

温熱刺激により発現される熱ショック蛋白72がlipopolysaccharide  
により誘導されるラット肺水腫へおよぼす影響に関する検討

鳥取大学医学部器官制御外科学講座麻酔・集中治療医学分野（主任 石部 裕一教授）

船 越 多 恵

Induction of heat shock protein 72 and attenuation of  
lipopolysaccharide-induced pulmonary edema by  
pre- or post-treatment with heat stress in rats

Tae FUNAKOSHI

*Division of Anesthesiology and Critical Care Medicine, Department of Surgery,  
Faculty of Medicine, Tottori University, Yonago 683-8503, Japan.*

**ABSTRACT**

Heat stress (HS) prior to injury protects lungs against various stresses, but the effect of HS after injury remains unresolved. We investigated the time effects of HS treatment on lipopolysaccharide (LPS)-induced lung injury and the cytoprotective role of heat shock protein (HSP) 72. Anesthetized rats were subjected to whole body hyperthermia before or after intravenous LPS injection. Rats were allocated into 4 groups according to LPS treatment and HS pre- or post-treatment. Lung function was evaluated by lung pressure/volume (P/V) curve and wet-to-dry weight (W/D) ratio. Inflammatory cytokine levels and myeloperoxidase activity in plasma were determined by ELISA. Cytokine and HSP 72 mRNA expressions and HSP72 in lungs were measured with Northern and Western blot analysis. HS induced HSP72 mRNA/protein in the lungs. HS post-treatment promoted HSP 72 mRNA expression. HS pre- and post-treatment significantly improved P/V curve and W/D ratio. HS pre- and post-treatment did not reduce proinflammatory cytokine levels in plasma. HS pre-treatment, but not post-treatment, suppressed cytokine mRNA expressions in the lungs. HS before or after LPS treatment partially inhibited lung edema through induction of HSP72. HS pre-treatment might prohibit the LPS-induced lung injury by inhibiting proinflammatory cytokines release, whereas HS post-treatment through cell protective effect with HSP72.

(Accepted on December 26, 2003)

**Key words :** Heat stress, Heat shock protein 72, LPS-induced lung injury, lung pressure/volume curve, cytokine

## はじめに

多くの臓器で様々な侵襲刺激に対して熱ショック蛋白 (Heat shock protein: 以下HSPと略) を誘導する反応が見られる。HSPの中でも70kDaのHSPであるHSP70ファミリーは最も研究が進んでいる。温熱刺激はHSPを誘導し細胞保護効果を発現することは、肝臓、心臓、腎臓、小腸、肺臓などの臓器で報告がある。具体的には、温熱刺激やHSP誘導性薬剤の前処置により、肝移植後の生存率やグラフトの機能を改善したり<sup>1, 2)</sup>、心筋<sup>3, 4)</sup>、腎臓<sup>5, 6)</sup>、小腸<sup>7)</sup>での虚血再環流傷害を保護するなどの報告がある。敗血症により実験的に引き起こされた多臓器不全に対しても、温熱刺激の前処置が臓器保護的に作用するという報告がある<sup>8, 9)</sup>。このようにHSP誘導は、化学的 (スーパーオキシドなど)、感染 (細菌など)、環境 (熱など)、炎症 (lipopolysaccharide (LPS) など) のストレスに対して細胞が備えている本来の保護機序と考えられる。しかしながらHSPの臓器保護作用についての分子レベルの機序には明らかになっていない。

肺組織でのHSPの初めての報告は、悪性腫瘍を判定するための腫瘍マーカーとしての役割である<sup>10)</sup>。肺障害の分野では、ホスホリパーゼA1への暴露<sup>11)</sup>や盲腸結紮・穿孔<sup>8, 12)</sup>、虚血再環流<sup>13)</sup>などにより誘発した急性肺障害モデルで、温熱刺激の前処置がHSPを誘導し、肺障害を改善することが示された。LPS誘導性肺障害においても、温熱刺激の前処置により肺毛細血管への好中球の集積や肺透過性亢進が有意に減少すること<sup>14)</sup>、ラットの敗血症モデルの肺においてアデノウイルスベクターを応用したHSP70の誘導は肺水腫や好中球の集積が減少することが示されている<sup>14)</sup>。

肺組織でのHSPは温熱刺激の2時間後には発現し、12から24時間後に最高レベルに達する<sup>11)</sup>。つまり侵襲刺激の12から24時間前の温熱刺激はHSPを誘導し肺保護効果が期待できる。しかし臨床的には、侵襲刺激後に加えられた温熱刺激にも保護作用が認められれば、より治療法としての意義が高い。侵襲刺激後の温熱刺激の効果に関しては、LPSを投与したラットの生存率が改善するという報告があるが<sup>15)</sup>、*in vivo*での肺保護効果についての報告はない。また温熱刺激の前処置による肺保護の機序については、炎症性サイトカイン

の放出抑制が示唆されているが<sup>16)</sup>、十分には明らかになっていない。今回の研究の目的は、温熱刺激をLPS投与の前または直後に加えて、HSP72とサントカイン、肺機能を測定することによりLPS誘導性肺障害への効果を検討し、さらにHSPと炎症性サイトカインの関与について明らかにすることである。

## 材料および方法

### 対象

SPF飼育施設で飼育された11週齢の雄のSprague-Dawleyラット (体重330~350g, 清水実験材料) を使用した。実験計画は鳥取大学医学部動物実験委員会の許可を得て実施した。

### 群分け

ラットは、LPS処置と温熱刺激を加える時間関係によって4群に分類した (CONT: 無処置, LPS: LPS投与のみ, pre-HS: 温熱刺激18時間後にLPS投与, post-HS: LPS投与直後に温熱刺激)。それぞれの処置や測定項目等の詳細は表1に示した。これらの群とは別に、温熱刺激0, 2, 6, 18時間後のHSP72のmRNAと蛋白発現を測定した (各群: n=3)。

### 温熱刺激

温熱刺激を与えるために、ペントバルビタール 50 mg/kgの腹腔内投与で麻酔したラットの腋下に浮き輪をつけて、41.5°Cの温湯に頭を出した状態で浮かべ、直腸温度で41.5°Cを15分間保った。温熱刺激後ラットを室温のケージに戻し、食料と水分が自由に摂取出来るようにした。温熱刺激の前処置群 (pre-HS) では、LPS処置の18時間前に、温熱刺激の後処置群 (post-HS) では、LPS処置直後に同様に温熱刺激を加えた。

### LPS処置

LPS誘導性肺障害作成のため、ペントバルビタール 50 mg/kgの腹腔内投与で麻酔したラットに、LPS (*Escherichia coli* Serotype 055: B5, Sigma) 3 mg/kgを陰茎静脈より投与した。

### 肺圧力容量関係の測定方法

肺の圧容量曲線を、4群でLPS処置から0時間後 (CONT群: n=8)、2時間後 (各群: n=8)、6時

表1. 各群における処置と評価

群	処置	時間経過					
		評価	18時間前	0時間	2 時間後	6 時間後	18時間後
CONT	HS/LPS			無処置			
	肺機能(圧容量曲線, 湿乾重量比)			8			
	血漿サイトカインとMPO			8			
	サイトカインとHSP72の遺伝子発現			3			
LPS	HS/LPS			LPS			
	肺機能(圧容量曲線, 湿乾重量比)				8	8	11
	血漿サイトカインとMPO				8	8	8
	サイトカインとHSP72の遺伝子発現				3	3	-
Pre-HS	HS/LPS		HS	LPS			
	肺機能(圧容量曲線, 湿乾重量比)				8	8	13
	血漿サイトカインとMPO				8	8	8
	サイトカインとHSP72の遺伝子発現				3	3	-
Post-HS	HS/LPS			LPS+HS			
	肺機能(圧容量曲線, 湿乾重量比)				8	8	10
	血漿サイトカインとMPO				8	8	8
	サイトカインとHSP72の遺伝子発現				3	3	-

HS: 温熱刺激, LPS: lipopolysaccharide投与, MPO: myeloperoxidase, HSP72: 熱ショック蛋白 72

CONT群: 無処置, LPS群: LPS投与のみ, pre-HS群: 温熱刺激18時間後にLPS投与,

post-HS群: LPS投与直後に温熱刺激

間後 (各群: n=8), 18時間後 (LPS群: n=11, pre-HS群: n=13, post-HS群: n=10) に以下に示す方法で測定した. 麻酔後に気管切開孔から気管チューブを挿入し, 心肺を一塊として取り出した. 気管チューブに三方活栓を接続し, その一方に圧測定ラインを繋ぎ圧変換器に連結した. 三方活栓の他の一端にガラス注射器を接続し, 遊離肺に一回0.5 mlの空気をゆっくり注入し, 注入20秒後の値を気道内圧とした. x-y軸の上に気道内圧と注入空気量を記録した<sup>16)</sup>. この手技を気道内圧が25 cmH<sub>2</sub>Oになるまで続け, そのときの空気の総注入量を全肺容量と規定した. この吸気相での測定に引き続き, 気道内圧が0 cmH<sub>2</sub>Oに至るまで同様の手技で脱気し, 呼気相での測定とした.

#### 肺湿乾重量比

肺圧容量曲線を測定したすべての肺を用いて, 測定直後に右肺の重量を測定し湿重量とした. その肺を60°Cのオーブンで2週間かけて重量の変化が無くなるまで完全に乾燥させ, その重量を乾重量とした<sup>17)</sup>. 肺湿乾重量比は, 次式に基づいて計算した. 肺湿乾重量比 = 湿重量/乾重量

#### 血漿サイトカイン濃度とmyeloperoxidase (MPO)活性

LPS処置から0, 2, 6, 18時間後に右房から血液標本をヘパリン採血し (各群: n=8), 3000 rpm, 10分間遠心分離した後, その上清を採取し

表2. ノザンプロット解析のためのPCRプライマー

遺伝子		PCRプライマー	アニーリング温度(°C)	塩基対
HSP 72	sense	5'- AAG CAG ACG CAG ACC TTC AC	65	654
	antisense	5'- CAC CTC CTC GAT GGT GGG		
TNF- $\alpha$	sense	5'- GTA GCC CAC GTC GTA GCA AA	60	346
	antisense	5'- CCC TTC TCC AGC TGG GAG AC		
IL-1 $\beta$	sense	5'- TGA TGT TCC CAT TAG ACA GC	60	378
	antisense	5'- GAG GTG CTG ATG TAC CAG		
MIP-2	sense	5'- GGC ACA ATC GGT ACG ATC ACG	62	303
	antisense	5'- ACC CTA CCA AGG GTT GAC TTC		
$\beta$ -actin	sense	5'- AAC CGT GAA AAG ATG ACC CAG	60	741
	antisense	5'- CTC CTG CTT GCT GAT CCA CAT		

HSP 72: 熱ショック蛋白72, TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ : interleukin-1 $\beta$ ,  
MIP-2: macrophage inflammatory protein-2

測定を行うまで-80°Cで保存した. 血漿Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2)濃度はenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Immunoassay Kit, BioSource International, Inc)を用いて測定した. 血漿MPO活性は, o-dianisidine dihydrochloride oxidation法で測定した<sup>18)</sup>. 簡略に述べると, 0.1 M 磷酸緩衝液0.5 ml (Sigma)と0.25%牛血清アルブミン 0.6 mlの混合液に血漿を加え, そこにo-dianisidine (Sigma)と過酸化水素を反応させ460 nmの吸光度で測定, MPO活性の指標とした.

#### TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MIP-2, HSP72の遺伝子発現

各群で温熱刺激またはLPS処置後に経時的に肺組織を採取し (各群: n=3), 採取直後に液体窒素で急速冷凍し解析を行うまで-80°Cで保存した. 冷凍保存肺にIsogen (ニッポンジーン)を加えてポリトロンホモジナイザーでホモジナイズし, 3000 rpm, 15分間遠心分離後, その上清を採取した. RNAはグアニジン-チオシアン酢酸塩-フェノールクロロホルム法で回収した. mRNA定量解析はノザンプロット解析を行った<sup>19, 20)</sup>. 簡略に述べると, 10 $\mu$ gの総RNAを1%アガロース, ホルムアルデヒドゲルで分離し, 引き続きINC膜 (Westborough)上に転移した. 表2に記載したプライマーを用いてpolymerase chain reactionを

30サイクル行いcDNAを増幅し, QIAquick Gel Extraction kitにて精製したものをプローブとして使用した. それぞれのプローブはTakara Bca BEST labeling kit (タカラバイオ)を用いて $\alpha$ -[<sup>32</sup>P] dCTPをラベルし, ハイブリダイゼーションに用いた. HSP72, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MIP-2のmRNAの発現の定量はMolecular imager (Japan Bio-Rad-laboratories)を用いて行い,  $\beta$ -actinのmRNA量で補正した. その比の最大値を100%として相対値で表した.

#### HSP72の蛋白発現

HSP72の蛋白発現をウェスタンブロット解析で確認した<sup>20)</sup>. 上記の冷凍保存肺にバッファー (Tris-HCl: 50 mM, NP-40: 1%, Na-deoxycholate: 0.25%, NaCl: 150 mM, EGTA: 1 mM, PMSF: 1mM, aprotinin, leupeptin, pepstatin: 1  $\mu$ g/ml)を加えてポリトロンホモジナイザーでホモジナイズし, 3000 rpm, 10分間遠心分離し, その上清を採取し試料とした. 総蛋白濃度はBCA protein assay kit (Pierce Chemical)で測定, 調整した. 総タンパク質100  $\mu$ gを10% SDS polyacrylamide gelで電気泳導しHybond-P membrane (Amersham)上に転写した. 5%の脱脂粉乳で60分間ブロッキングした後, 200倍希釈マウス抗ラットHSP70モノクローナル抗体 (Stress-Gen Biotechnologies)に24時間暴露し, ECL de-

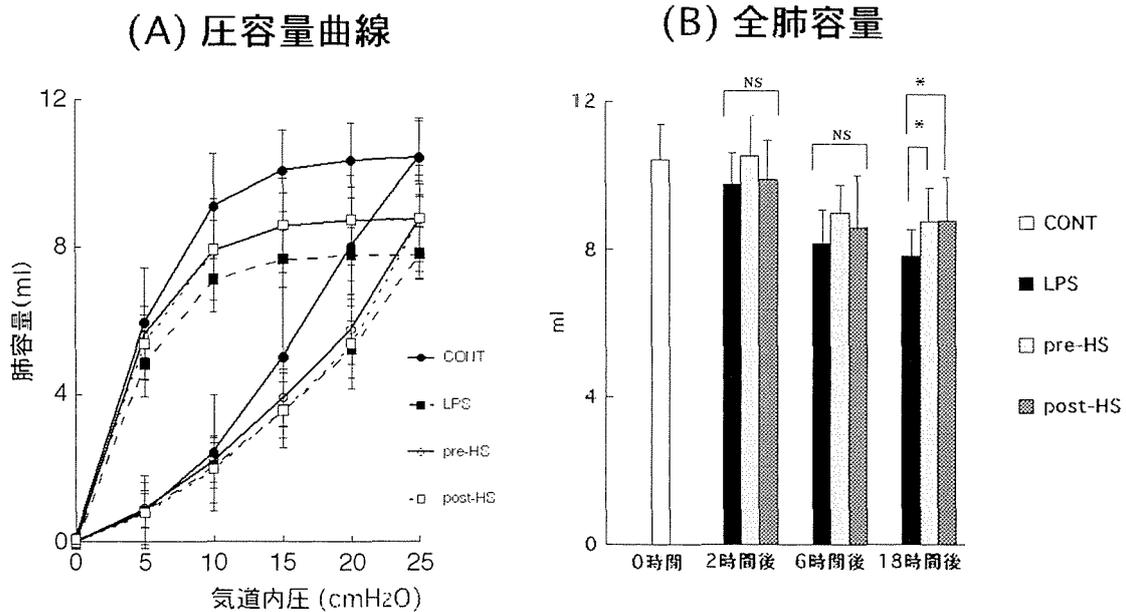


図1. LPS処置と温熱刺激の圧容量曲線と全肺容量に対する効果

(A) 肺圧容量曲線は、LPS処置によって下方移動した。(B) 温熱刺激の前、後処置とも、LPS投与から18時間後の圧容量曲線の下方移動を一部抑制した。LPS, post-HS, pre-HS群における全肺容量は、LPS処置により経時的に減少した。しかしながら、温熱刺激の前、後処置とも、LPS投与から18時間後の減少を有意に抑制した。データは平均 ± 標準偏差で表した。\* :  $p < 0.05$ , NS: 有意差なし

tection kit (Amersham)で可視化した。

#### 統計処理

データは平均値 ± 標準偏差で表した。全肺容量、肺湿乾重量比、血漿サイトカイン濃度、MPO活性は二元分散分析とFishier検定を用いて解析した。 $p < 0.05$ を有意とした。

### 結 果

#### 圧容量曲線と全肺容量

圧容量曲線はLPS処置後経時的に下方移動したが、温熱刺激の前処置、後処置はともにLPS処置18時間後の圧容量曲線の下方移動を一部抑制した(図1A)。全肺容量は、CONT群に比較してLPS処置6, 18時間後に3群とも有意に減少した(図1B)。温熱刺激の前処置、後処置ともLPS投与から18時間後の全肺容量の減少を有意に抑制した。

#### 肺湿乾重量比

肺湿乾重量比はCONT群に比較してLPS処置6, 18時間後に3群とも有意に増加した(図2)。温熱刺激の前処置、後処置ともLPS処置18時間後の湿

乾重量比の増加を有意に抑制した。

#### 血漿サイトカイン濃度とMPO活性

血漿中のTNF- $\alpha$ とIL-1 $\beta$ 濃度はLPS投与から2から6時間後には有意に増加したが、18時間後には基準点に戻った(図3A, B)。これらの変化は温熱刺激の前処置、後処置の影響を受けなかった。血漿中のMIP-2濃度もLPS投与から2, 6時間後には有意に増加した(図3C)。温熱刺激の後処置によりMIP-2濃度は増加し、LPS処置から2, 6時間後には温熱刺激を加えない場合と比較して有意に増加した。血漿MPO活性はLPS処置により増加せず、温熱刺激の前処置はMPO活性に影響しなかったが、温熱刺激の後処置によりLPS処置から6, 18時間後のMPO活性は有意に増加した(図4)。

#### TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MIP-2のmRNA発現

mRNA発現の典型的なノザンプロットの解析結果を図5に示す。LPS処置によって肺組織でのTNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MIP-2 mRNAが誘導され、LPS処置から2時間後に最高の発現量となり、6時

## 肺湿乾重量比

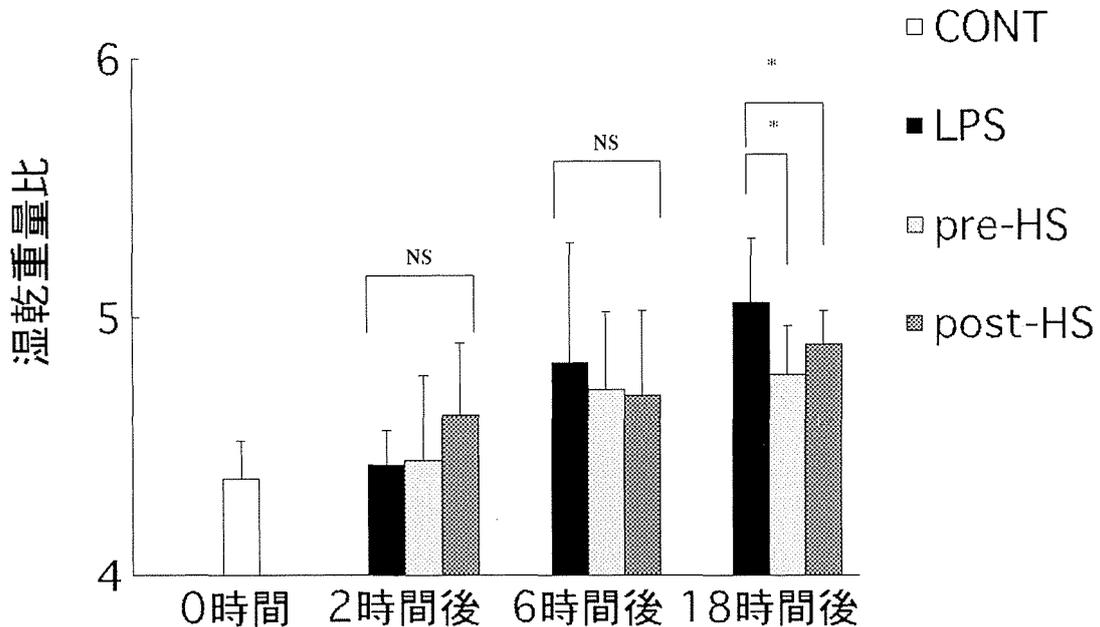


図2. LPS処置と温熱刺激の肺湿乾重量比に対する効果

LPS処置により経時的に肺湿乾重量比は増加した. 温熱刺激の前, 後処置とも, LPS処置から18時間後の肺湿乾重量比の増加を有意に抑制した. データは, 平均 ± 標準偏差で表した. \*:  $p < 0.05$ , NS: 有意差なし

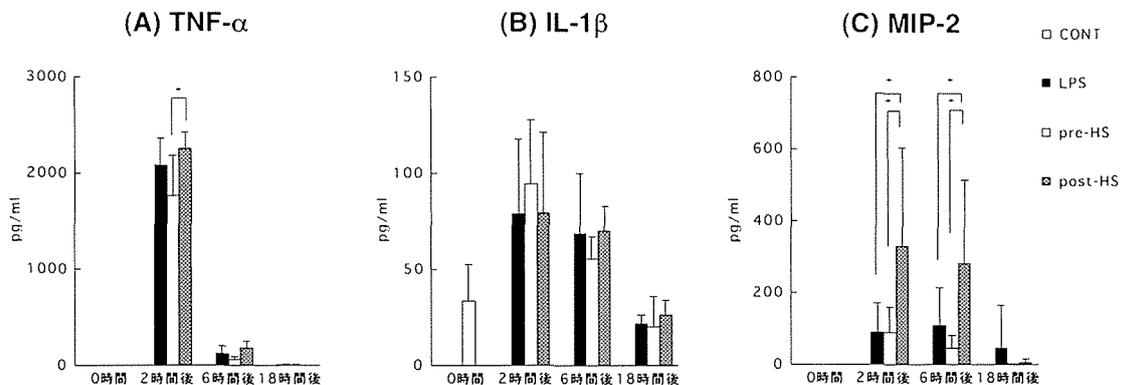


図3. LPS処置と温熱刺激の血漿TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MIP-2濃度に対する効果

LPS処置から0, 2, 6, 18時間後にラットから血液標本をヘパリン採血し, 3000 rpm, 10分間遠心分離した上清を採取した. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MIP-2濃度をELISAキットを用いて測定した. LPS処置によりTNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MIP-2の血漿濃度は増加した. (A) 血漿TNF- $\alpha$ 濃度は, LPS投与から2時間後に有意に増加した. 温熱刺激の前, 後処置とも, 血漿TNF- $\alpha$ 濃度に影響しなかった. (B) 血漿IL-1 $\beta$ 濃度は, LPS投与から2, 6時間後に有意に増加した. 温熱刺激の前, 後処置とも, 血漿IL-1 $\beta$ 濃度に影響しなかった. (C) 血漿MIP-2濃度は, LPS投与から2, 6時間後に増加した. 温熱刺激の前処置はMIP-2濃度に影響しなかったが, 温熱刺激の後処置することで, MIP-2濃度は更に有意に増加した. データは, 平均 ± 標準偏差で表した.

\*:  $p < 0.05$

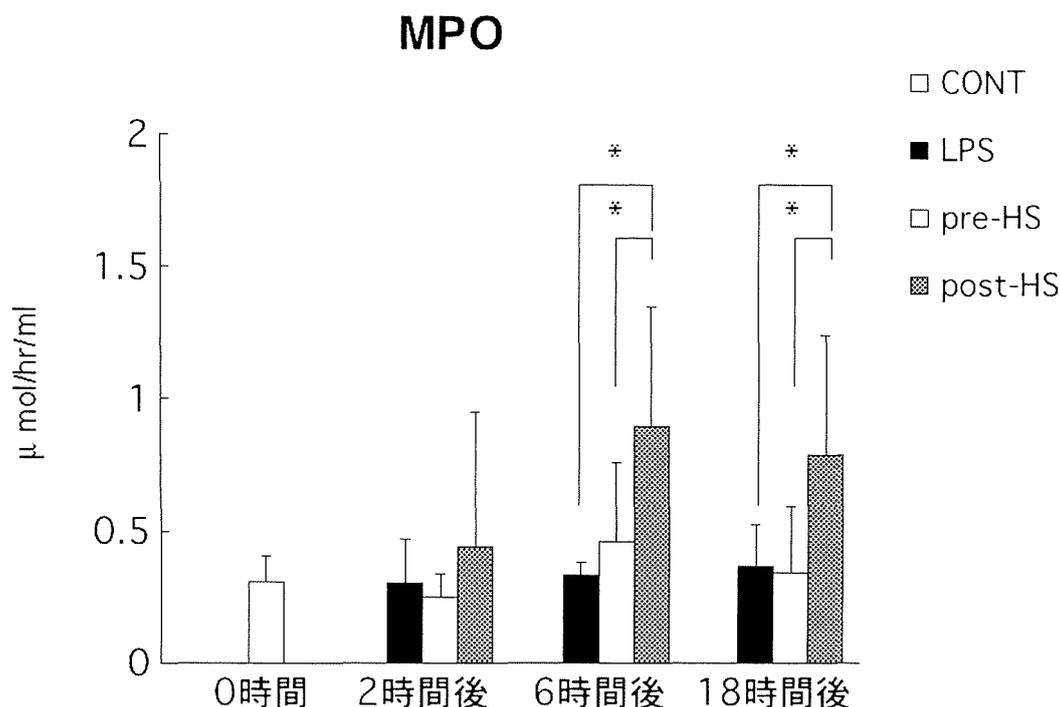


図4. LPS処置と温熱刺激の血漿myeloperoxidase (MPO)活性に対する効果

LPS処置から0, 2, 6, 18時間後にラットから血液標本をヘパリン採血し, 3000 rpm, 10分間遠心分離した上清を採取した. 血漿MPO活性をo-dianisidine dihydrochloride oxidation法を用いて測定した. LPS投与と温熱刺激の前処置は, 血漿MPO活性に影響しなかったが, 温熱刺激を後処置することでは, LPS投与から6, 18時間後のMPO活性は有意に増加した. データは, 平均 ± 標準偏差で表した. \*:  $p < 0.05$

間後には減弱していた. 温熱刺激の前処置により, LPS処置から2時間後のTNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MIP-2のmRNA発現量が減弱した. しかし温熱刺激の後処置では, LPS処置から2時間後のIL-1 $\beta$  mRNA発現をわずかに抑制したが, TNF- $\alpha$ とMIP-2 mRNAの発現には影響を与えなかった.

#### HSP72のmRNAと蛋白発現

mRNA, 蛋白発現の典型的なノザンプロット, ウェスタンプロットの解析結果を図6に示す. 肺組織でのHSP72 mRNAは, 温熱刺激より2時間後に最高の発現量を示し, 6時間後には減弱していた (図6上段). HSP72蛋白量は温熱刺激から2時間後に発現量の増加を認め, 6, 18時間後には増強した (図6下段). LPS処置はHSP72 mRNAを6時間後に誘導し, 温熱刺激の前処置は, その発現量に影響を与えなかったが, 後処置は誘導を促進し, LPS処置と温熱刺激の2時間後には強いHSP72 mRNAの誘導を確認した (図7).

#### 考 察

この研究は, 温熱刺激によって誘導されるHSP72が, LPSによって誘導されるラット肺水腫にいかなる影響を及ぼすかを検討することを目的として行なった. この実験における主な知見は, 1) 41.5°C, 15分間の全身の温熱刺激をLPS投与の18時間前あるいはLPS投与直後に加えることにより, 共に肺組織にHSP72を誘導しLPS誘導性肺障害を減弱したこと, 2) 温熱刺激の前処置によりLPSによる炎症性サイトカインの誘導が減弱したが, LPS投与直後の温熱刺激処置は, 炎症性サイトカイン誘導を抑制しなかったことである.

#### 実験モデル

従来の研究では, 炎症や感染による急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) モデルとしてLPSの気管内噴霧<sup>21)</sup>, 盲腸の結紮・穿孔などの手技<sup>22)</sup>を使用している. 今回我々は, LPS 3 mg/kgを経静脈的に

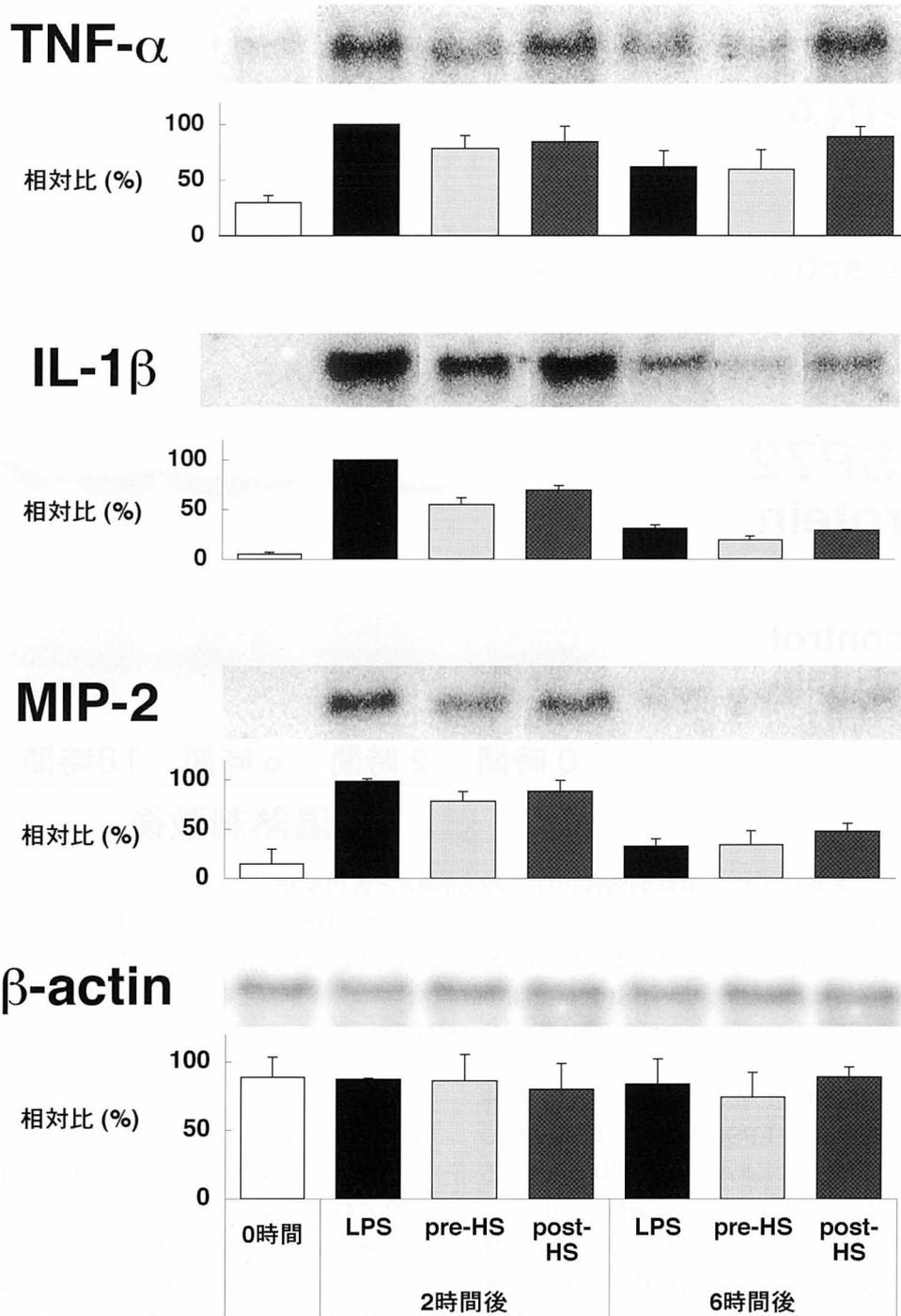


図5. 温熱刺激の肺組織のTNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MIP-2 mRNA発現への影響

肺組織でのTNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MIP-2 mRNA発現の典型的なノザンプロット解析結果を示す。TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MIP-2の計測値は、 $\beta$ -actinとの相対比をとり、最大値を100%として表した。LPS処置により2時間後にTNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MIP-2 mRNAは最高の発現量を示した。しかしながら、温熱刺激の前処置では、このmRNAのLPSによる発現の増強は減弱した。温熱刺激の後処置では、LPS処置2時間後のIL-1 $\beta$ の発現量はやや抑制したが、TNF- $\alpha$ , MIP-2の発現には影響を与えなかった。データは、平均  $\pm$  標準偏差で表した。

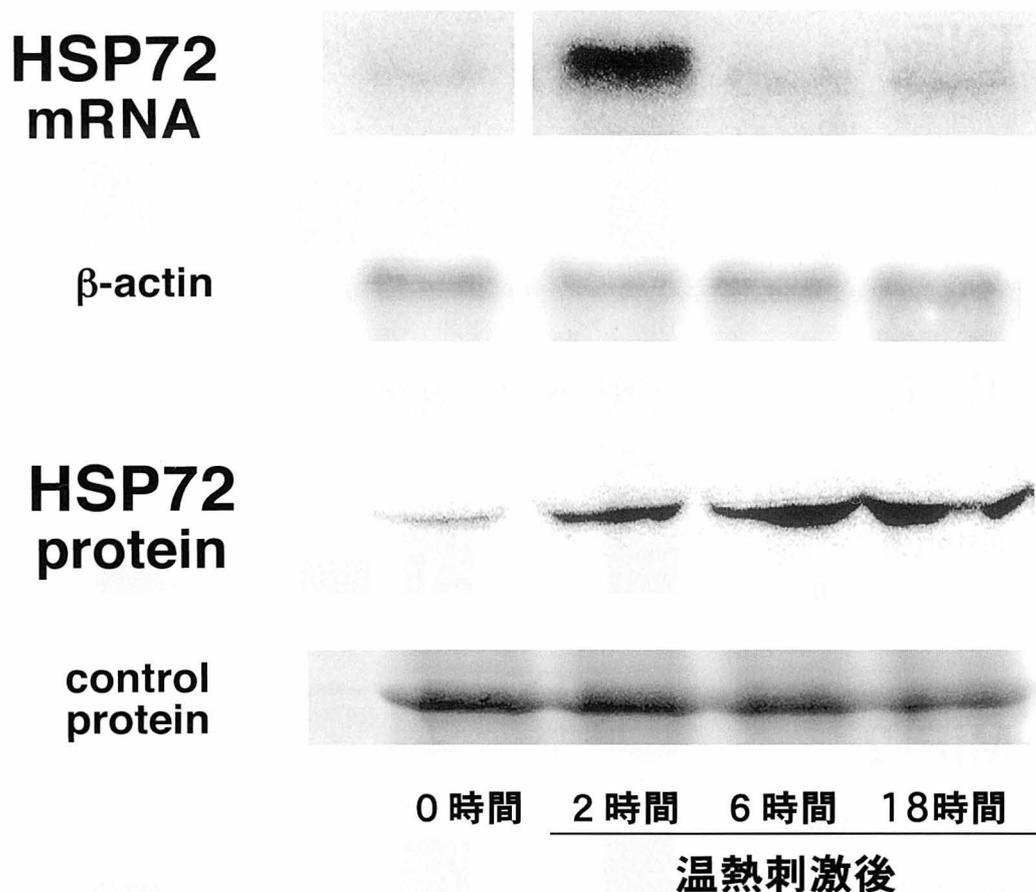


図6. ラット肺における温熱刺激後のHSP72 mRNAと蛋白発現

総RNAは温熱刺激から0, 2, 6, 18時間後に採取した。HSP72と $\beta$ -actinのmRNA発現をノザンブロット解析で確認した。HSP72 mRNAは温熱刺激から2時間後に誘導されたが、6から18時間後には減弱していた。HSP72蛋白はウェスタンブロット解析で確認した。HSP72蛋白は、温熱刺激から2時間後に発現量が増加し、6, 18時間後にはより増強した。

投与して肺障害を誘発した。このモデルは、肺障害の程度が軽度でありLPS投与の後、酸素投与や人工呼吸の補助なしに長時間（18時間）観察するのに適した実験モデルである。経過観察中に全身衰弱や下痢が認められたが、これらの合併症で死亡したラットはいなかった。HSP72の細胞保護効果を確認するため、ラットに全身への温熱刺激を加えて肺組織におけるHSP72誘導を観察した。温熱刺激後の18時間の観察時間は、温熱刺激の2時間後からHSPの発現が認められ、12から24時間続くという以前の論文に基づいて決定した<sup>11)</sup>。我々も肺組織のHSP72のmRNAと蛋白発現について解析を行い、2時間後よりmRNAと蛋白は誘導され、誘導された蛋白は少なくとも18時間後まで残存していることを確認した。

#### 肺障害の評価

肺障害の急性期には肺毛細血管透過性が亢進して肺水腫を形成し、その結果、肺コンプライアンスが減少する<sup>23)</sup>。今回の研究では、我々は肺コンプライアンスや血管透過性の変化を反映する二つの生理的指標、肺圧容量曲線と肺湿乾重量比を測定することでLPS誘導性肺障害を評価した。肺圧容量関係はRibeiroらの手技に基づいて解析したが、今回得られた正常ラットの全肺容量は彼らの結果と同程度であった<sup>16)</sup>。また今回の実験で正常ラットの肺湿乾重量比は、我々の以前の報告と同程度であった<sup>17)</sup>。温熱刺激の前処置、後処置いずれでも、LPS処置から18時間後の肺障害の生理的指標を有意に改善した。これらの結果は、温熱刺

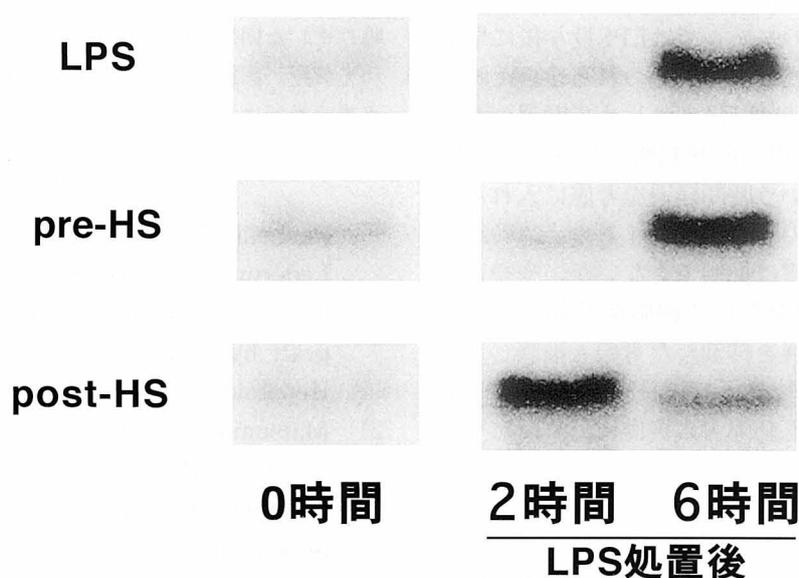


図7. LPS処置によるHSP72 mRNA発現の変化

肺組織のHSP72 mRNA発現の典型的なノザンプロット解析結果を示す。LPS投与から6時間後にHSP72 mRNAを誘導した。温熱刺激の前処置はLPS処置後のHSP72 mRNAの発現に影響しなかったが、温熱刺激の後処置はHSP72 mRNAの誘導を促進し、LPS処置から2時間後には強いHSP72 mRNAの誘導を確認した。

激をあらかじめ加えた場合のみならず、LPS投与の直後に加えた場合も、LPSによる急性肺水腫の抑制効果があることを示している。

#### 炎症性サイトカインの誘導とHSPの保護作用

温熱刺激による前処置の臓器保護効果は、肝臓、心臓、腎臓、肺などの臓器で報告されており、この作用機序としてHSPの関与が示唆されている<sup>1-9)</sup>。今回の実験では、温熱刺激は6時間後から18時間後までHSP72の誘導を持続させることを確認した。また、温熱刺激の前処置はLPSによる肺組織の2時間後のTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MIP-2などの炎症性サイトカインの遺伝子発現を抑制し、18時間後のLPS誘導性肺水腫を減少した。HSP72は温熱刺激のみではなくLPSなどのその他の様々な非温熱侵襲刺激によっても誘導され<sup>12, 24)</sup>、これらの侵襲刺激は相互作用を発揮し、様々な細胞や臓器において細胞保護的に作用することが報告されている<sup>25)</sup>。HSPによる細胞保護作用の機序の一つとして、炎症性サイトカインの抑制が示唆されている<sup>16, 26)</sup>。このことから温熱刺激の前処置は、HSPを誘導して炎症性サイトカイン発現を

抑制し、更なるサイトカインの誘導、引き続き起こる細胞障害を抑制し18時間後の肺水腫の改善に関与したと推察した。

今回の実験ではLPS投与直後に温熱刺激を加えた場合でも温熱刺激の肺水腫抑制効果を認めた。しかし、温熱刺激の後処置では肺組織の炎症性サイトカインの誘導抑制は明らかではなく、反対に血漿MIP-2濃度やMPO活性は増加した。LPS投与直後の温熱刺激は、LPSによる全身の炎症反応を促進し肺への活性化好中球の集積を促進したことを示唆している。すなわちLPS投与後に温熱刺激で処置しても、LPSによるサイトカインの誘導は抑制できないが、サイトカインによる肺障害発現を軽減する作用機序が働くと推察した。HSP72の細胞保護作用の分子メカニズムとしては、炎症性サイトカイン発現の抑制以外に、蛋白新生の段階で異常のある蛋白を修復する分子シャペロンとして働くこと、NF- $\kappa$ Bを不活性化することによる生理活性物質のシグナル伝達を抑制することが報告されている<sup>27, 28)</sup>。またHSPはTNF- $\alpha$ やIL-1 $\beta$ の刺激などによって活性化するアポトーシス経路の細胞内シグナル伝達を司っているactivat-

ing protein-1 (AP-1)を抑制することも報告されている<sup>29-31)</sup>. 今回のモデルではLPS投与後に早期にサイトカイン濃度の上昇が見られること, 肺障害発現はLPS投与18時間後にはじめて顕著になること, HSP72の発現は温熱刺激後12から24時間後に顕著になるという時間経過を考慮に入れると, 温熱刺激の後処置の場合にはサイトカインの誘導とそれによる肺障害は抑制できないが, やや遅れて誘導されるHSPを介して細胞保護効果が発現し, 肺障害への進展を抑制したものと推察した. さらに温熱刺激の後処置ではHSP72の誘導時期が促進されることも肺障害修復作用に貢献していると推察した.

#### 今後の課題

今回の実験では, 温熱刺激を加えることでLPS誘導性肺障害を抑制したことを示したが, HSPが関与しているという直接的な証拠は提示していない. また, LPS投与直後の温熱刺激により肺水腫の形成を抑制したが, MIP-2濃度やMPO活性は増加した. この結果は, 炎症反応が発現している細胞に温熱刺激を引き続き加えることは, アポトーシスによる細胞死に陥らせるという最近の報告<sup>32, 33)</sup>を裏付けるものである. 温熱刺激のタイミングによっては肺毛細血管透過性が悪化する可能性も示唆している. また今回の実験では, LPS投与直後の温熱刺激の効果しか検討しておらず, さらに細胞障害が進行した後の温熱刺激の効果については更なる検討が必要である. 今回の知見より, 臨床的有用性, 例えば急性肺障害の治療への応用に言及することはできないが, 分子レベルでのHSP発現は, 炎症, 感染, 虚血再環流などにより引き起こされる急性肺障害の予防, 治療に発現する可能性を示唆するものである.

#### 結 論

LPS投与の18時間前またはLPS投与直後の41.5°C, 15分の全身温熱刺激は, 肺組織にHSP72を誘導しLPS誘発性肺水腫の発現を抑制した. 温熱刺激の前処置ではHSPによる炎症性サイトカイン誘導抑制が, 後処置ではHSPによる細胞修復作用が, 肺保護に関与することを示唆した.

稿を終えるにあたり, 懇切なる御指導と御検閲を賜りました鳥取大学医学部器官制御外科学講座麻酔・集

中治療医学分野石部裕一教授, また御助言, 御検閲を賜りました同基礎病態医学講座分子医動物学分野平井和光教授, 同統合内科医学講座分子制御内科学分野清水英治教授に深謝いたします.

#### 文 献

- 1) Redaelli, C. A., Tian, Y. H., Schaffner, T., Ledermann, M., Baer, H. U. and Dufour, J. F. (2002) Extended preservation of rat liver graft by induction of heme oxygenase-1. *Hepatology* 35, 1082-1092.
- 2) Matsumoto, K., Honda, K. and Kobayashi, N. (2001) Protective effect of heat preconditioning of rat liver graft resulting in improved transplant survival. *Transplantation* 71, 862-868.
- 3) Schmitt, J. P., Schunkert, H., Birnbaum, D. E. and Aebert, H. (2002) Kinetics of heat shock protein 70 synthesis in the human heart after cold cardioplegic arrest. *Eur J Cardiothorac Surg* 22, 415-420
- 4) Delogu, G., Signore, M., Mechelli, A. and Famularo, G. (2002) Heat shock proteins and their role in heart injury. *Curr Opin Crit Care* 8, 411-416.
- 5) Redaelli, C. A., Tien, Y. H., Kubulus, D., Mazzucchelli, L., Schilling, M. K. and Wagner, A. C. (2002) Hyperthermia preconditioning induces renal heat shock protein expression, improves cold ischemia tolerance, kidney graft function and survival in rats. *Nephron* 90, 489-497
- 6) Xi, L., Tekin, D., Bhargava, P. and Kukreja, R. C. (2001) Whole body hyperthermia and preconditioning of the heart: basic concepts, complexity, and potential mechanisms. *Int J Hyperthermia* 17, 439-455.
- 7) Sugiura, M., Kuwabara, Y., Mitani, M., Sato, A., Shinoda, N., Kimura, M., Yano, M., Mitsui, A., Suzuki, T. and Fujii, Y. (2002) Effect of whole body hyperthermia on ischemia and reperfusion injury of rat intestine: real-time ATP change studied using (31)P-MRS. *Eur Surg Res* 34, 306-312.
- 8) Villar, J., Ribeiro, S. P., Mullen, J. B.,

- Kuliszewski, M., Post, M. and Slutsky, A. S. (1994) Induction of the heat shock response reduces mortality rate and organ damage in a sepsis-induced acute lung injury model. *Crit Care Med* **22**, 914-921.
- 9) Ribeiro, S. P., Villar, J. and Slutsky, A. S. (1995) Induction of the stress response to prevent organ injury. *New Horiz* **3**, 301-311.
- 10) Tsukeda, H., Maekawa, H., Izumi, S. and Nitta, K. (1981) Effect of heat shock on protein synthesis by normal and malignant human lung cells in tissue culture. *Cancer Res* **41**, 5188-5192
- 11) Villar, J., Edelson, J. D., Post, M., Mullen, J. B. and Slutsky, A. S. (1993) Induction of heat stress proteins is associated with decreased mortality in an animal model of acute lung injury. *Am Rev Respir Dis* **147**, 177-181
- 12) Ribeiro, S. P., Villar, J., Downey, G. P., Edelson, J. D. and Slutsky, A. S. (1994) Sodium arsenite induces heat shock protein-72 kilodalton expression in the lungs and protects rats against sepsis. *Crit Care Med* **22**, 922-929
- 13) Hiratsuka, M., Yano, M., Mora, B. N., Nagahiro, I., Cooper, J. D. and Patterson, G. A. (1998) Heat shock pretreatment protects pulmonary isografts from subsequent ischemia-reperfusion injury. *J Heart Lung Transplant* **17**, 1238-1246.
- 14) Weiss, Y. G., Maloyan, A., Tazelaar, J., Raj, N. and Deutschman, C. S. (2002) Adenoviral transfer of HSP-70 into pulmonary epithelium ameliorates experimental acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* **110**, 801-806
- 15) Chu, E. K., Ribeiro, S. P. and Slutsky, A. S. (1997) Heat stress increases survival rates in lipopolysaccharide-stimulated rats. *Crit Care Med* **25**, 1727-1732
- 16) Ribeiro, S. P., Rhee, K., Tremblay, L., Veldhuizen, R., Lewis, J. F. and Slutsky, A. S. (2001) Heat stress attenuates ventilator-induced lung dysfunction in an ex vivo rat lung model. *Am J Respir Crit Care Med* **163**, 1451-1456
- 17) Liu, R., Ishibe, Y. and Ueda, M. (2000) Isoflurane-sevoflurane administration before ischemia attenuates ischemia-reperfusion-induced injury in isolated rat lungs. *Anesthesiology* **92**, 833-840
- 18) Henson, P., Zanolari, B., Schwartzman, N. and Hong, S. (1978) Intracellular control of human neutrophil secretion. I. C5a-induced stimulus-specific desensitization and the effects of cytochalasin B. *J Immunol* **121**, 851-855
- 19) Miura, K., Fukumoto, S., Dirgahayu, P. and Hirai, K. (2001) Excretory/secretory products from plerocercoids of *Spirometra erinaceieuropaei* suppress gene expressions and production of tumor necrosis factor-alpha in murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide or lipoteichoic acid. *Int J Parasitol* **31**, 39-47
- 20) Dirgahayu, P., Fukumoto, S., Miura, K. and Hirai, K. (2002) Excretory/secretory products from plerocercoids of *Spirometra erinaceieuropaei* suppress the TNF-alpha gene expression by reducing phosphorylation of ERK1/2 and p38 MAPK in macrophages. *Int J Parasitol* **32**, 1155-1162
- 21) van Helden, H. P., Kuijpers, W. C., Steenvoorden, D., Go, C., Bruijnzeel, P. L., van Eijk, M. and Haagsman, H. P. (1997) Intratracheal aerosolization of endotoxin (LPS) in the rat: a comprehensive animal model to study adult (acute) respiratory distress syndrome. *Exp Lung Res* **23**, 297-316
- 22) Weiss, Y. G., Tazelaar, J., Gehan, B. A., Bouwman, A., Christofidou-Solomidou, M., Yu, Q. C., Raj, N. and Deutschman, C. S. (2001) Adenoviral vector transfection into the pulmonary epithelium after cecal ligation and puncture in rats. *Anesthesiology* **95**, 974-982
- 23) Ware, L. B. and Matthay, M. A. (2000) The acute respiratory distress syndrome. *New*

- Eng J Med 342, 1334-1349
- 24) Tomasovic, S. P. and Klostergaard, J. (1991) Bacterial endotoxin lipopolysaccharide modulates synthesis of the 70 kDa heat stress protein family. *Int J Hyperthermia* 7, 643-651
- 25) Lindquist, S. (1986) The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 55, 1151-1191
- 26) Ribeiro, S. P., Villar, J., Downey, G. P., Edelson, J. D. and Slutsky, A. S. (1996) Effects of the stress response in septic rats and LPS-stimulated alveolar macrophages: evidence for TNF-alpha posttranslational regulation. *Am J Respir Crit Care Med* 154, 1843-1850.
- 27) Yang, R. C., Chen, H. W., Lu, T. S. and Hsu, C. (2000) Potential protective effect of NF-kappaB activity on the polymicrobial sepsis of rats preconditioning heat shock treatment. *Clin Chim Acta* 302, 11-22
- 28) Yoo, C. G., Lee, S., Lee, C. T., Kim, Y. W., Han, S. K. and Shim, Y. S. (2000) Anti-inflammatory effect of heat shock protein induction is related to stabilization of I kappa B alpha through preventing I kappa B kinase activation in respiratory epithelial cells. *J Immunol* 164, 5416-5423
- 29) Gabai, V. L., Meriin, A. B., Mosser, D. D., Caron, A. W., Rits, S., Shifrin, V. I. and Sherman, M. Y. (1997) Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance. *J Biol Chem* 272, 18033-18037
- 30) Gabai, V. L., Meriin, A. B., Yaglom, J. A., Wei, J. Y., Mosser, D. D. and Sherman, M. Y. (2000) Suppression of stress kinase JNK is involved in HSP72-mediated protection of myogenic cells from transient energy deprivation. HSP72 alleviates the stewss-induced inhibition of JNK dephosphorylation. *J Biol Chem* 275, 38088-38094.
- 31) Park, H. S., Lee, J. S., Huh, S. H., Seo, J. S. and Choi, E. J. (2001) Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase. *Embo J* 20, 446-456
- 32) Asea, A., Kraeft, S. K., Kurt-Jones, E. A., Stevenson, M. A., Chen, L. B., Finberg, R. W., Koo, G. C. and Calderwood, S. K. (2000) HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependent pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med* 6, 435-442
- 33) DeMeester, S. L., Buchman, T. G. and Cobb, J. P. (2001) The heat shock paradox: does NF-kappaB determine cell fate? *Faseb J* 15, 270-274