

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15661

研究課題名(和文)敗血症性心筋の炎症制御と陽性変力作用改善を目的とした創薬基盤形成

研究課題名(英文) Drug discovery platform for improvement of positive inotropic effect in septic myocardium

研究代表者

松田 直之 (Matsuda, Naoyuki)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50332466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：BALB/cマウスにおいて盲腸結紮穿孔(CLP)を施し、敗血症モデルマウスとして、アドレナリン作動性受容体シグナルの変容を解析した。1-アドレナリン受容体およびG蛋白の発現に統計学的有意差を認めなかったが、敗血症の進行により受容体シグナルが減じることを確認した。敗血症病態の心筋では、ドブタミン刺激によるcAMPレベルは減少しており、敗血症においてドブタミンへの応答性が損なわれていた。細胞内情報伝達分子の解析では、PDE4Dが敗血症における心機能応答を調節する可能性を確認できた。敗血症性ショックに合併する低心拍出量患者に対して、PDE4D標的療法の有効性が本研究より示唆された。

研究成果の概要(英文)：We weighed the effects of dobutamine and milrinone as inotropes in BALB/c mice with cecal ligation and puncture (CLP)-induced sepsis. Surface expression levels of 1-adrenoceptors and alpha subunits of three main G protein families in myocardium were unaffected by CLP-induced sepsis. Plasma cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels were significantly elevated in both sham-operated and CLP mice in response to milrinone but only in sham-operated controls in response to dobutamine. Of phosphodiesterase (PDE) isoforms, PDE4D, but not PDE3A, both of which are responsible for cardiac cAMP hydrolysis, was significantly upregulated in CLP mouse myocardium. We define a novel mechanism for the impaired responsiveness to dobutamine as an inotrope in sepsis and understanding the role of PDE4D in modulating cardiac functional responsiveness in sepsis may open the potential of PDE4D-targeted therapeutic option in septic patients with low cardiac output who have a need for inotropic support.

研究分野：救急医学

キーワード：敗血症 受容体 ホスホジエステラーゼ PDE4 ドブタミン

1. 研究開始当初の背景

敗血症 (sepsis) は、感染症による全身性炎症による多臓器不全である。敗血症では、Toll-like受容体やtumor necrosis factor受容体などの炎症を惹起する受容体を介して、炎症性サイトカインや炎症性分子が新たに産生され、全身性炎症が急速に進展する病態である (Matsuda N and Hattori Y. J Pharmacol Sci 2006;101: 189-198)。敗血症は、国内外で罹患率と死亡率が高い病態として知られている。

このような敗血症は、急性循環不全としてショックを呈しやすい。このショックは、体血管抵抗の減弱する「血流分布異常性ショック」と心機能が低下する「心原性ショック」の2つを主体とする。敗血症における心筋障害の病態と創薬については、より一層の解明が必要と考えられている。

2. 研究の目的

敗血症の心機能低下の機序を心筋炎症と合わせて解明し、敗血症における心機能改善のための新規創薬基盤を提案することを目的とした。敗血症心筋において、陽性変力作用の減弱することが知られているが、この病態を詳細に評価することを目的とした。これにより、敗血症病態の心機能補助における有用な創薬の基盤を明らかとすることを目標とした。

3. 研究の方法

研究は、名古屋大学および富山大学の動物研究施設の承認および倫理指針に準じて施行された。

(1) 敗血症モデル動物

研究動物には、雄性 BALB-C マウス (8-10週, 体重 25-35 g) を用いた。敗血症病態の誘導には、盲腸結紮・穿孔 (cecum ligation and puncture : CLP) 法を用いた。CLP は、セボフ

ルランあるいはイソフルラン麻酔下で左臍下に約5 mmの切開を行い、虫垂の先端を剖出し、虫垂先端に糞便を充満させ、先端を結紮し、21G 針で穿孔を加える方法とした。対照群 (Sham 群) は、腹部切開と虫垂先端の膨出のみを行ったものとし、虫垂を腹腔内に戻した後、皮膚切開部を縫合する方法とした。マウス研究では、心エコーや非観血的血圧測定装置などで血圧測定と心拍数測定を行い、対照群、敗血症群、および治療群を研究対象とした。

(2) 敗血症マウスの陽性変力作用

陽性変力作用の評価には、ドブタミン (0.01-0.5 mg/kg 静注)、ミルリノン (0.01 mg/kg 静注)、およびリボシメンダン (0.5 μ g/kg/min 腹腔内持続投与) を用いた。ドブタミンとミルリノンの静注療法では、生理的食塩水 200 μ L に溶解し、尾静脈から緩徐に静注し、エコー下で心機能の解析とした。

(3) 陽性変力作用に関与する細胞内情報伝達蛋白の解析

マウスより、心室を摘出し、陽性変力作用に関与する細胞内情報伝達分子の変化を RT-PCR 法や Western Blot 法で評価した。評価する標的分子は、アドレナリン β 受容体 ($\beta 1$, $\beta 2$), $G_s\alpha$, $G_i\alpha$, $G_q\alpha$, アデニール酸シクラーゼ (AC), phosphodiesterase 3, phosphodiesterase 4, L 型カルシウムチャネル, 筋小胞体ホスホランパン (PLB), Ca^{2+} -ATPase, リアノジン受容体, Na^+ - Ca^{2+} 交換系 (NCX), およびリン酸化蛋白としてプロテインキナーゼ A (PKA), Epac, PKC サブタイプ, MAPK などである。リン酸化蛋白のリン酸化については、抗リン酸化抗体などを用いて評価を加えた。

(4) 心筋における炎症性分子の発現に関する評価

炎症性分子として, $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$,

MCP-1 などの心室筋における発現を敗血症の時系列で解析した。

4. 研究成果

(1) 敗血症の陽性変力作用の評価

CLP による敗血症病態では、右心室および右心室の収縮性が低下することを確認した。これは、腹腔内などに輸液負荷する状態でも同様だった。図 1 (A) および図 1 (B) は、CLP 作成後 24 時間における輸液負荷のない状態での左心室の機能評価のデータである。リボシメンダン (LIVO) は心機能を改善させることが確認された。一方、図 1 (C) のようにドブタミンを介した陽性変力作用は CLP18 時間語で既に低下しており、ドブタミンによる心機能改善は乏しいと評価した。

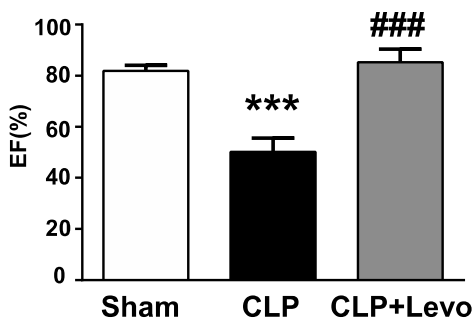


図 1 (A) エコー図による左室駆出率 %ejection fraction (EF) の評価

*** $p < 0.001$ vs sham. ### $p < 0.001$ vs CLP alone.

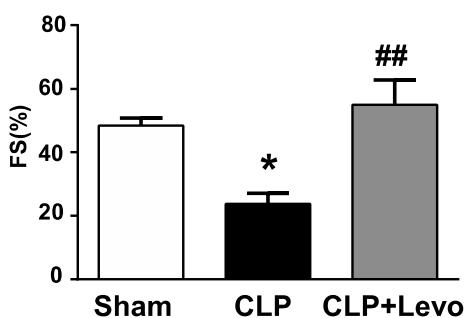


図 1 (B) .エコー図による左室内径短縮率 % fractional shortening (FS) の評価

* $p < 0.05$ vs sham. ## $p < 0.01$ vs CLP alone.

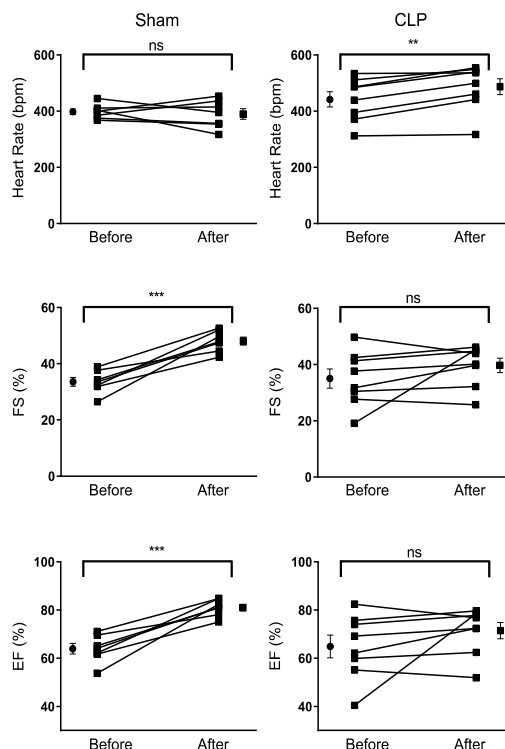


図 1 (C) ドブタミン 0.01 mg/kg 静注による心拍数とエコー図の最大反応の評価

(2) 陽性変力作用に関与する細胞内情報伝達蛋白の解析

CLP による敗血症病態で変化が著明だったのは phosphodiesterase4D (PDE4) だった。本研究における新たな発見は、PDE4 が敗血症病態の心筋細胞で産生が亢進するために、ドブタミンを介した cAMP 活性が低下することが確認された。cAMP 活性をマウス/ラット cAMP parameter Assay Kit (R&D System 株) で測定した結果、Sham 群で陽性変力作用の得られるドブタミン 0.01 mg/kg 静注では cAMP 濃度の上昇が得られず (図 2A), PDE 阻害作用のあるミルリノン 0.01 mg/kg 静注で cAMP 濃度の上昇が得られた (図 2B)。

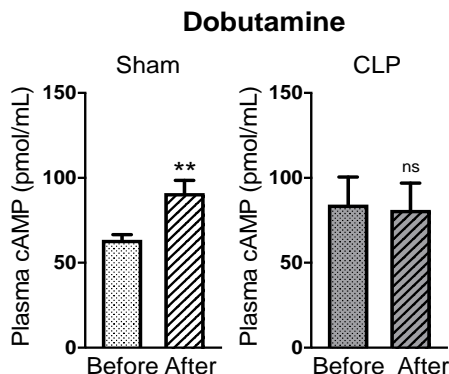


図 2A. ドブタミンによる cAMP 活性



図 2B. ミルリノンによる cAMP 活性

RT-PCR 解析 (図 2C) およびイムノブロット解析 (図 2D) では、PDEIIIではなく、PDEIVが CLP の心筋で有意に増加していた。マウス CLP モデルでは、陽性変力作用が減弱することが確認された CLP18 時間後において、 β 受容体や G 蛋白の発現に変化を認めなかった。

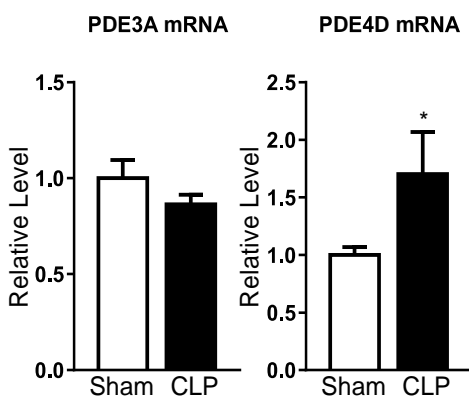


図 2C. PDE の RT-PCR による mRNA 解析

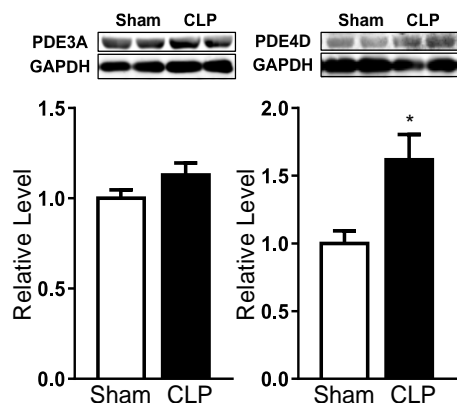


図 2D. PDE のイムノブロット解析

(3) 心筋における炎症性分子の発現に関する解析

敗血症病態の心筋細胞では、時系列で TNF- α , IL-1 β , IL-6が増加することを確認した。これらは、CLP の時系列において心筋内で増加しており、CLP 後 24 時間のレベルでも高く維持されていた。この作用を、ドブタミンは増悪させ、リボシメンダンが抑制する可能性を確認した。

(4) まとめ

本研究は、敗血症のモデル動物であるマウス CLP モデルを用いた敗血症心筋の解析である。敗血症病態で低下する心筋陽性変力作用の原因として、敗血症病態で PDEIV の転写が亢進することを見出した。

PDEIVは、心筋細胞内で PDEIIIと並び、 β 受容体刺激による cAMP の分解を促進する細胞内酵素である。米国では PDEIV 阻害薬として roflumilast (ロフルミラスト) が閉塞性換気障害 (COPD) の治療薬として承認されている。PDEIV 阻害薬は、炎症病態において心筋の陽性変力作用を正常化させる可能性として PDEIV 阻害薬が効果を持つ可能性がある。

一方、本研究により細胞内カルシウム感受性増強薬リボシメンダンが、心筋細胞における抗炎症作用を持つ可能性を確認した。敗血症病態における細胞内カルシウム過負荷との関連として、今後より一層の検討が必要と評価された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Sakai M, Suzuki T, Tomita K, Yamashita S, Palikhe S, Hattori K, Yoshimura N, Matsuda N, Hattori Y. Diminished Responsiveness to Dobutamine as an Inotrope in Mice with Cecal Ligation and Puncture-Induced Sepsis: Attribution to Phosphodiesterase 4 Upregulation. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 査読有, 2017 Apr 28. PMID: 28455289

② Wang Q, Yokoo H, Takashina M, Sakata K, Ohashi W, Abdelzaher LA, Imaizumi T, Sakamoto T, Hattori K, Matsuda N, Hattori Y. Anti-Inflammatory Profile of Levosimendan in Cecal Ligation-Induced Septic Mice and in Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophages.

Crit Care Med. 査読有, 2015;43:e508-20.

doi: 10.1097/CCM.0000000000001269.

PMID: 26468714

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 直之 (MATSUDA Naoyuki)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 50332466

(2) 研究分担者

服部 裕一 (HATTORI Yuichi)
富山大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 50156361