

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：32665

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15767

研究課題名(和文)敗血症・虚血再灌流傷害患者に対する5-アミノレブリン酸の抗炎症効果

研究課題名(英文)Anti-inflammatory effect of 5-aminolevulinic acid in patients with the sepsis and/or ischemic reperfusion injury.

研究代表者

木下 浩作(KINOSHITA, Kosaku)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：90260968

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：5-アミノレブリン酸(ALA)は、ヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)によって分解されるヘムの合成前駆体である。最近の研究では、5-ALAがHO-1 mRNAを誘導することが報告されている。本研究は継続中ではあるが、中間結果から敗血症患者における5-ALA経口投与がサイトカインIL-6産生を減少させた。HO-1は、敗血症などの様々なストレスによっても誘導されることが知られているが、敗血症時の炎症反応を抑制できる可能性を示唆している。今後、新たな治療戦略として敗血症患者で5-ALAがサイトカイン産生を抑制することが明らかになれば多臓器傷害への進展および転帰改善に寄与できる。

研究成果の概要(英文)：5-aminolevulinic acid (ALA) is a synthetic precursor of heme, which is degraded by heme oxygenase-1 (HO-1). Recent studies reported that 5-ALA induced the up-regulation of HO-1 mRNA. HO-1 is an isoform of heme oxygenase that catabolizes cellular heme to biliverdin, carbon monoxide, and free iron. This study demonstrated that treatment with 5-ALA marked reduction of cytokine IL-6 production. HO-1 is well-known to be induced not only by its substrate, but also by various stresses such as sepsis. We suggest that HO-1 expression could prevent the development of an inflammatory response such as sepsis. However, few reports have been presented on the mechanism of HO-1 induction by 5-ALA. 5-ALA could act in a protective manner in the inflammatory process and reduce cytokines which contribute to the development of multiple organ dysfunction and a poor outcome.

研究分野：救急集中治療医学

キーワード：アミノレブリン酸 サイトカイン 抗炎症効果

1. 研究開始当初の背景

5-アミノレブリン酸(以下ALAと略記)は、生物界に広く存在する天然アミノ酸で、野菜や赤ワインなどで日常の食事より摂取している。ALAは、ヘムやポルフィリン化合物の合成前駆体として必要不可欠な物質であり、ALAからプロトポルフィリン (PP) を経てヘムが合成される。このヘムタンパク質から遊離するフリー・ヘムはヘム・オキシゲナーゼによって、鉄イオン、ビリベルジンに分解される。ヘムの代謝・分解反応産物は鉄イオンはフェリチンの誘導を介して酸化ストレスを軽減する。ビリベルジン、一酸化炭素、いずれも重要な抗酸化作用や抗炎症作用を示す事が知られている。

近年、5-ALAから生合成されるプロトポルフィリン (PP) は、光(励起光)の照射により赤色の蛍光を発生し肉眼で観察できることからがんの診断に利用されている。これまでも5-ALAを脳腫瘍患者に40mg/kg経口投与した報告や子宮内膜症の患者に30mg/kg投与した報告や、がん診断(20mg/kg)などでも臨床応用され安全に投与されている。一方、敗血症やショック患者では、ヘム分解酵素が増加し、フリー・ヘム濃度が減少する事やALA mRNAが減少していることが知られている。臨床的に、敗血症や低血圧後の再灌流傷害患者は、多臓器傷害に進展することが、転帰悪化の一因になる。これら二次性臓器組織傷害への進展には持続する炎症と高サイトカイン血症が関係している。

これまで開発されている敗血症や虚血再灌流傷害患者に対する薬物療法は、全て対症療法にとどまり、高サイトカイン血症に対して有効である治療法は未だ無い。既にヒトへの投与実績がある安全性の高い5-ALAの抗炎症作用やヘム分解酵素の増加により、敗血症や虚血再灌流傷害患者で認められる高サイトカイン血症が抑制されれば、今後、比較的容易に敗血症治療薬、虚血再灌流傷害治療薬の開発につながる可能性がある。

2. 研究の目的

敗血症や低血圧後の再灌流傷害患者の二次性臓器組織傷害に侵襲後の高サイトカイン血症が関係している。代表研究者らは、二次性臓器組織傷害の進展機序として、生体侵襲の初期にはヘム分解酵素の活性化により、ヘム代謝産物が抗炎症性に機能するが、その後ヘム分解酵素の活性化によりヘムの消費が進むことで抗炎症性作用が減弱することの作業仮説を立てた。

予備研究として、ヒト肺動脈血管内皮細胞(5x10⁵ cells/well, n=6 wells)を敗血症等の炎症時に増加するlipopolysaccharide; LPS(1μg/ml)と混合培養(3, 24時間)し、炎症性サイトカインIL-6, 8 mRNAをTaqMan real-time RT-PCR法および上清中のIL-6, 8をenzyme-linked immunoabsorbent assay

(ELISA)法で測定し、別の群で、5-ALA 100μMを添加して、IL-6, 8値を測定した。LPS刺激単独では、培養液上清中のIL-6, 8産生およびIL-6, 8mRNAの発現は亢進した。そこに5-ALAを添加することにより、mRNA発現には影響を与えないが、IL-6, 8産生が有意に抑制(P<0.001)された。これらの結果から、敗血症などの生体に対しての過剰な侵襲時には、ヘム合成基質である5-ALAも枯渇するため、炎症反応が増大する。上記事実と我々の得た実験結果より、生体に対する過剰な侵襲時に5-ALAを外来性に投与することで、ヘムが合成され、ヘム代謝産物による抗炎症性作用が増強する機序を推定している。

本研究の目的は、敗血症や低血圧からの離脱後の虚血再灌流傷害患者に対して、ALAを投与することで、血中サイトカイン量が減少するかどうかを確認することである。

3. 研究の方法

本研究で用いる基準・定義

敗血症患者: 感染症を有する全身性炎症反応症候群診断項目2項目以上を有する患者

(米国胸部疾患学会、Critical Care Medicine学会1992年)

体温 < 36 or 38

脈拍 > 90/min

呼吸数 >20/min (or PaCO₂<32mmHg)

白血球 >12000/mm³ or <4000/mm³ (or 10%以上の幼若球出現)

研究計画

対象患者に対して、ALA 2 mg/kgを1日2回3日間胃管より投与する。

胃管投与前30分、投与後4時間に末梢血を約5 mL採取し、Bio-Plex Pro アッセイを用いて、以下の項目を測定する。

IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (70), IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN-, MCP-1 (MCAF), MIP-1, TNF-

対象患者

適格基準

次の選択基準及び除外基準をすべて満たす患者を対象とする。

選択基準

- 20歳以上の敗血症患者もしくは低血圧離脱後の虚血再灌流傷害患者で、循環動態が安定している患者。
- 胃管が挿入されており、経腸栄養開始が計画されている患者。
- 本研究の参加に関して、同意が文書で得られる患者。

除外基準

- 医師の判断により対象として不適当と判断された患者。

2. 研究薬・研究医療機器・研究医療材料等の概要

研究薬は、栄養食品として認可され、すでに流通されている。

医療分野では、腫瘍摘出手術における術中診断試薬として既に国外で販売されており、投与用量として 20mg/kg (経口投与) が承認されている。国内でも 20mg/kg 経口投与例として多くの臨床研究報告があり、安全性についても特筆すべき副作用は認められなかった。

本研究は、ALA の抗炎症効果として、サイトカイン産生抑制作用を確認するための探索的研究であるため、割り付けは行わず、上記適格基準にあった患者に投与する。

用法・用量

医療分野では、腫瘍摘出手術における術中診断試薬として既に国外で販売されており、投与用量として 20mg/kg (経口投与) が承認されている。(診断薬として広く安全に使用されている量は、20mg/kg である。)

国内でも 20mg/kg 経口投与例として多くの臨床研究報告があり、安全性についても特筆すべき副作用は認められなかった。1 回量を 2mg/kg (組織培養による先行研究より換算) として、1 日 2 回 3 日間 胃管より投与する。5-ALA をヒトに投与した時の吸収および代謝ヒトに ALA を 40mg/kg 経口投与し、ALA から生合成される PP を測定したところ、皮膚での最大濃度 (Cmax) は投与 6.5 から 9.8 時間後となり、40 時間でほぼ消失した。また、血漿中の濃度測定では、摂取 30 分後で ALA 濃度は最大になり 8 時間後には消失した。PP 濃度は 6.7 時間後で最大になり約 35 時間後には消失したと報告されている。

本研究は、ALA の抗炎症効果として、サイトカイン産生抑制作用を確認するための探索的研究であるため、割り付けは行っていない。

4. 研究成果

本研究は、施設内臨床研究審査委員会での審査 (承認期間 2019 年 1 月 31 日まで) を受けて実施している。補助事業期間平成 29 年度までに同意が取得できた 11 例 (147 サンプル) において、Bio-Plex などを用いて Hu IL-1b, Hu IL-2, Hu IL-4, Hu IL-5, Hu IL-6, Hu IL-7, Hu IL-8, Hu IL-10, Hu IL-12, Hu IL-13, Hu IL-17, Hu G-CSF, Hu GM-CSF, Hu IFN-g, Hu MCP-1, Hu MIP-1b, Hu TNF-a, および HO-1 (ng/ml) を測定した。

中間データであるが、アミノレブリン酸経口投与後は、炎症性サイトカイン Hu IL-6 (平均値 投与前 52.2、投与後 27.7pg/ml 平均値の差 24.5 Wilcoxon 検定 p=0.0481) であった。

この結果から、過大侵襲時には、ヘム合成基質である ALA も枯渇するため、炎症反応が増大するが、ALA を外来性に投与することで、

抗炎症性作用が増強したと推察している。組み入れ症例数が 11 例であり、施設内での承認期間での症例数を増やし、継続研究する予定である。

用語説明

全身性炎症反応症候群

全身性炎症反応症候群 (Systemic inflammatory response syndrome, SIRS) は、各種の侵襲によって誘引された全身性の急性炎症反応による症候で、致命的な多臓器不全状態の前段階として重要である。SIRS は、侵襲に対応して免疫細胞が血中に放出した大量の炎症性サイトカイン (高サイトカイン血症) による全身性の急性炎症反応である。SIRS を誘発しうる侵襲としては、細菌感染のほかに、外傷や手術、ショック、熱傷、脾炎や虚血再灌流傷害などがある。SIRS は、二次性臓器傷害に発展しうるという点で、非常に重要で、多臓器不全は往々にして致命的な転帰をたどることから、早期から集中治療を行ない、多臓器不全状態への発展を阻止することが求められる。

敗血症

感染によって惹起された全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome: SIRS)。すなわち感染の存在に加え、SIRS 項目 (体温 > 38 または < 36 , 心拍数 > 90/分, 呼吸数 > 20/分または PaCO2 < 32 torr, 白血球数 > 1,2000, < 4000/m3 または未熟型白血球 > 10%) の 2 項目以上をみたす病態と定義される。従来は、血液中の菌体の存在 (bacteremia) が強調されてきたが、この定義では必ずしも血液培養陽性を必要としない。敗血症のなかで、臓器障害、臓器灌流低下または低血圧を呈する状態を重症敗血症 (severe sepsis) という。臓器灌流低下または灌流異常には、乳酸アシドーシス、乏尿、意識混濁などが含まれる。重症敗血症のなかで、十分な輸液負荷をおこなっても低血圧が持続するものを敗血症性ショック (septic shock) という。これらの病態にみられる循環不全は、交感神経系の機能失調あるいは好中球などから放出されるメディエータによっておこり、また臓器障害は組織酸素代謝失調 (dysoxia) によっておこると考えられている。

虚血再灌流傷害

各種ショックなどからの離脱後に臓器傷害が発生している患者の総称。虚血状態にある臓器・組織に血液再灌流が起きた際に、その臓器・組織内の微小循環において種々の毒性物質の産生が惹起され引きおこされる障害をいう。虚血の時間と程度、臓器の種類などにより障害の程度は異なる。再灌流により血管内皮細胞傷害、微小循環障害をきたし、臓器障害に進展すると考えられている。障害を引きおこす機序として、スーパーオキシド

ド(O2-)やヒドロキシルラジカル(HO・)などの活性酸素や一酸化窒素(NO)などのフリーラジカル産生による障害,各種サイトカイン、エンドセリン,アラキドン酸など各種ケミカルメディエータ産生による障害,活性化好中球と血管内皮細胞の相互作用に基づく障害などの機序が考えられている。局所だけでなく二次的に全身の主要臓器に障害をきたす(遠隔臓器障害)。とくに脳・肺・肝・腎などが標的臓器となり,多臓器不全をきたす。心筋梗塞、脳梗塞、腸間膜血管閉塞症などに対する再灌流療法後や臓器移植後にみられることが多い。

サイトカイン

細胞から放出され、種々の細胞間相互作用を媒介するタンパク質性因子を総称してサイトカインと呼ぶ。おのおののサイトカインに特異的なレセプターが同定されている。サイトカインは免疫,炎症,生体防御において重要な役割を担っている。サイトカイン全般に共通する性格として,(1)タンパク質である,(2)極めて微量で効果を発揮する,(3)細胞表面のレセプターに結合し、細胞内シグナル伝達により効果を発揮する,(4)標的細胞特異性を示す,(5)主として産生局所で働く、すなわち、パラクリンあるいはオートクリン的に働く,(6)互いに連関した作用、すなわちサイトカインネットワークを形成する、ことがあげられる。サイトカインの中でもinterleukin(IL)-6は炎症反応などにおいて重要な役割を果たすサイトカインであり、古くから研究が進んでいる。またIL-8は好中球やTリンパ球に選択時に働く走化性因子であり、血管内皮細胞等でLPSなどの刺激により産生される。IL-6,8とも、敗血症や虚血再灌流傷害による血管内皮細胞傷害発生に関係する重要なサイトカインである。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nihon-u.ac.jp/department/eccm/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 浩作(KINOSHITA, Kosaku)
日本大学・医学部・教授
研究者番号:90260968

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

堀 智志(HORI, Satoshi)
伊原 慎吾(IHARA, Shingo)