肺に誘導された好中球を用い, 水平式走化活性測定装置 EZ-TAXIScan (GE ヘルスケア) を使用して測定した. チップの各チャンネルに好中球を一列に並べた. 好中球を注入した反対側に, 前述の 2.7 で調製した非刺激 AM 培養上清, LPS 刺激 AM 培養上清, R(-), LPS, 陽性コントロールとして KC (20 μg/ml) (Peprotech) を 0.75 μl ずつ注入し濃度勾配を作った. その後, 37°C で 1 時間, 15 秒間隔で細胞の動きを撮影し, TAXIScan Analyzer 2 の Cell Tracking ソフトを用いて, 好中球の Direction (移動方向性) と Velocity (移動速度) を解析した.

#### 2.15 Caspase-3/7 活性

好中球の Caspase-3/7 活性は Caspase-Glo<sup>®</sup>3/7 Assay (Promega) を用いて測定した. 前述の 2.10 で分離した好中球をルシフェラーゼ発光測定用白色 96well 細胞培養プレートに  $1 \times 10^4$  個/100 μl/well ずつ加え, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下で 3 時間培養したのち, プレートをインキュベーターから取り出し, 室温になるまで放置した後, 各 well に Caspase-Glo 3/7 Reagent を 100 μl ずつ加えた. プレートシェイカーで 30 秒振盪し, 室温で 1 時間放置した. 反応終了後, Wallac 1420 マルチラベルカウンター (PerkinElmer) を用いて蛍光を測定した.

#### 2.16 細胞内活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) の産生

好中球の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生は, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) を用いて測定した. DCFH-DA は細胞膜を透過し細胞質内に取り込まれ, 二酢酸塩部分の酵素的切断を受けて蛍光を発し

ない dichlorofluorescein (DCFH) を生成する。膜非透過性の DCFH は細胞内に留まり、 $\text{H}_2\text{O}_2$  により酸化され、蛍光を発する dichlorofluorecein (DCF) になることから DCF の蛍光を測ることで  $\text{H}_2\text{O}_2$  産生量を測定することができる [29]。2.4 節で得られた細胞を R(+) で  $1 \times 10^6$  個/ml に調整した。この細胞浮遊液 100  $\mu\text{l}$  に R(+) をさらに加えて 990  $\mu\text{l}$  にし、0.2 mM DCFH-DA (LAMBDA) を 10  $\mu\text{l}$  加え、37°C、15 分間振盪反応を行った。反応終了後、PBS(+) を加え、1000 rpm、10 分間遠心洗浄を行い、上清を取り除き、FACS Buffer を 300  $\mu\text{l}$  加え、FACSCalibur を用いて、 $\text{H}_2\text{O}_2$  産生細胞陽性比率を測定した。一方、前述の 2.10 で得られた好中球を 550  $\mu\text{l}$  の R(+) で懸濁し、細胞浮遊液を調製した。この細胞浮遊液 100  $\mu\text{l}$  に R(+) をさらに加えて 990  $\mu\text{l}$  にし、2 mM DCFH-DA を 10  $\mu\text{l}$  加え、37°C、15 分間振盪反応を行った。反応終了後、25 mM EDTA を 500  $\mu\text{l}$  加えて、1000 rpm、5 分、4°C で遠心洗浄した。遠心後、沈査に Lysis Solution 500  $\mu\text{l}$  を加えて、1000 rpm、5 分、4°C で遠心した。遠心後、沈査に PBS(-) 1 ml を加えて、1000 rpm、5 分、4°C で遠心洗浄した。遠心後、上清を取り除き、FACS Buffer を 300  $\mu\text{l}$  加え、FACSCalibur を用いて、 $\text{H}_2\text{O}_2$  産生細胞陽性比率を測定した。

## 2.17 肺組織切片標本の作製

### 2.17.1 パラフィン包埋と薄切切片

Control 群、LPS 群のマウスを麻酔死させた後、全肺組織を摘出し 10% 中性緩衝ホルムアルデヒド液（ナカライテスク）で 24 時間固定した。固定した全肺組織をユニカセットに入れて 24 時間流水洗浄し、オーキネット (HANDEX) を用いて脱水処理【70%エタノール（4 時間）、80%エタノール（2 時間）、90%エタノール（2 時間）、95%エタノール（2 時間）、100%エタノール I（2 時間）、100%エタノール II（2 時間）、100%エタノール III（2 時間）】、脱アルコール処理【キシレン I（1 時間）、キシレン II（1 時間）、キシレン III（1 時間）】、さらにパラフィン包埋処理【パラフィン I（2 時間）、パラフィン II（2 時間）】を行い、ティッシュテックを用いて肺組織のパラフィンプロックを作製した。組織薄切切片の作製は以下のように行った。ミクロトームでパラフィンプロックから厚さ 4  $\mu\text{m}$  の切片を作成し、スライドグラスにのせて蒸留水で切片を貼り付け、40~50°C の温浴上に切片を入れてしわを伸ばし、伸展した切片をスライドグラス上にのせて乾燥させた。

### 2.17.2 ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色

前述したように得た薄切切片に脱パラフィン処理【キシレン I（5 分）、キシレン II（5 分）】、脱キシレン処理【100%エタノール I（5 分）、100%エタノール II（5 分）、70%エタノール（5 分）】を行った後、ヘマトキシリン (MERCK) で 5 分染色、20 分流水水洗した。さらにエオジン（武藤化学）で 30 分染色、過剰染色洗浄処理【70%エタノール I（5 秒）、80%エタノール（5 秒）、90%エタノール（5 秒）、100%エタノール I（5 秒）、100%エタノール II（5 秒）】を行った。透

徹処理【キシレン I (5 分), キシレン II (5 分), キシレン II (5 分)】を行い, カバーガラスをのせ, ピオライト (応研商事) で封入し, 組織切片を一晩乾燥させ, 顕微鏡で観察した.

## 2.18 有意差検定

有意差検定は, すべての実験において平均値 (mean) と標準偏差 (standard deviation: S.D.) を求め, student's t test により Control 群と LPS 群, または LPS 群と CS-LPS 群を比較し,  $p < 0.05$  を有意とした.

## 3. 結果

### 3.1 LPS 投与による BAL 総細胞数への影響

1 匹のマウスより BAL によって回収された総細胞数は, Control 群で  $1.68 \pm 0.6 \times 10^5$  個 (mean  $\pm$  S.D.) であった. 一方, LPS 群は投与後 24 時間で  $1.12 \pm 3.2 \times 10^6$  個, 48 時間で  $6.17 \pm 0.8 \times 10^5$  個, 72 時間で  $2.66 \pm 1.1 \times 10^5$  個であった. 全ての時間で Control 群と比較して, LPS 群において有意な増加 (24 時間:  $p < 0.001$ , 48 時間:  $p < 0.001$ , 72 時間:  $p < 0.05$ ) が認められた (図 2). 総細胞数は, LPS 投与後 24 時間をピークに徐々に減少した.

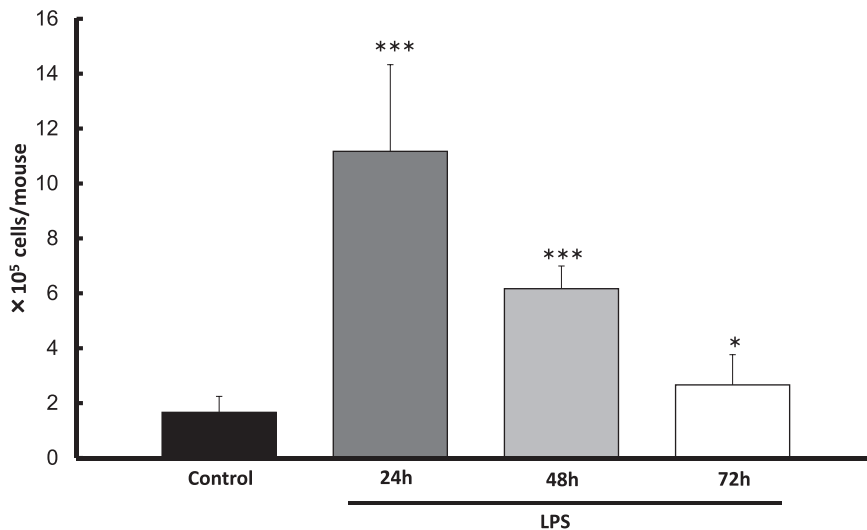


図 2 LPS 投与による BAL 総細胞数への影響

\*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ , mean  $\pm$  S.D.

### 3.2 BAL 細胞の Dot Plot に対する LPS の影響

BAL の総細胞数の増加が認められたため、Flow Cytometry の Dot Plot への LPS の影響について検討した。Dot Plot の解析により、Control 群で FSC 値 240~600, SSC 値 120~440 の領域に細胞集団が認められ、LPS 群では FSC 値 200~400, SSC 値 40~240 と FSC 値 400~680, SSC 値 160~520 の領域にそれぞれ細胞集団が確認された。Control 群の細胞集団は 1 つであったのに対し、LPS 群では大きさ、細胞内部構造が異なる 2 つの細胞集団が出現した (図 3a)。

### 3.3 BAL 細胞の形態に対する LPS の影響

LPS 経鼻投与により、BAL の総細胞数の増加や Dot Plot における新たな細胞集団が認められたため、形態学的に検討した。肺胞マクロファージ (AM) の比率は、Control 群で  $99.00 \pm 1.0\%$  (mean  $\pm$  S.D.), LPS 群で  $12.40 \pm 5.0\%$  であり、Control 群と比較して有意な ( $p < 0.001$ ) 減少が認められた。好中球の比率は、Control 群で  $1.60 \pm 1.1\%$ , LPS 群で  $86.80 \pm 5.2\%$  であり、Control 群と比較して有意な ( $p < 0.001$ ) 増加が認められ、増加した好中球には、多くの分葉核が認められた (図 3b)。リンパ球の比率は、Control 群で  $1.40 \pm 0.9\%$ , LPS 群で  $1.2 \pm 1.3\%$  であり、Control 群と比較して有意な差は認められなかった (図 3c)。

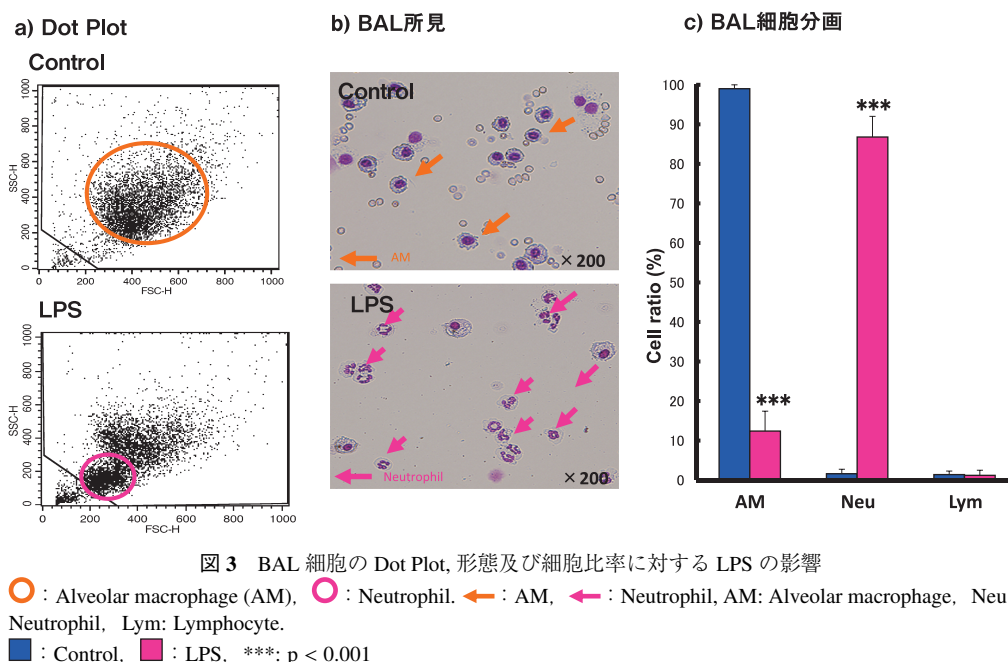


図 3 BAL 細胞の Dot Plot, 形態及び細胞比率に対する LPS の影響



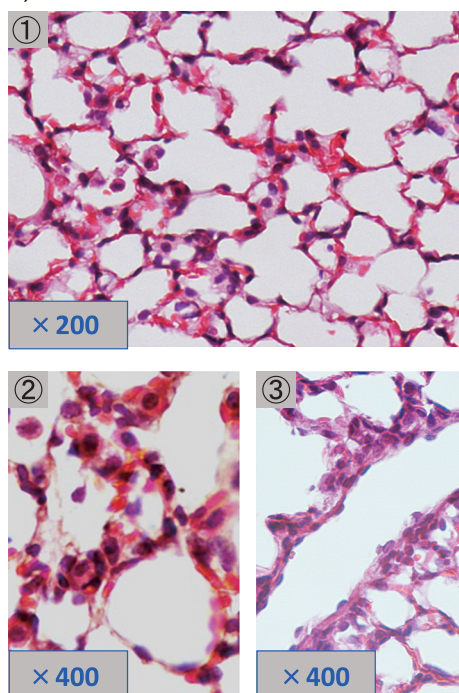
### 3.4 肺組織への LPS の影響

BALF 中に好中球数の増加が認められたため、LPS 経鼻投与による、肺組織の炎症程度を確認するため、肺の薄切切片を作製し、H&E 染色を行い評価した。Control 群と比較して LPS 群において肺葉中心部に炎症性変化が観察され、肺胞腔、肺間質に好中球の浸潤と肥厚化が認められ、肺胞腔が消失していた。また、肺胞間質と肺胞腔内に出血が認められた。さらに血管周囲にも炎症性変化が観察され、血管から肺胞腔に向かって好中球の浸潤が観察された (図 4)。

### 3.5 AM の LPS 認識レセプター発現への LPS の影響

LPS によって肺胞腔に好中球が誘導されたことから、AM の LPS 認識レセプターである TLR4 とその補助因子の CD14 の細胞表面発現について検討した。AM の TLR4 陽性細胞比率は、Control 群で  $50.66 \pm 7.4\%$  (mean  $\pm$  S.D.), LPS 群で  $47.84 \pm 7.8\%$  であり、Control 群と比較して、有意な差は認められなかった。AM の CD14 陽性細胞比率は、Control 群で  $23.49 \pm 3.5\%$ , LPS 群で  $35.88 \pm 7.4\%$  であり、Control 群と比較して有意な ( $p < 0.05$ ) 増加が認められた (図 5a)。

#### a) Control群



#### b) LPS群

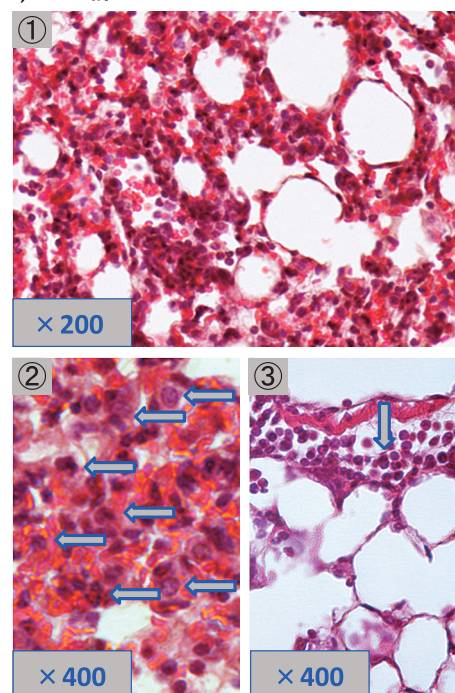



図 4 肺組織所見への LPS の影響

①：肺胞腔、②：肺間質、③：血管周囲、：Neutrophil

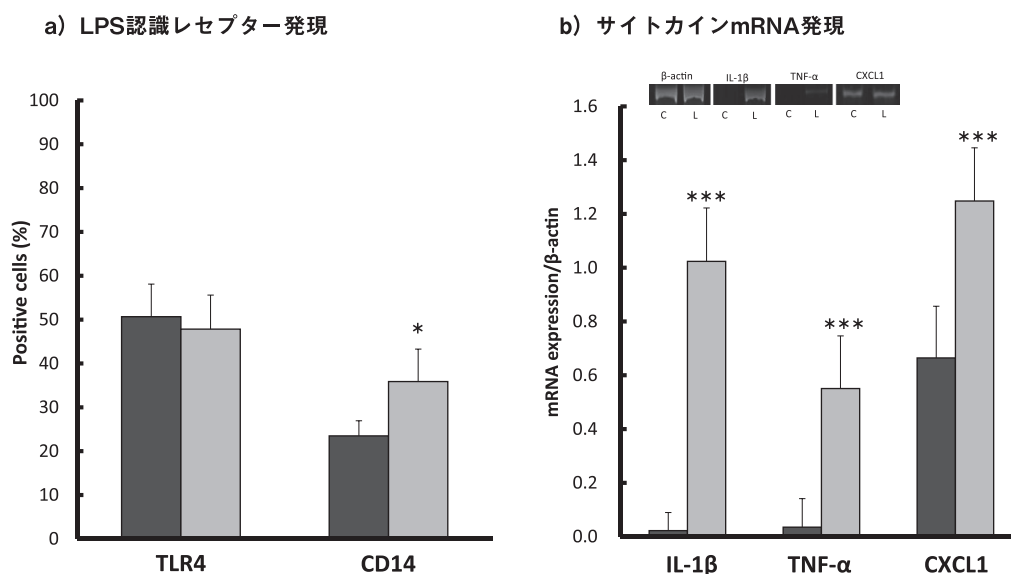


図5 LPS投与による肺胞マクロファージ (AM) のLPS 認識レセプターとサイトカイン mRNA 発現への影響  
 ■ : Control, □ : LPS, C: Control, L: LPS, \*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$

### 3.6 LPS 刺激による AM のサイトカイン mRNA 発現への影響

肺胞腔への好中球の浸潤が認められたため, AM の炎症及び好中球誘導に関わるサイトカインとケモカイン mRNA 発現について検討した. IL-1β mRNA 発現は LPS 非刺激群  $0.0 \pm 0.1$  (mean  $\pm$  S.D.), LPS 刺激群  $1.0 \pm 0.2$  であった. TNF-α mRNA 発現は LPS 非刺激群  $0.0 \pm 0.1$ , LPS 刺激群  $0.6 \pm 0.2$  であった. CXCL1 mRNA 発現は LPS 非刺激群  $0.7 \pm 0.2$ , LPS 刺激群  $1.2 \pm 0.2$  であった. 全てのサイトカイン mRNA の発現において LPS 非刺激群と比較して, LPS 刺激群で, 有意な ( $p < 0.001$ ) 増加が認められた (図 5b).

### 3.7 LPS によって誘導された好中球に対する AM 培養上清の走化活性への影響

LPS 刺激により AM の CXCL1 mRNA 発現の増強が認められたことから, AM 培養上清中に好中球に対する走化活性があることが示唆された. そこで, LPS によって誘導された好中球に対する AM 培養上清の走化活性を測定した. AM 培養上清において, 30 分, 60 分後の時点で遊走する多くの好中球が認められた (図 6). 好中球の走化性の指標である Direction (平均移動方向) と Velocity (平均移動速度) について解析したところ, Direction は, R(-) で  $0.08 \pm 0.1$  Radian (Rad: mean  $\pm$  S.D.), LPS 刺激 AM 培養上清で  $0.31 \pm 0.1$  Rad であり, 好中球の走化性を有意に ( $p < 0.001$ ) 増強した. また, Velocity は, R(-) で  $0.06 \pm 0.1$   $\mu\text{m}/\text{sec}$  で, LPS 刺激 AM 培養上清で  $0.11 \pm 0.0$   $\mu\text{m}/\text{sec}$  であり, Direction と同様に有意な ( $p < 0.001$ ) 増強が認められた. LPS

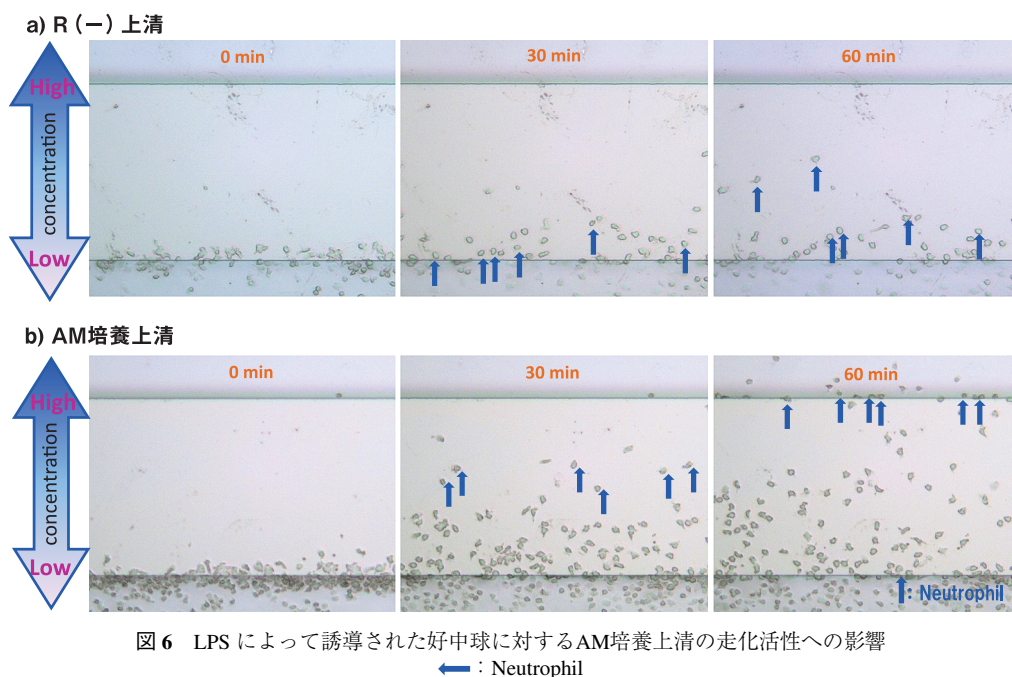


図6 LPSによって誘導された好中球に対するAM培養上清の走化活性への影響

← : Neutrophil

の走化活性は、好中球の Direction · Velocity, それぞれ  $0.11 \pm 0.1$  Rad,  $0.05 \pm 0.0$   $\mu\text{m}/\text{sec}$  であり, R(-) と比較して有意な差は見られず, LPS には走化活性が認められなかった (図7).

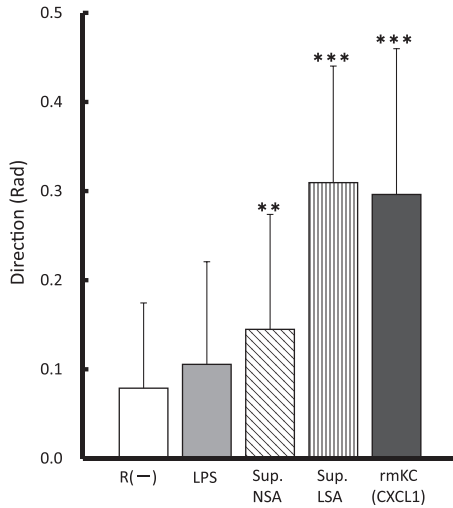
### 3.8 LPS による好中球のサイトカイン mRNA 発現への影響

肺に誘導された好中球の走化性が増強したため, LPS 経鼻投与による好中球の機能的変化について, 末梢血好中球と肺好中球のサイトカイン mRNA 発現を比較検討した. IL-1 $\beta$  mRNA 発現は, 末梢血好中球で  $0.49 \pm 0.04$  (mean  $\pm$  S.D.), 肺好中球で  $1.02 \pm 0.11$  であった. TNF- $\alpha$  mRNA 発現は, 末梢血好中球で  $0.04 \pm 0.02$ , 肺好中球で  $0.28 \pm 0.11$  であった. 肺好中球の IL-1 $\beta$  と TNF- $\alpha$  の mRNA 発現は, 末梢血好中球と比較して有意 ( $p < 0.001$ ) に増加した. CXCL1 mRNA 発現は, 末梢血好中球で  $1.57 \pm 0.75$ , 肺好中球で  $0.99 \pm 0.26$  であり, 末梢血好中球と肺好中球との間に有意な差は認められなかった (図8a).

### 3.9 LPS による好中球の炎症性サイトカインに関わる転写因子の mRNA の発現亢進

LPS 経鼻投与により好中球の炎症性サイトカイン mRNA 発現が増強していたため, TLR4 シグナル経路の下流に存在し, これら炎症性サイトカイン増強に関係する核転写因子である c-JUN 及び NF- $\kappa$ B mRNA 発現について検討した. c-JUN mRNA 発現は, 末梢血好中球で  $0.07 \pm 0.16$  (mean  $\pm$  S.D.), 肺好中球で  $0.46 \pm 0.13$  で, 末梢血好中球と比較して有意 ( $p < 0.001$ ) に増加した.

## a) Direction



## b) Velocity

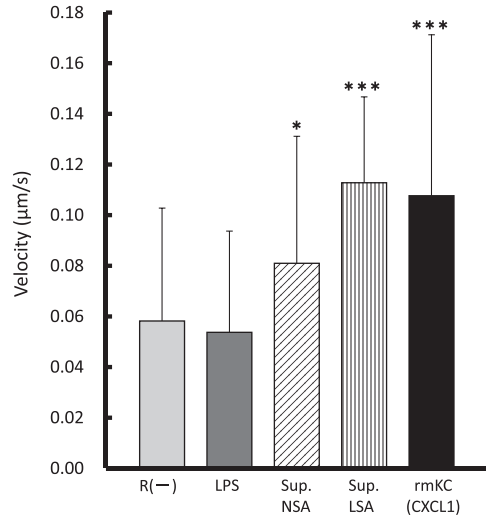
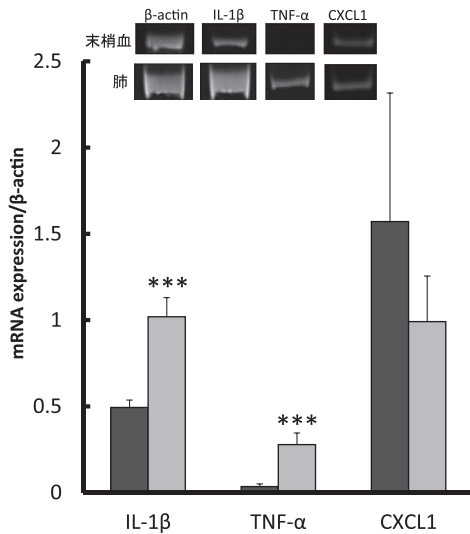


図7 LPS誘導好中球に対するAM培養上清のDirectionとVelocityへの影響

Sup.NSA: 非刺激AM培養上清, Sup.LSA: LPS刺激AM培養上清, LPS: LPS1 mg/ml, rmKC: 20 ng/ml, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$

## a) サイトカインmRNA発現



## b) 核転写因子のmRNA発現

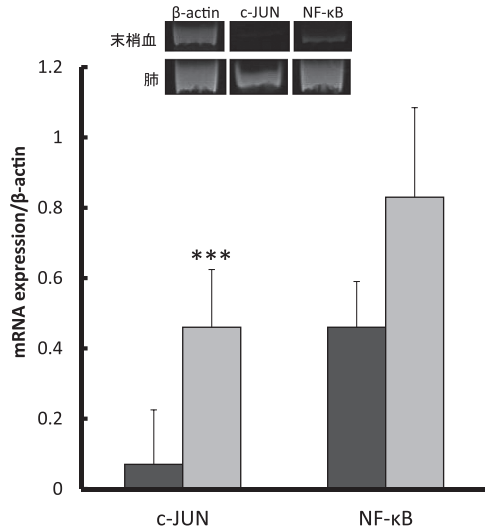


図8 LPSによる好中球のサイトカイン、ケモカイン及び核転写因子のmRNA発現への影響

■: 末梢血の好中球, □: 肺の好中球, \*:  $p < 0.05$

一方、NF- $\kappa$ B mRNA 発現は末梢血好中球で  $0.53 \pm 0.16$ 、肺好中球で  $0.83 \pm 0.25$  であり、末梢血好中球と比較して増加傾向は認められたが、有意差は認められなかった (図 8b)。

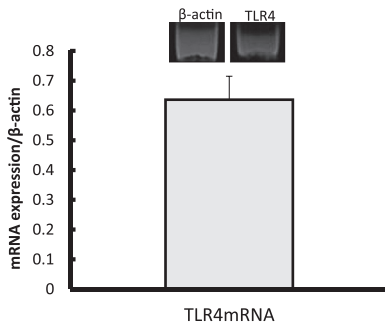
### 3.10 LL/2 の LPS 認識レセプターとケモカイン mRNA 発現

肺は、AM と気管支及び肺胞上皮細胞から構成される。そのため、AM 以外に肺上皮細胞が LPS の刺激を受ける可能性について、肺上皮細胞株 LL/2 を用いて検討した。LL/2 は、TLR4 遺伝子を発現しており、その細胞表面に TLR4 タンパク質の発現が認められた (図 9a,b)。LL/2 の CXCL1 発現は、LPS 非刺激群で  $0.49 \pm 0.07$  (mean  $\pm$  S.D.) で、LPS 刺激群で  $0.64 \pm 0.11$  で、LPS 非刺激群と比較して有意 ( $p < 0.05$ ) に増加した (図 9c)。

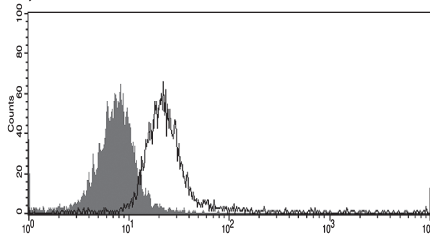
### 3.11 LPS による好中球誘導と TLR4 の関与

AM と肺上皮細胞が TLR4 を介して LPS を認識して、CXCL1 を産生し、好中球を誘導させたことが示唆された。そのため、TLR4 欠損マウスを用いて LPS 経鼻投与による影響について検討した。TLR4 欠損マウス 1 匹当たりの BAL 総細胞数は、Control 群で  $0.45 \times 10^5$  個で、LPS 群で  $1.05 \times 10^5$  個であった。TLR4 欠損マウスでは、LPS による BAL 総細胞数の有意な増加と好

a) TLR4 mRNA 発現



b) TLR4 細胞表面発現



c) CXCL1 mRNA 発現

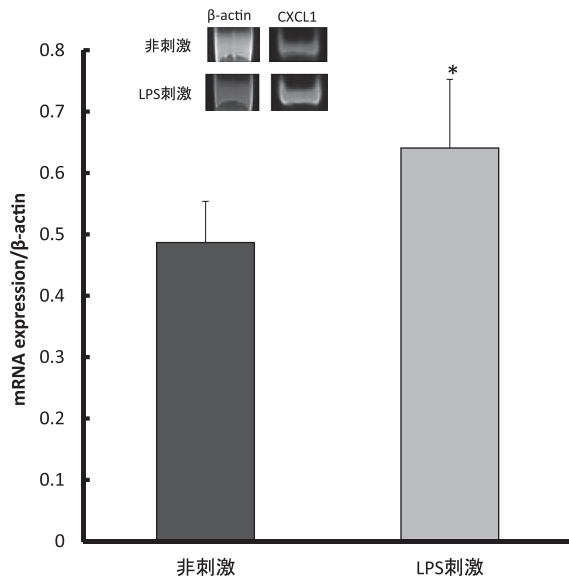


図 9 LL/2 の LPS 認識レセプターとケモカイン mRNA 発現

— : 陰性細胞, — : 陽性細胞, ■ : Control, ■ : LPS, \*:  $p < 0.05$



中球の流入はほとんど認められなかった (図 10).

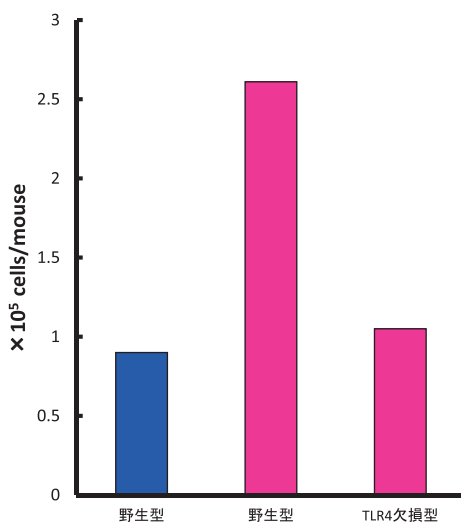
### 3.12 LPS による好中球のアポトーシス誘導

LPS 経鼻投与後, BAL 総細胞数は 24 時間をピークに時間を追うごとに減少したことから, 肺胞内に誘導された好中球は, アポトーシスを起こし炎症を収束させた可能性が示唆された. そのため, アポトーシスの実行因子である Caspase-3 の mRNA 発現および活性について検討した. 好中球の Caspase-3 mRNA 発現比率は, 末梢血で  $0.54 \pm 0.13$  (mean  $\pm$  S.D.), 肺で  $0.92 \pm 0.09$  であり, 末梢血と比較して有意 ( $p < 0.05$ ) に増加した (図 11a). 好中球の Caspase-3 活性は, 末梢血で  $5238.8 \pm 1789.32$  RLU, 肺で  $7487.2 \pm 1323.66$  RLU であり, 末梢血と比較して有意 ( $p < 0.05$ ) に増加した (図 11b). また, LPS 経鼻投与 48 時間後に好中球を細胞内に取り込んだ肺胞マクロファージが観察された (図 12a).

### 3.13 LPS による好中球の Death receptor (CD95) 発現の変化

LPS により肺好中球の Caspase-3 mRNA と活性が増強され, アポトーシスを引き起こしたことから, アポトーシス経路 (図 13) について, まず外因性経路に含まれる Death receptor (CD95) の発現について検討した. 好中球の CD95 陽性細胞比率は, 末梢血で  $99.14 \pm 0.17\%$  (mean  $\pm$  S.D.),

a) BAL 総細胞数



b) BAL 所見

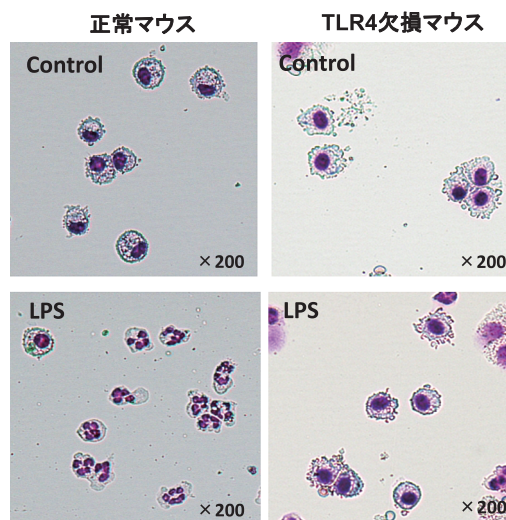


図 10 LPS による好中球誘導と TLR4 の関与

■ : Control, ■ : LPS

肺で  $93.73 \pm 3.19\%$  であり、末梢血と比較して有意な ( $p < 0.01$ ) 減少が認められた (図 12b)。

### 3.14 LPS による好中球の ROS の産生亢進

Caspase-3 の活性が高まっていたにも関わらず、Death receptor (CD95) の発現は減少していたこ

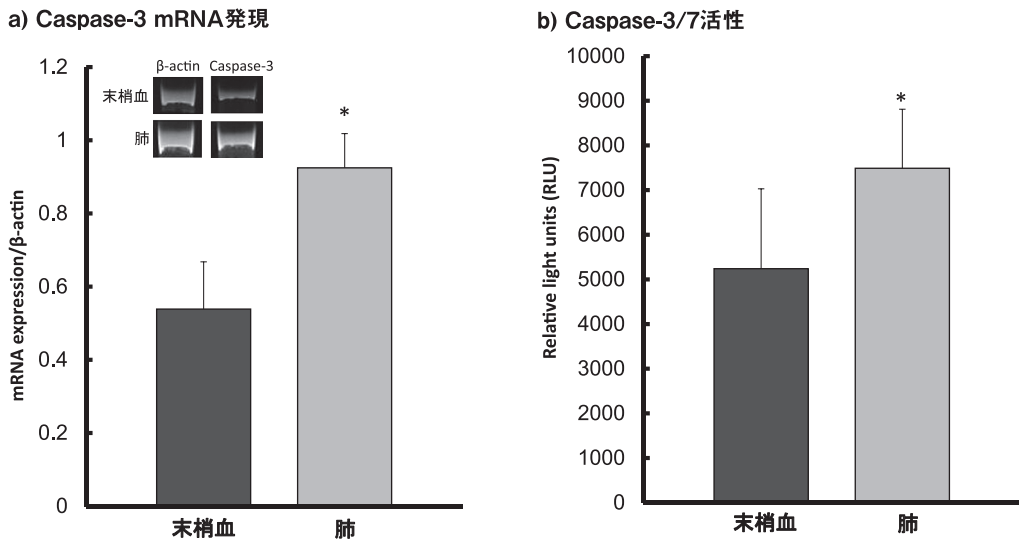


図 11 LPS による好中球の Caspase-3mRNA 発現及び Caspase-3/7 活性への影響  
\*:  $p < 0.05$

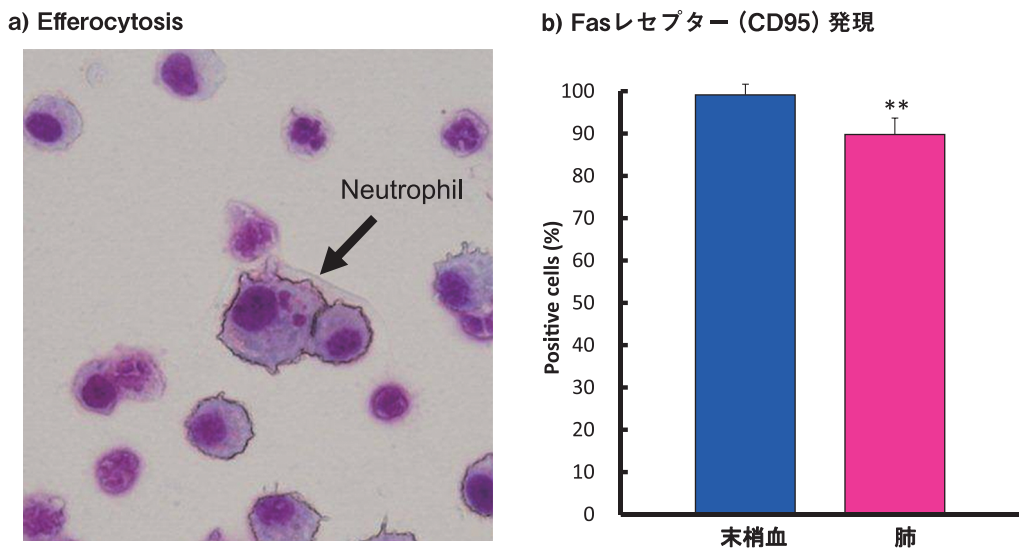


図 12 LPS による好中球の Fas レセプター (CD95) 発現への影響  
←: AM 内に取り込まれた好中球, \*\*:  $p < 0.01$

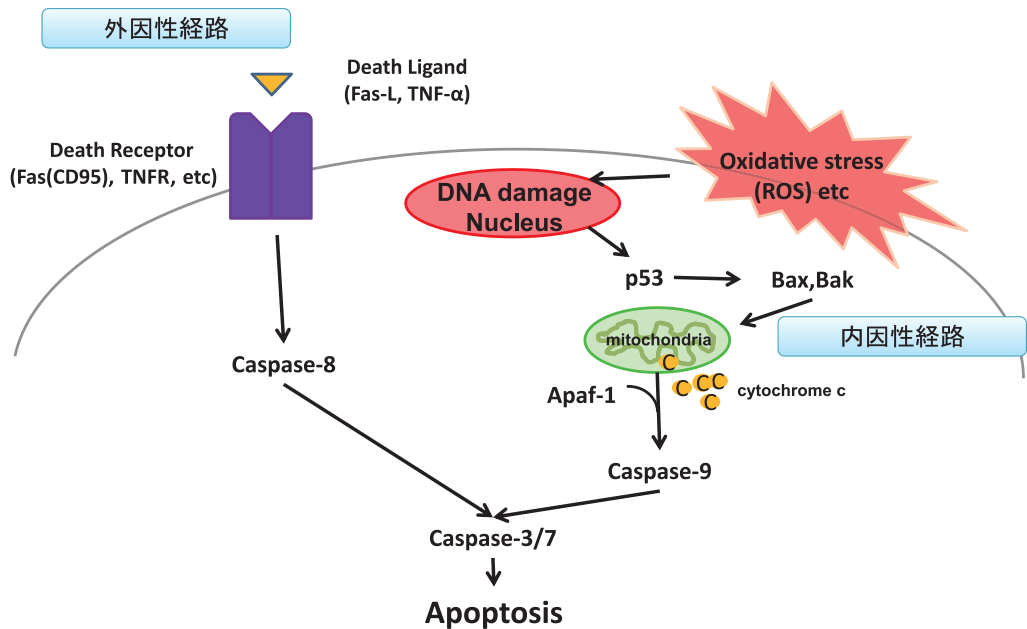


図 13 アポトーシスの経路

とから、アポトーシスの内因性経路の一つである ROS の産生とその誘導酵素である NOX2mRNA 発現について検討した。好中球の NOX2mRNA 発現は、末梢血で  $0.03 \pm 0.07$  (mean  $\pm$  S.D.), 肺で  $0.26 \pm 0.16$  であり、末梢血と比較して有意 ( $p < 0.05$ ) に増加した (図 14a)。また、好中球の  $H_2O_2$  の産生細胞比率は末梢血で  $50.69 \pm 12.08\%$ 、肺で  $88.99 \pm 1.84\%$  であり、末梢血と比較して有意な ( $p < 0.05$ ) 増加が認められた (図 14b)。

### 3.15 喫煙による BAL 総細胞数の変化

喫煙による LPS 誘導性肺炎症に対する影響について検討した。マウス 1 匹の BAL 総細胞数は、LPS 群で  $1.12 \pm 3.2 \times 10^6$  個 (mean  $\pm$  S.D.), CS-LPS 群で、 $1.12 \pm 3.6 \times 10^6$  個であり、有意な差は認められなかった (図 15a)。

### 3.16 喫煙による BAL 細胞比率の変化

AM の比率は LPS 群で  $16.28 \pm 4.20\%$  (mean  $\pm$  S.D.), CS-LPS 群で  $27.15 \pm 1.97\%$  であり、LPS 群と比較して有意な ( $p < 0.01$ ) 増加が認められた。好中球の比率は LPS 群で  $83.73 \pm 4.20\%$ 、CS-LPS 群で  $72.85 \pm 1.97\%$  であり、LPS 群と比較して喫煙により有意な ( $p < 0.01$ ) 減少が認められた (図 15b)。



## a) NOX2 mRNA発現

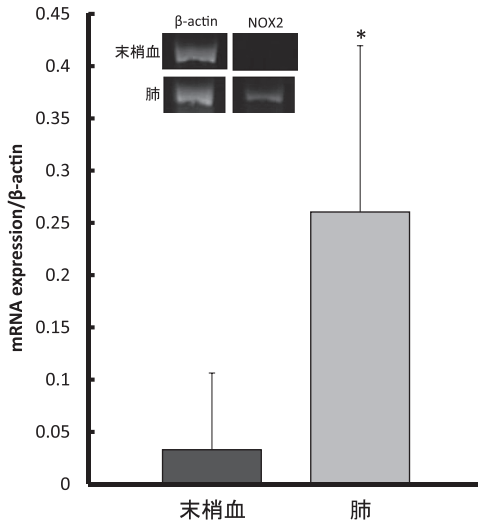
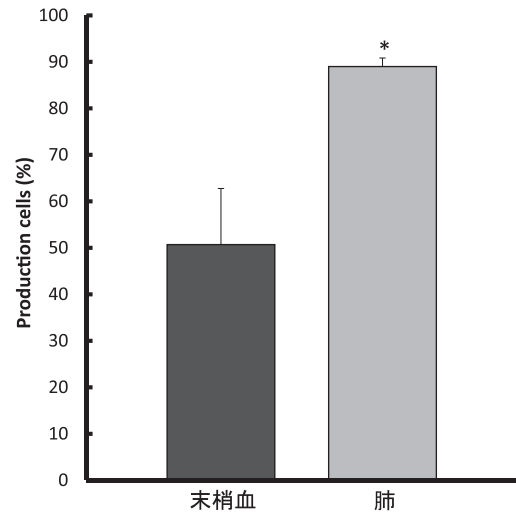
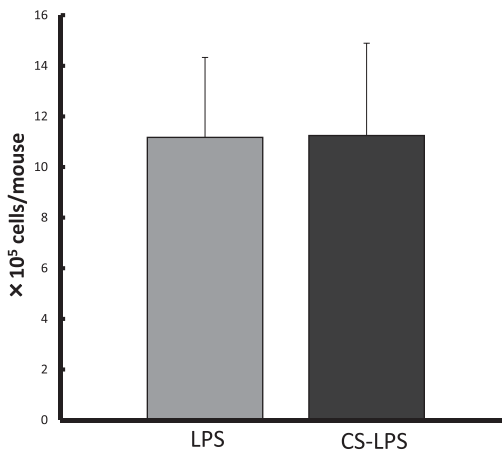
b) 細胞内H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>産生

図 14 LPS による好中球の ROS 産生への影響  
\*:  $p < 0.05$

## a) BAL総細胞数



## b) 細胞分画

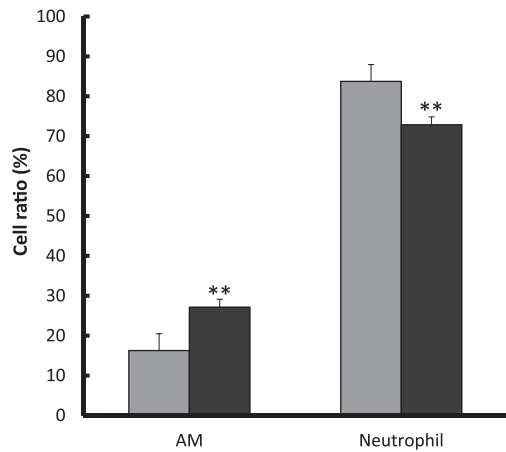


図 15 喫煙による BAL 総細胞数と細胞比率の変化  
■ : NS-LPS, ■ : CS-LPS, \*\*:  $p < 0.01$

## 3.17 喫煙による AM と好中球の LPS 認識レセプター発現の変化

喫煙が LPS による肺胞腔への好中球の流入を減少させたため, AM 及び好中球の TLR4 と CD14 の発現について検討した. AM の TLR4 陽性細胞比率は, LPS 群で  $31.72 \pm 5.83\%$  (mean  $\pm$  S.D.), CS-LPS 群で  $10.35 \pm 1.66\%$  であった. AM の CD14 陽性細胞比率は, LPS 群で  $23.93 \pm 7.55\%$ ,

CS-LPS 群は、 $6.12 \pm 2.82\%$  であった。AM の TLR4 と CD14 陽性細胞比率は、喫煙により有意（それぞれ  $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ ）に減少した（図 16a）。好中球の TLR4 陽性細胞比率は LPS 群で  $31.72 \pm 5.83\%$ , CS-LPS 群で  $10.35 \pm 1.66\%$  であった。好中球の CD14 陽性細胞比率は、LPS 群で  $23.93 \pm 7.55\%$ , CS-LPS 群は、 $6.12 \pm 2.82\%$  であった。好中球の TLR4 と CD14 陽性細胞比率も、喫煙により有意（それぞれ  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ）に減少した（図 16b）。

### 3.18 喫煙による好中球の ROS 産生の変化

喫煙は AM の ROS 産生を増強させることが知られているため、好中球の ROS 産生について検討した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生は LPS 群の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生細胞比率を 1.0 とした場合、CS-LPS 群では  $1.74 \pm 0.17$  (mean  $\pm$  S.D.) で、LPS 群と比較して有意 ( $p < 0.001$ ) に増加した（図 17a）。

### 3.19 喫煙による好中球のサイトカイン、ケモカイン及び核転写因子 mRNA 発現の変化

喫煙により好中球の TLR4 と CD14 の発現が減少していたため、そのシグナル経路の下流に存在する核転写因子とそれにより誘導される炎症性サイトカインについて検討した。IL-1 $\beta$  mRNA 発現は LPS 群で  $0.93 \pm 0.36$  (mean  $\pm$  S.D.), CS-LPS 群で  $0.83 \pm 0.227$  であった。TNF- $\alpha$  mRNA 発現は LPS 群で  $0.81 \pm 0.26$  で、CS-LPS 群で  $0.58 \pm 0.26$  であった。CXCL1 mRNA 発現は LPS 群で  $0.96 \pm 0.21$ , CS-LPS 群で  $0.91 \pm 0.0$  であった。c-JUN mRNA 発現は LPS 群で  $0.51 \pm 0.21$ , CS-LPS 群で  $0.50 \pm 0.07$  であった。NF- $\kappa$ B mRNA 発現は、LPS 群で  $0.96 \pm 0.17$ , CS-LPS 群で  $0.88 \pm 0.26$

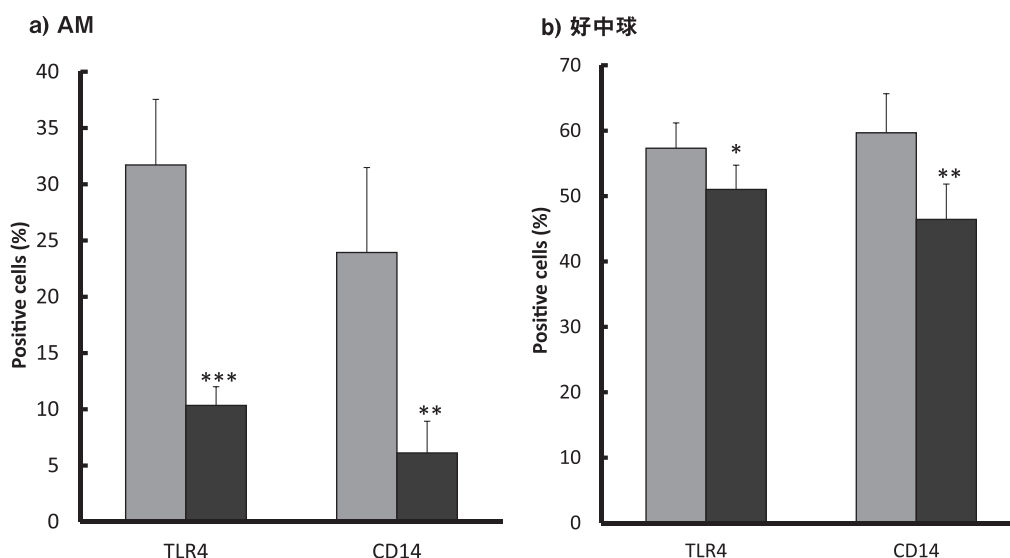
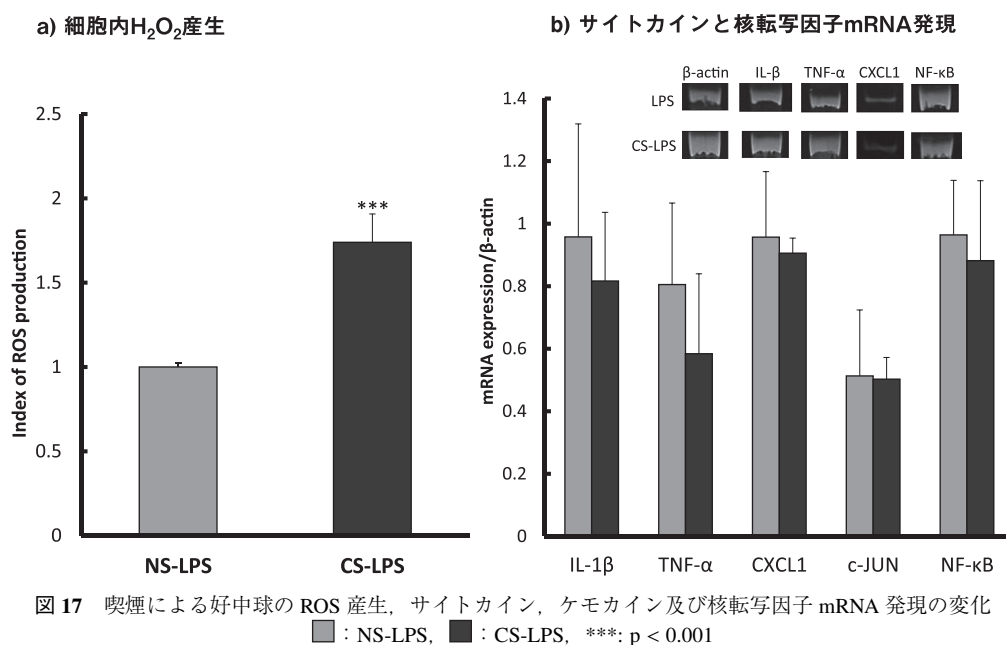


図 16 喫煙による AM と好中球の LPS 認識レセプターの発現の変化  
 ■ : NS-LPS, ■ : CS-LPS, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$



であった。全てのサイトカイン、ケモカイン及び核転写因子 mRNA 発現は、喫煙により変化は認められなかった (図 17b)。

#### 4. 考察

LPS はグラム陰性菌の細胞壁外膜の構成成分であり、主に多糖側鎖、オリゴ糖及びリピド A が共有結合している大きな分子である。グラム陰性菌の毒性の大部分は、リピド A 部分であり、この領域が宿主の細胞に認識されシグナルが誘導される。リピド A は、通常時細菌の細胞膜の内側に存在するため、細胞が破壊された時や宿主自然免疫に対して攻撃する時に細菌から放出される [1]。LPS は、生活環境のありとあらゆる所に存在し、大気中やタバコの煙にも含まれている [2]。これらの LPS と共に大気中に含まれる細菌やウイルス及び異物は、呼吸により肺に取り込まれ肺胞領域に達する。肺胞には、肺の免疫細胞である肺胞マクロファージ (AM) が多数常在している。肺胞領域に取り込まれた LPS は、AM と直接接触することが考えられる。AM の主な機能は、細菌や異物の貪食と活性酸素種 (ROS) 産生による殺菌、抗原提示及びサイトカイン産生などである [3]。LPS はまず細胞表面の補助因子である CD14 に結合し、複合体を形成する。その複合体が、TLR4 に結合することで、シグナルが細胞内に伝達され [24]、それに引き続き、下流の核転写因子を活性化し、サイトカイン・ケモカインを産生させる [29]。また LPS を吸入することにより肺炎症が誘導され、肺間質及び肺胞内に好中球が浸潤することが知られ

ている [2, 4-7].

好中球は、細菌感染やウイルスなどの様々な刺激に対して末梢血から組織に浸潤し、貪食や殺菌を行う免疫細胞であり、顆粒内の強力な殺菌能を有する細胞融解酵素や ROS を生成することで病原体の殺菌を行っている。最近、好中球には、炎症を誘導する N1 型と免疫を抑制する N2 型に分けられることが報告されている [47]。好中球の寿命は数時間とも言われ非常に短命な細胞であり [9]、役目を終えた好中球は、アポトーシスを引き起こし、マクロファージによって処理され炎症を収束する [14]。しかし、好中球のアポトーシスの遅れ、過剰な ROS やエラスターゼの産生は、周辺組織の傷害を引き起こし、炎症を増悪させることが知られている [4, 18]。喫煙と関連する肺疾患である Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)、喘息及び Acute Respiratory Distress Syndrome/Acute Lung Injury (ARDS/ALI) などにおいて好中球数の増加が認められ、好中球はこれら肺疾患の発症及び増悪とも深く関わっていると考えられている [19-21]。肺における好中球の誘導機構、機能及び細胞死を解明することは、炎症の慢性化を防ぐことに繋がるため、非常に意義がある。また、LPS によって肺に誘導された好中球の機能とアポトーシスについては、まだ十分に解明されていない。そこで今回、LPS による好中球の肺への誘導機構、機能及びアポトーシスへの影響について調べるため、マウスに LPS を経鼻投与し、BAL 総細胞数、細胞比率、細胞表面抗原、サイトカイン mRNA 発現、好中球の走化活性、Caspase-3 の活性及びアポトーシス経路について検討した。

BAL 総細胞数は、Control 群と比較して LPS 経鼻投与により 24 時間、48 時間、72 時間において有意に増加し、LPS 投与後 24 時間をピークに徐々に減少した。BAL 総細胞数増加については、ヒトでの LPS 吸入とマウスでの経鼻投与や気管支内投与で報告され [2, 4-7]、マウスでは LPS 吸入曝露 24 時間後に BAL 総細胞数がピークとなることが報告されており [30]、本研究とは LPS 濃度に違いはあるが、結果は同様であった。

BAL 細胞の Dot Plot への影響に関して、Control 群の細胞集団は 1 つであったのに対し、LPS 群では大きさ、細胞内部構造が異なる新たな 1 つの細胞集団が出現し 2 つの細胞集団が認められた。Control 群と LPS 群に共通して認められた集団は、肺に常在する AM であった。形態学的所見から、LPS 群において好中球が認められ、LPS 群の Dot Plot に新たに出現した細胞集団は好中球であった。そのため、BAL 総細胞数の増加は、好中球によるものであることが示された。好中球数の増加による BAL 総細胞数の増加が、マウスの LPS 経鼻投与、ヒトの LPS 吸入及びラットの気管支内投与によって報告されており [2, 4-7, 31]、本研究は動物種、LPS 濃度および投与経路に違いはあるが、同様の結果が得られた。

BALF 中に好中球数の増加が認められたため、肺組織の炎症を病理組織学的に評価した。Control 群と比較して LPS 群において、肺胞腔、肺間質に好中球の浸潤と肥厚化、また、肺胞間質と肺胞腔内に出血が認められ、肺胞腔が消失して特に肺葉中心部に炎症性変化が観察された。また、血管から肺胞腔に向かって好中球の遊走と浸潤が認められ、血管周囲にも炎症性変化が強く観

察された。Eduardo らが LPS を気管支内投与したマウスの肺において、浮腫、肺胞出血、炎症性細胞の浸潤、肺胞上皮や内皮細胞の破壊などの炎症性変化を報告しており、投与方法は異なるが今回の結果も同様であった [32]。

LPS により BAL 総細胞数が増加し、肺胞腔に好中球が誘導された結果から、その誘導機構を解明するため、AM の LPS 認識レセプターである TLR4 とその補助因子の CD14 [7, 33] の細胞表面発現について検討した。LPS は、まず LPS-binding protein (LBP) と結合し、それらは CD14 と結合して複合体を形成する [2, 34, 35]。その複合体が細胞膜表面上の TLR4 と結合することで細胞内に情報が伝達される [2, 35]。TLR4 陽性細胞比率は、LPS 経鼻投与により有意な差は認められなかったが、CD14 陽性細胞比率は、有意な増加が認められた。ICR マウスにおける LPS 吸入実験において TLR4 発現は、ウエスタンブロッティングと RT-PCR の両方で 24 時間後に最大に達し、その後徐々に減少することや CD14 発現が増加することが報告されている [7]。今回 LPS により TLR4 発現は変化しなかったが、CD14 発現の増加が認められたことから、TLR4 陽性細胞比率は 24 時間以前に増加し、その後減少した可能性が考えられた。

AM の LPS 認識レセプターである CD14 が増加し、肺胞腔内への好中球の浸潤及び流入が生じた結果から、AM が産生する好中球の誘導と活性化に関係する IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  及び CXCL1 mRNA 発現について検討した。炎症性サイトカインやケモカインは、CD14 と TLR4 を介して細胞内に伝えられた情報が核転写因子に伝わることで産生されることが知られている [2]。今回、LPS 刺激により、AM の IL-1 $\beta$  と TNF- $\alpha$  及び CXCL1 mRNA 発現は、有意に増加した。LPS 刺激によりヒト AM の IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、GRO- $\alpha$  の産生が有意に増強することが報告されており [7, 36]、マウスを用いた今回の研究結果と同様であった。また、in vivo の実験において、LPS 気管支内投与ラットの AM の TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MIP-2 及び KC の mRNA 発現増加が報告されている [37, 38]。これら報告と今回の結果より、LPS 経鼻投与により、肺胞腔に到達した LPS は AM に認識され、AM が炎症性サイトカインとケモカインを産生し、肺に好中球を誘導した可能性が示唆された。

LPS 刺激により AM の CXCL1 mRNA 発現の増強が認められたことから、LPS によって誘導された好中球に対する AM 培養上清の走化活性について検討した。好中球の走化性の測定は、従来から中間部分が膜で仕切られた well やチャンバーを使用し、膜の下にある走化性因子に対して細胞がどれだけ膜を通り抜けて移動するかを測定することで評価されてきた [39, 40]。この方法では一方向のみでしか細胞の走化性を評価出来ず、細胞の詳細な動きを正確に測定することが出来ない。本研究で使用した EZ-TAXIScan は、水平上で細胞の動きを評価でき、さらに動画として測定できるためより詳細な細胞の動きが正確に観察できるのが特徴である。この方法で測定開始から 30 分及び 60 分後に、AM 培養上清に向かって遊走する多くの好中球が認められた。走化活性の指標である Direction (平均移動方向) と Velocity (平均移動速度) について解析したところ、好中球の Direction と Velocity は、LPS 刺激 AM 培養上清で有意に増強したが、LPS の好中球に対する走化活性は認められなかった。マウス AM 培養上清中に好中球に対する

走化活性が認められることはまだ報告されておらず、この報告が最初である。ヒト AM の LPS 刺激培養上清に抗 GRO- $\alpha$ 、抗 IL-8 を加えると好中球の走化性が抑制される報告や、LPS に刺激された C57BL/6 マウスの好中球と Balb/c マウスの骨髓中の好中球が KC に対して走化性を示す報告がある [10, 39, 40]。これらの報告と今回の LPS 刺激により AM の CXCL1 mRNA 発現が増加した結果から、LPS 刺激 AM 培養上清中に CXCL1 が含まれている可能性が示唆された。

LPS 刺激培養上清中に好中球の走化活性が認められたため、肺に誘導された好中球の機能について検討した。末梢血好中球と肺の好中球のサイトカイン mRNA 発現を *in vivo* で比較検討した。肺好中球の IL-1 $\beta$  と TNF- $\alpha$  mRNA 発現は、末梢血好中球と比較して有意に増加した。この結果は、LPS 気管支内投与により誘導されたラット好中球の IL-1 $\beta$  と TNF- $\alpha$  mRNA 発現増加の報告 [37] と実験動物種は異なるが、同様であった。*in vitro* でヒト、ラット及びマウスの末梢血好中球の IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  mRNA 発現は、LPS 刺激により増強されることが報告されている [2, 37, 41]。しかし、*in vivo* での肺に誘導された好中球の炎症性サイトカインの産生は、報告されていない。末梢血好中球と肺好中球の CXCL1 mRNA 発現は、有意な差は認められなかった。この結果から、ケモカイン産生は末梢血と肺の好中球で差が無いことが示された。

LPS により好中球の IL-1 $\beta$  と TNF- $\alpha$  mRNA 発現が増強していたため、TLR4 シグナル経路の下流に存在し、これら炎症性サイトカインに関係する核転写因子 c-JUN と NF- $\kappa$ B mRNA 発現について検討した。肺好中球の c-JUN mRNA 発現は、末梢血好中球と比較して有意に増加した。以前に LPS 曝露によって、肺に誘導された好中球の c-JUN のリン酸化が誘導され、逆に JNK 阻害剤投与により、好中球の肺への誘導と BALF 中のケモカイン産生が減少されることが報告されている [42, 43]。肺好中球の NF- $\kappa$ B mRNA 発現に有意差は無かったが、増加傾向が認められた。これらの結果より、好中球の IL-1 $\beta$  と TNF- $\alpha$  mRNA 発現は、c-JUN と NF- $\kappa$ B 発現の増加による可能性が考えられたが、これらの転写因子のリン酸化については今後検討する必要があると思われる。

LPS が AM 以外に肺上皮細胞を刺激し、好中球を誘導した可能性について、肺上皮細胞株 LL/2 を用いて検討した。LL/2 細胞では、TLR4 遺伝子を発現しており、その遺伝子産物の細胞膜タンパク質である TLR4 の発現も確認した。また、LL/2 細胞において、LPS 刺激により CXCL1 発現が有意に増加した。上皮細胞における TLR4 の発現については、これまでにヒトの肺上皮 II 型細胞、肺上皮 II 型細胞株 A549 及び気道上皮細胞株 NHBE で TLR4 の遺伝子と細胞表面の発現が報告されている [36, 44]。また、LPS や細菌曝露の上皮細胞への影響については、LPS 吸入曝露により肺上皮細胞の TLR4 発現が増加することや、肺炎桿菌の感染により A549 細胞が IL-8 を産生することが報告されている [7, 44]。本研究の結果は、LL/2 上皮細胞でも TLR4 を介して LPS が好中球を誘導することを示しており、異なる種類の上皮細胞でも同様の結果が認められた。

LPS が TLR4 を介して肺に好中球を誘導した結果から、好中球誘導に TLR4 が関与している可

能性について、TLR4 遺伝子欠損マウスを用いて検討した。TLR4 欠損マウスにおいて、LPS 経鼻投与による BAL 総細胞数の有意な変化は無く、好中球の肺への流入はほとんど認められず、非投与マウスと差は認められなかった。LPS 気管支内投与をした C3H/HeJ マウスの BAL 中の好中球数や KC 産生量が、野生型 C3H/HeN と比較して減少し、LPS が TLR4 を介して好中球を誘導していたことが報告されている [45]。また、TLR4 遺伝子をノックアウトした C57BL/6 マウスに緑膿菌吸入曝露を行うと、好中球の集積や TNF- $\alpha$  と IL-1 $\beta$ 、ケモカイン MIP-2 及び KC 産生が減少することも報告されている [46]。これらの報告と吸入物質が異なるが、今回の結果も同様で好中球の誘導には TLR4 を介していたことが確認された。

これらの成績より、LPS による肺への好中球の誘導機構に関しては、LPS が AM 表面上の TLR4 と CD14 により認識され、AM は炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  を産生し、AM を活性化し、好中球走化性因子である CXCL1 を産生して末梢血液中の好中球を肺間質に誘導し、好中球が肺胞腔に浸潤した可能性が示された。肺上皮細胞においても TLR4 と CXCL1 mRNA 発現が認められた結果から、好中球の浸潤に肺上皮細胞が関係していることが示された。さらに、浸潤した好中球は、c-JUN と NF- $\kappa$ B を介して IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  を産生し、肺炎症を惹起することが示された。またこれらの結果から、LPS により誘導された好中球は、Fridlender ZG [47] らの分類により炎症を誘発する N1 型の好中球であると考えられる。

LPS 経鼻投与後、BAL 総細胞数は 24 時間をピークに時間を追うごとに減少した結果から、肺胞腔内に誘導された好中球がアポトーシスを起こし炎症を収束させた可能性が示唆された。そのため、アポトーシス実行因子である Caspase-3 の mRNA 発現および活性について検討した。Caspase-3 mRNA 発現比率と活性は、末梢血と比較して肺好中球で有意に増加し、肺好中球のアポトーシスが引き起こされることが証明された。マウスに LPS を気管支内投与することにより、肺上皮細胞、内皮細胞、AM や肺に流入した好中球に TUNNEL 陽性細胞が増加し、アポトーシスが誘導される報告と同様であった [31]。一方、LPS は、*in vitro* でヒトの好中球を活性化させることでアポトーシスを抑制し寿命を延長させることが報告されているが [48–50]、この違いは *in vivo* と *in vitro* の差によると考えられる。また、LPS 投与 48 時間後に、アポトーシスを起こした好中球を細胞内に取り込んでいるマクロファージが観察された。

LPS により好中球の Caspase-3 mRNA 発現と活性が高まり、アポトーシスが引き起こされたことから、アポトーシス経路について、まず外因性経路の Death receptor である CD95 の発現を検討した。肺好中球の CD95 陽性細胞比率は、有意な減少が認められた。この結果から時間経過に伴った BAL 総細胞数の減少は、Death receptor 依存経路ではないアポトーシスによる可能性が示唆された。一方、マウスに LPS を気管支内投与することにより、肺に流入した好中球の Fas と FasL mRNA 発現が増加し、抗 FAS 抗体の気管支内投与により TUNNEL 陽性細胞が減少し、LPS は Death receptor 依存的なアポトーシスを引き起こすことが報告されている [31]。この報告は、今回の結果とは異なっており、この違いはマウスの系統差によるものと考えられる。

好中球のアポトーシスが外因性経路によって引き起こされなかったため、内因性経路の産物である ROS の産生とその誘導酵素である NOX2mRNA 発現について検討した。好中球は、ファゴゾーム内で NADPH オキシダーゼによってスーパーオキシド、ヒドロキシラジカル、過酸化水素などの ROS を生成し、貪食した細菌を殺菌する [8, 51]。一方、ROS は、核酸、タンパク、膜脂質を酸化することで細胞を傷害するため [52]、過剰に産生されると宿主の組織を損傷させる [18]。1991 年に過酸化水素がアポトーシスを引き起こし、それがカタラーゼにより抑制されることが報告されて以降、多くの細胞において ROS がアポトーシスを引き起こすことが示されている。好中球においても細胞内に産生された  $H_2O_2$  がアポトーシスを引き起こすことが報告されている [53]。LPS 経鼻投与により、肺好中球の NOX2mRNA 発現と  $H_2O_2$  産生細胞比率は、有意に増加した。このことから、LPS によって肺に誘導された好中球は ROS を産生し、その結果アポトーシスを引き起こした可能性が *in vivo* において今回初めて証明された。

これらの結果より、LPS により誘導された好中球のアポトーシス機構は、Death receptor ではなく、好中球内で産生された ROS による Caspase-3 活性の増強に起因することが示され、好中球のアポトーシスにより肺内の炎症が収束したと考えられる。

タバコ煙は喫煙によって肺胞腔に到達し、肺胞内に常在する AM に対して影響を及ぼすことが考えられる。我々の研究室では、以前よりタバコ煙曝露による AM の NK 細胞活性の抑制や喫煙によるマウス AM の貪食能、サイトカイン産生能、抗原提示能及び抗体産生能などの免疫機能の抑制を報告してきた。また、喫煙曝露した AM による LPS 刺激 B 細胞増殖の抑制、ROS 産生増加と DNA 損傷やアポトーシスの抑制を報告してきた [22–28]。しかし、LPS によって引き起こされた肺炎症と誘導された好中球の機能に対する喫煙の影響についてはまだ解明されていない。そこでマウスにタバコ主流煙を曝露後、LPS 経鼻投与を行い、タバコ主流煙曝露による肺炎症と好中球機能への影響について検討した。

BAL 総細胞数は、LPS 群と CS-LPS 群において有意な変化は認められなかったが、AM 比率は喫煙により有意に増加し、好中球比率は喫煙により有意に減少した。3 週間タバコ主流煙と LPS を曝露した AKR/J マウスにおいても、喫煙による AM 増加と好中球減少が報告されており [54]、同様であった。今回の結果から、喫煙は LPS による好中球誘導を抑制したことが示された。

喫煙により、AM が増加し LPS による好中球誘導が減少したため、喫煙による AM と好中球の LPS 認識機能の低下が考えられる。そこで、AM および好中球の LPS 認識レセプター発現について検討した。AM と好中球の TLR4 と CD14 陽性細胞比率は、喫煙により有意に減少した。この結果から、LPS による好中球誘導の減少は、喫煙による AM の LPS 認識機能の低下によることが示され、また誘導された好中球にも影響を及ぼすことが認められた。喫煙による TLR4 発現の減少は報告されていないが、同様の細菌認識に関わるレセプターである TLR2 発現は、COPD 患者や喫煙者において減少していることが報告されている [55]。今回の結果や我々の以前の報告から、喫煙による AM の細菌認識能の低下と免疫機能抑制は易感染性を増加させる可



能性が考えられる。

喫煙は、マウスとヒトの AM の ROS 産生を促進させることが知られている [22–24, 26]。しかし、喫煙による好中球の ROS 産生への影響については十分に解明されていないため、肺に誘導された好中球を用いて ROS 産生を検討した。好中球の  $\text{H}_2\text{O}_2$  産生は、AM と同様に喫煙により有意に増加した。好中球の ROS 産生が増強したため、好中球の活性化に関わるサイトカイン mRNA 発現について検討した。喫煙により好中球のサイトカイン、ケモカイン及び核転写因子 mRNA 発現は、有意な変化は認められなかった。我々は、AM については  $\text{IL-1}\beta$  mRNA 発現が喫煙により減少することを報告している [22]。また、喫煙者の AM の  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{TNF-}\alpha$  などのサイトカイン産生の減少が同様に報告されているが [56]、喫煙による好中球のサイトカイン産生への影響は、まだ報告されておらず、今回が最初の報告である。これらの結果から、喫煙は AM の免疫機能を抑制し好中球の肺への誘導を抑制するが、誘導された好中球機能には影響を及ぼさないことが示された。

## 5. 総括

LPS による肺への好中球誘導機構には、AM と肺上皮細胞が TLR4 と CD14 を介して LPS を認識し、 $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{TNF-}\alpha$  を産生し、AM が活性化され、CXCL1 を産生して末梢血から好中球を肺

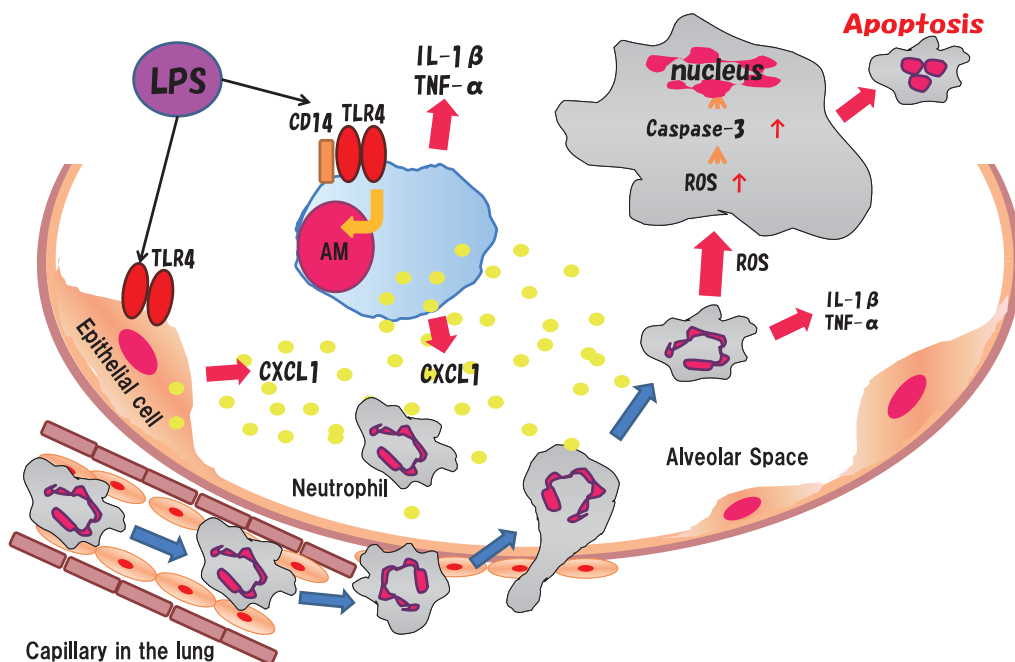


図 18 LPS による肺への好中球の誘導機構  
●: CXCL1, ROS: reactive oxygen species

間質を経て肺胞腔に誘導した可能性が示された。そして、肺に誘導された好中球は、c-JUN と NF- $\kappa$ B を介して IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  を産生し、Death receptor ではなく好中球内で産生された ROS によって Caspase-3 が活性化されアポトーシスを生じ、肺内の好中球が減少し炎症が収束したと考えられた (図 18)。また、喫煙は AM の LPS 認識機能を低下させ肺への好中球の誘導を減少させたが、誘導された好中球機能には影響を及ぼさなかった。

## 参 考 文 献

- [1] 中野昌, 小玉正智. エンドトキシン 新しい治療・診断・検査. 講談社サイエンティフィク. p. 8–14, 45–51.
- [2] Kharitonov SA, Sjöbring U. Lipopolysaccharide challenge of humans as a model for chronic obstructive lung disease exacerbations. *Contrib Microbiol.* 2007; 14: 83–100.
- [3] Barbour SE, Nakashima K, Zhang JB, Tangada S, Hahn CL, Schenkein HA, Tew JG. Tobacco and smoking: environmental factors that modify the host response (immune system) and have an impact on periodontal health. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1997; 8(4):437–460.
- [4] Rydell-Törmänen K, Uller L, Erjefält JS. Neutrophil cannibalism—a back up when the macrophage clearance system is insufficient. *Respir Res.* 2006; 7: 143.
- [5] Hoogerwerf JJ, de Vos AF, Bresser P, van der Zee JS, Pater JM, de Boer A, Tanck M, Lundell DL, Her-Jenh C, Draing C, von Aulock S, van der Poll T. Lung inflammation induced by lipoteichoic acid or lipopolysaccharide in humans. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008; 178(1): 34–41.
- [6] Wesselijs LJ, Nelson ME, Bailey K, O'Brien-Ladner AR. Rapid lung cytokine accumulation and neutrophil recruitment after lipopolysaccharide inhalation by cigarette smokers and nonsmokers. *J Lab Clin Med.* 1997; 129(1): 106–14.
- [7] Saito T, Yamamoto T, Kazawa T, Gejyo H, Naito M. Expression of toll-like receptor 2 and 4 in lipopolysaccharide-induced lung injury in mouse. *Cell Tissue Res.* 2005; 321(1): 75–88.
- [8] Balamayooran G, Batra S, Fessler MB, Happel KI, Jeyaseelan S. Mechanisms of neutrophil accumulation in the lungs against bacteria. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010; 43(1): 5–16.
- [9] 田村隆明, 山本雅之. 転写因子・転写制御キーワードブック. 羊土社. p125–126, 147–148.
- [10] 山本雅, 秋山徹. 細胞内シグナル伝達が変わる. 羊土社. p.20–29, 46–53.
- [11] Parker D, Prince A. Innate immunity in the respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011; 45(2): 189–201.
- [12] 笠置新平, 松島綱治. サイトカイン・ケモカインのすべて—基礎から最新情報まで—. 日本医学館. p.81–92, 279–298, 347–354.
- [13] Rada B, Leto TL. Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases. *Contrib Microbiol.* 2008; 15: 164–187.
- [14] Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11(8): 519–531.
- [15] Anthony L. DeFanco, Richerd M. Lonckley, Mirana Robertson. Immunity: The immune response in infectious and inflammatory disease. p.44–45
- [16] 村田興, 小林信之. Fas. 臨床免疫. 2002; 38(Suppl 20): 16–22.

- [17] 相川隆一. 活性酸素. 臨床免疫. 2002; 38(Suppl 20): 45–51.
- [18] Henson PM, Johnston RB Jr. Tissue injury in inflammation. Oxidants, proteinases, and cationic proteins. *J Clin Invest.* 1987; 79(3): 669–674.
- [19] Stockley RA. Neutrophils and the pathogenesis of COPD. *Chest.* 2002; 121(5 Suppl): 151S–155S.
- [20] Sapey E, Stockley JA, Greenwood H, Ahmad A, Bayley D, Lord JM, Insall RH, Stockley RA. Behavioral and structural differences in migrating peripheral neutrophils from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011; 183(9): 1176–1186.
- [21] Matute-Bello G, Liles WC, Radella F 2nd, Steinberg KP, Ruzinski JT, Jonas M, Chi EY, Hudson LD, Martin TR. Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 156(6): 1969–1977.
- [22] Ishida T, Hirono Y, Yoshikawa K, Hutei Y, Miyagawa M, Sakaguchi I, Pinkerton KE, Takeuchi M. Inhibition of immunological function mediated DNA damage of alveolar macrophages caused by cigarette smoke in mice. *Inhal Toxicol.* 2009; 21(14): 1229–1235.
- [23] Ishida T, Pinkerton KE, Takeuchi M. Alveolar macrophage from cigarette smoke-exposed mice inhibits B lymphocyte proliferation stimulated with LPS. *Respiration.* 2009; 77(1): 91–95.
- [24] Takeuchi M, Nagai S, Nakajima A, Shinya M, Tsukano C, Asada H, Yoshikawa K, Yoshimura M, Izumi T. Inhibition of lung natural killer cell activity by smoking: the role of alveolar macrophages. *Respiration.* 2001; 68(3): 262–267.
- [25] Takeuchi M, Nakajima A, Yoshikawa K, Shinya M, Asada H, Yoshimura M, Tuchiara, C, Nagai S, Izumi I. 2000. Effect of smoking on immunological functions of alveolar macrophages in mice. In: Tobacco counters health. Vaema, A.K.(ed), Macmilan Ltd, pp.168–171.
- [26] 竹内実, 浅田秀基, 長井苑子. 喫煙と肺胞マクロファージの抗原提示能. 臨床免疫. 2005; 44(5): 546–550.
- [27] 竹内実. 喫煙による抗体産生抑制. 臨床免疫・アレルギー科. 2007; 48(6): 673–681.
- [28] 廣野由里子, 竹内実. タバコ主流煙による肺胞マクロファージの DNA 損傷の誘導とアポトーシスの抑制. 京都産業大学論集. 2010; 39: 63–93.
- [29] Takeuchi T, Nakajima M, Morimoto K. Relationship between the intracellular reactive oxygen species and the induction of oxidative DNA damage in human neutrophil-like cells. *Carcinogenesis.* 1996; 17(8): 1543–1548.
- [30] Reutershan J, Basit A, Galkina EV, Ley K. Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005; 289(5): L807–815.
- [31] Kitamura Y, Hashimoto S, Mizuta N, Kobayashi A, Kooguchi K, Fujiwara I, Nakajima H. Fas/FasL-dependent apoptosis of alveolar cells after lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163(3 Pt 1): 762–769.
- [32] Lima Trajano ET, Sternberg C, Caetano M, Santos Silva MA, Porto LC, Santos JC, Ribeiro ML, Magalhães CB, Zin WA, Benjamim CF, Valença SS. Endotoxin-induced acute lung injury is dependent upon oxidative response. *Inhal Toxicol.* 2011; 23(14): 918–926.
- [33] Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4(7): 499–511.
- [34] Sabroe I, Dower SK, Whyte MK. The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil

- migration, activation, and apoptosis. *Clin Infect Dis*. 2005; 41 (Suppl 7): S421–S426.
- [35] Ulevitch RJ, Tobias PS. Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr Opin Immunol*. 1999; 11(1): 19–22.
  - [36] Thorley AJ, Ford PA, Giembycz MA, Goldstraw P, Young A, Tetley TD. Differential regulation of cytokine release and leukocyte migration by lipopolysaccharide-stimulated primary human lung alveolar type II epithelial cells and macrophages. *J Immunol*. 2007; 178(1): 463–473.
  - [37] Xing Z, Jordana M, Kirpalani H, Driscoll KE, Schall TJ, Gauldie J. Cytokine expression by neutrophils and macrophages in vivo: endotoxin induces tumor necrosis factor-alpha, macrophage inflammatory protein-2, interleukin-1 beta, and interleukin-6 but not RANTES or transforming growth factor-beta 1 mRNA expression in acute lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994; 10(2): 148–153.
  - [38] Huang S, Paulauskis JD, Godleski JJ, Kobzik L. Expression of macrophage inflammatory protein-2 and KC mRNA in pulmonary inflammation. *Am J Pathol*. 1992; 141(4): 981–988.
  - [39] Kornerup KN, Salmon GP, Pitchford SC, Liu WL, Page CP. Circulating platelet-neutrophil complexes are important for subsequent neutrophil activation and migration. *J Appl Physiol*. 2010; 109(3): 758–767.
  - [40] Balamayooran G, Batra S, Balamayooran T, Cai S, Jeyaseelan S. Monocyte chemoattractant protein 1 regulates pulmonary host defense via neutrophil recruitment during *Escherichia coli* infection. *Infect Immun*. 2011; 79(7): 2567–2577.
  - [41] Dmitry I. Gabrilovich. *The neutrophils: new outlook for old cells*. Imperial College Press.
  - [42] Arndt PG, Young SK, Lieber JG, Fessler MB, Nick JA, Worthen GS. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase limits lipopolysaccharide-induced pulmonary neutrophil influx. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 171(9): 978–986.
  - [43] Kang JL, Lee HW, Lee HS, Pack IS, Chong Y, Castranova V, Koh Y. Genistein prevents nuclear factor-kappa B activation and acute lung injury induced by lipopolysaccharide. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 164(12): 2206–2212.
  - [44] Regueiro V, Moranta D, Campos MA, Margareto J, Garmendia J, Bengoechea JA. *Klebsiella pneumoniae* increases the levels of Toll-like receptors 2 and 4 in human airway epithelial cells. *Infect Immun*. 2009; 77(2): 714–724.
  - [45] Yamada W, Tasaka S, Koh H, Shimizu M, Ogawa Y, Hasegawa N, Miyasho T, Yamaguchi K, Ishizaka. Role of toll-like receptor 4 in acute neutrophilic lung inflammation induced by intratracheal bacterial products in mice. *A. J Inflamm Res*. 2008; 1: 1–10.
  - [46] Skerrett SJ, Wilson CB, Liggitt HD, Hajjar AM. Redundant Toll-like receptor signaling in the pulmonary host response to *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007; 292(1): L312–L322.
  - [47] Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, Worthen GS, Albelda SM. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*. 2009; 16(3): 183–194.
  - [48] Lee A, Whyte MK, Haslett C. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *J Leukoc Biol*. 1993; 54(4): 283–288.
  - [49] Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A. Modulation of granulocyte survival and

- programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood*. 1992; 80(8): 2012–2020.
- [50] François S, El Benna J, Dang PM, Pedruzzi E, Gougerot-Pocidalo MA, Elbim C. Inhibition of neutrophil apoptosis by TLR agonists in whole blood: involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt and NF-kappaB signaling pathways, leading to increased levels of Mcl-1, A1, and phosphorylated Bad. *J Immunol*. 2005; 174(6): 3633–3642.
- [51] Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*. 2000; 5(5): 415–418.
- [52] Camhi SL, Lee P, Choi AM. The oxidative stress response. *New Horiz*. 1995; 3(2): 170–182.
- [53] Kasahara Y, Iwai K, Yachie A, Ohta K, Konno A, Seki H, Miyawaki T, Taniguchi N. Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis of neutrophils. *Blood*. 1997; 89(5): 1748–1753.
- [54] Lee KM, Renne RA, Harbo SJ, Clark ML, Johnson RE, Gideon KM. 3-week inhalation exposure to cigarette smoke and/or lipopolysaccharide in AKR/J mice. *Inhal Toxicol*. 2007; 19(1): 23–35.
- [55] Droemann D, Goldmann T, Tiedje T, Zabel P, Dalhoff K, Schaaf B. Toll-like receptor 2 expression is decreased on alveolar macrophages in cigarette smokers and COPD patients. *Respir Res*. 2005; 6: 68.
- [56] McCrea KA, Ensor JE, Nall K, Bleecker ER, Hasday JD. Altered cytokine regulation in the lungs of cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994; 150(3): 696–703.

## Pathogenesis of Lipopolysaccharide induced lung inflammation and effect of cigarette smoke

Ayaka KAWAZOE

Minoru TAKEUCHI

### Abstract

Lipopolysaccharide (LPS) that is endotoxin of Gram-negative bacteria has a variety of immune activity and is contained within air and cigarette smoke. LPS is inhaled into the lung by respiration and reaches alveolar space, then directly contacts with alveolar macrophages (AM). LPS inhalation also induces neutrophils into the lung and causes lung inflammation. Neutrophils are immune cells which have the ability of phagocytosis and bacterial killing. The delay of neutrophil apoptosis and followed production of excessive reactive oxygen species (ROS) cause an injury to surrounding tissue, followed by exacerbate tissue inflammation. However, the induction mechanism of neutrophils is not fully understood. Therefore, we studied the mechanism of induced neutrophils by LPS in the lung, functions and apoptosis of neutrophils. Mice were inhaled 60  $\mu$ g of LPS by intranasal administration. After 24 hours, cells were obtained by bronchoalveolar lavage (BAL). The number of BAL cells were significantly increased in LPS and decreased at the peak of 24 hours after LPS intranasal administration. In the Dot Plots of BAL cells, neutrophils population appears by LPS intranasal administration. In pathological finding, inflammation caused by neutrophil infiltration was found in alveolar space and lung interstitium. To investigate the mechanism of neutrophil induction into lung, we examined TLR4 and CD14 cell surface expression that recognize LPS, and pro-inflammatory cytokines mRNA expression in AM. TLR4 expression on AM was not effected by LPS, however CD14 expression on AM was significantly increased in LPS. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and CXCL1 mRNA expressions were also significantly increased in AM by LPS. CXCL1 mRNA expression was increased in AM by LPS. Therefore, we examined chemotactic activity of AM culture supernatant on infiltrated neutrophil into lung by LPS. Both of direction and velocity were significantly increased in LPS. Relating to neutrophil function, we examined cytokine and nucleus transcription factor (NF- $\kappa$ B) mRNA expression of neutrophils in peripheral blood and lung. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and c-JUN mRNA expression were significantly increased in lung neutrophil compared with neutrophil in peripheral blood, however NF- $\kappa$ B mRNA expression of neutrophil was not different in peripheral blood and lung. We examined whether TLR-4 is involved in the LPS-induced neutrophil by using TLR-4 deficient mice. Infiltration of neutrophil by LPS was not observed. We indicated that neutrophil in lung decreased at 48 hours after LPS intranasal administration, therefore we investigated whether LPS-induced neutrophil cause apoptosis. Both of caspase-3 mRNA expression and activity of caspase-3 were significantly increased neutrophil in lung compare with neutrophil in peripheral blood, and induced neutrophil into lung caused apoptosis. After that, we investigated death receptor (CD95) mRNA expression as extrinsic apoptosis pathway. CD95 mRNA expression was decreased in lung neutrophil. However, ROS production and ROS synthesis enzyme NOX2 mRNA expression were increased in lung neutrophil.

We previously have reported that Cigarette Smoke (CS) inhibited AM immune functions such as phagocytosis and production of cytokine, however the effect of CS on neutrophil induction by LPS is still unclear. Therefore, we investigated the effect of CS on infiltration of neutrophil by LPS. C57BL/6 female mice were exposed to CS (20 cigarettes/day) for 10 days. The next day, mice were inhaled 60  $\mu$ g of LPS by intranasal administration (CS-LPS). LPS was inhaled to mice (NS-LPS) as well as CS-LPS. At one day after intranasal administration of LPS, BAL cell was obtained by BAL. The expressions of TLR4 and CD14 on AM were decreased and infiltration of neutrophil to lung was inhibited by CS. The following, we examined neutrophil functions. ROS production of neutrophils was significantly increased by CS, but cytokine, chemokine and NF- $\kappa$ B mRNA expressions of neutrophil were not affected by CS.

These results suggest that the regarding the mechanism of infiltration of neutrophil to lung by LPS, AM and lung epithelial cells recognize LPS via TLR4 and CD14, and then release IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , and AM were activated, activated AM produced CXCL-1 and neutrophils were induced into the alveolar space through pulmonary capillary. Furthermore, regarding the mechanism of convergence of inflammation by LPS, there is a possibility that infiltrated neutrophils in lung produced IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  via c-JUN and NF- $\kappa$ B, and then production of ROS resulted in apoptosis by activation of caspase-3 but not death receptor. CS is also decreased the recognition ability of AM and induction of neutrophil to the lung, however CS did not affect the functions of neutrophil.

**Keywords:** Lipopolysaccharide (LPS), Neutrophil, Alveolar Macrophages (AM), Immune Function, Cigarette Smoke