

平成21年5月25日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2005-2008  
 課題番号：17590845  
 研究課題名 (和文) 敗血症に合併する腎不全に対する新しい治療法の開発： $\beta_2$  アドレナリン受容体補充療法

研究課題名 (英文) A novel therapy to acute renal failure associated with sepsis:  $\beta_2$  adrenoceptor therapy

## 研究代表者

中村明夫 (NAKAMURA AKIO)  
 帝京大学・医学部・講師  
 研究者番号：70266287

## 研究成果の概要：

アデノウイルスをベクターに $\beta_2$ アドレナリン受容体 ( $\beta_2$ AR) 遺伝子導入法を利用した $\beta_2$ AR 補充療法は、敗血症に合併する臓器不全、特に腎障害に対して防護効果を示し、生存率を改善することを動物実験において確認した。また、この $\beta_2$ AR 補充療法の安全性を動物実験から評価し、最適な投与量と投与経路を決定した。この $\beta_2$ AR 補充療法による臓器保護効果機序には、サイトカインを中心とする全般的な免疫関連メディエーターを調節する作用や、apoptosis の抑制、さらに生体の恒常性を維持しようとする神経、免疫、内分泌の生体防御システムの安定化作用が相互に関与していることを証明できた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	1600,000	0	1600,000
2006年度	900,000	0	900,000
2007年度	600,000	180,000	780,000
2008年度	300,000	90,000	390,000
年度			
総計	3400,000	270,000	3670,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、腎臓内科学

キーワード： $\beta_2$ アドレナリン受容体、遺伝子治療、多臓器不全、敗血症、尿路感染

## 1. 研究開始当初の背景

日本の1-4歳児の死亡率(1999年WHO)は10万人あたり33.0で先進国の平均より3割高く、病気別には肺炎や敗血症、心疾患、インフルエンザが平均より高いと報告されている。世界的には敗血症患者はこの

22年間で急増し、尿路系、呼吸器系、消化器系が3大感染部位となっている。敗血症は多臓器不全を合併した場合治療効果に乏しく、その死亡率は高いのが現状である。不全臓器別では肺、腎が高率に合併しやすく、腎不全の合併率は27-35%であると報告されて

いる。小児敗血症の予後を調査した論文では、小児 ICU へ入院した 495 名のうち、死亡率は sepsis(10.7%)、severe sepsis(65%)、septic shock(80%)であり、Pediatric Risk of Mortality(PRISM II)で表された重症度や臓器不全臓器数が増加するにつれ死亡率が上昇すると考えられている。そのため、敗血症から臓器不全への発展を阻止する方法が敗血症治療に求められ、輸液による循環不全の予防と薬物療法(抗 TNF- $\alpha$ 薬、NOS阻害薬、エンドセリン拮抗薬、ANP、Activated Protein C)などの試みが考案されている。しかしながら、臓器不全は感染症にたいする宿主の炎症反応により引き起こされるもので、現行の治療では活性化した炎症反応を制御できないため、治療効果も充分でない。我々は、以前、LPS 腹腔内投与によるエンドトキシショックモデル動物において、ショックにより低下した腎機能は $\beta$ 2アドレナリン受容体( $\beta$ 2AR)活性化により回復し、反対に阻害薬を投与すると生存率が低下する結果を経験した。この実験において、 $\beta$ 2ARの活性化が敗血症での腎機能を維持する機序として、腎臓内外の炎症性サイトカインと抗炎症性サイトカインの産生バランスを調節する作用が明らかにされた。生体内のメディエーターのバランスが炎症性サイトカインあるいは抗炎症性サイトカインのどちらかに傾いた時に臓器不全の準備状態になる。臓器不全の治療のためには、生体内の免疫関連メディエーターの動態を調節し、炎症と抗炎症のサイトカイン均衡を得ることが大事である。このことから、持続的に $\beta$ 2ARを活性化させる方法の開発が、敗血症によって攪乱される免疫システムの恒常性を維持し、過剰な炎症反応の是正することにより敗血症から腎不全への発展を予防できる新しい治療方法と考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、敗血症に合併した腎不全の治療方法として、持続的に $\beta$ 2ARを活性化させる $\beta$ 2AR補充療法の有効性を確立することである。 $\beta$ 2AR補充療法とはアデノウイルスをベクターにした生体内遺伝子導入法により $\beta$ 2ARを臓器内過剰発現させる方法である。本実験は、感染症による腎不全進展敗血症モデル動物を利用し、 $\beta$ 2AR補充療法による炎症反応調節機序を、免疫関連メディエーターの動態とその細胞内情報伝達系から検討し、この治療法が臓器機能や組織形態や、内分泌系、神経系へ与える効果を評価した。また、本研究期間内にこの生体内遺伝子導入法の導入効率と安全性を評価した。

## 3. 研究の方法

### 1. 敗血症多臓器不全モデル

感染症による敗血症、腎不全進展モデル動物として、腎内大腸菌投与による尿路感染後

敗血症モデルと、腎不全を伴う大腸菌腹腔内投与敗血症モデル動物2種を作成し、それぞれについて $\beta$ 2アドレナリン受容体( $\beta$ 2AR)の補充療法の効果を検討した。

### 2. $\beta$ 2AR補充療法の方法

$\beta$ 2-AR補充療法は、アデノ関連ウイルスをベクターとした human  $\beta$ 2AR transgene(adeno- $\beta$ 2AR)の遺伝子導入法により確立したもので、adeno- $\beta$ 2ARを腎臓内に導入した場合、心、肺、肝、腎に最大30日までの $\beta$ 2ARの持続発現と、その組織内分布(腎の場合は尿細管に集積)を確認できている。本実験では、生存率、生理学的検査、血液生化学検査と組織病理検査から、ウイルスによる機能障害、炎症惹起所見を認めない安全なアデノウイルス投与範囲量を評価し、発現量と持続期間を考慮して今回の実験の投与量を決定する。

### 3. $\beta$ 2AR補充療法の有効性

(1) 生存率の評価 Kaplan-Meier法にて生存率を計算する。

(2) 安全性評価：臓器機能検査と病理組織診断および血液と組織内 TNF- $\alpha$ 測定により評価する。また、Bacterial clearanceを血液、各臓器中の細菌数より測定する。

#### (3) $\beta$ 2ARの分布

腎臓の敗血症の状態と、 $\beta$ 2AR補充療法の状態における $\beta$ 2ARの変化を、受容体数と受容体親和性(RIAによる結合能実験)、遺伝子発現、蛋白量(Western blot)から評価する。

#### (4) 腎臓内神経系への影響

神経系は循環器系の調節を通じて腎機能維持に働くため、敗血症による神経活動の不均衡は腎不全を招く。そこで、 $\beta$ 2AR補充療法が腎臓内アドレナリン、ノルアドレナリン、ドーパミンの分泌や、受容体分布( $\alpha$ 1、 $\alpha$ 2、 $\beta$ 1、 $\beta$ 2)に与える影響を免疫組織化学法と放射性物質を用いた結合実験により評価する。

#### (5) 臓器機能への影響

(a) 腎機能：糸球体濾過率、腎血漿流量、浸透圧クレアランス、自由水クレアランス、尿中電解質

(b) 循環、呼吸機能：血圧、心拍数、呼吸数、血管抵抗を算出する。

(c) 消化管、肝胆膵機能：GOT、GPT、LDH、CPK、ビリルビン、アミラーゼ、血糖、Insulin。

(d) 血液、凝固系：炎症、貧血、溶血の評価に白血球、赤血球、ヘモグロビン、血小板、FDP、D-ダイマー、プロトロンビン時間

#### (6) 組織形態への影響

腎臓の組織変性、壊死、fibrin血栓、顆粒球の浸潤、単核球/マクロファージ(ED-1とPCNA)をスコア化し評価する。血管の内皮細胞障害はトロンボモジュリンの免疫組織化学染色法(SAB法)を用い、さらに内皮細胞の凝固系に関わる組織因子(TF)活性とE-セレクチン(ELAM-1)の発現を測定し障害を評価する。基底膜障害はファイブロンクチンの組織染色法で検討する。アポトーシスの評価

は、パラフィン包埋切片を用いアポトーシス細胞を検出 (TUNEL 法) し、新鮮凍結組織から、アポトーシス関連蛋白群 (Bax, Fas, Fas-L, Caspase 3) を免疫組織蛍光染色により解析する。

#### 4. 免疫機能調節効果

(1) サイトカイン均衡と他の炎症性メディエーターの調節効果:

サイトカイン均衡と  $\beta_2$ AR 活性化との関係の評価するために、血液および腎臓内のサイトカイン (TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-1ra, IL-6, IL-10, heat shock protein)、接着分子、NO 合成酵素 (NOS) や、生体防御に関係する神経、免疫、内分泌系に介在する因子を測定する。

(2) 内分泌系との関係:

内分泌系は免疫系にも大きく作用し、その不均衡は敗血症の炎症による臓器障害を促進させる。免疫系に関与する内分泌因子であるアンジオテンシン II、エンドセリン、アドレノメデュリン産生への作用を明らかにし、また、NOS、eNOS、iNOS とニトロチロシンの発現への影響を評価する。

(3) 腎臓内マクロファージへの効果:

組織内マクロファージの phenotype 変化をサイトカイン mRNA、サイトカイン assay (ELISA と Western blot) と TLR-2, TLR-4, TLR-9 発現 (Flow cytometry) により評価する。また、CD40, CD80, CD86 の細胞表面発現で活性化状態を評価 (Flow cytometry) する。さらに、蛍光ビーズの細胞内取り込みで貪食能を測定する。

(4) 細胞内情報伝達系の評価:

敗血症によって変動した細胞の増殖、分化、アポトーシスへ関係する細胞内情報伝達系への  $\beta_2$ -AR からのシグナル作用を解析する。採取し破碎した腎臓、肺、肝臓からの検体を、二次元電気泳動法や protein G-sepharose を用い精製した後、ウエスタンブロットやゲルシフト、ELISA にて以下の項目を測定する。

(1) G タンパク質の測定: Gs $\alpha$ , Gi $\alpha$ , Ras, Rho. (2) 細胞内伝達系の測定: cAMP, Protein kinase A, Protein kinase C (isozyme), MAPK (p42/p44, p38, JNK). (3) 転写制御因子の測定: NF- $\kappa$ B (p50, p52, p65), I $\kappa$ B, AP-1 (c-fos, c-jun), AP-2, CRE. (4) アポトーシスの測定: Bcl-2, Bax, p53, caspases, ICE, c-myc.

### 4. 研究成果

#### 1. $\beta_2$ AR 補充療法の有効性評価

(1) 生存率: 病原性大腸菌を暴露させたラットに腎血管阻血処置を行い作成した腎不全進展モデルの生存率は、病原性大腸菌の暴露のみでは 2 日後に 20% まで減少したが、 $\beta_2$ AR 補充療法を加えることにより 80% の生存率を確保することができた。

(2) 生理機能への影響: 腎機能 (糸球体濾過率、腎血漿流量、浸透圧クレアランス、自由水クレアランス、尿中電解質) はすべて回復した。一方、循環と呼吸機能 (血圧、心拍数、呼吸数、血管抵抗) には変化なく、消化管と肝胆機能 (GOT, GPT, LDH, CPK, ビリル

ビン、アミラーゼ、血糖、Insulin) は改善した。凝固系への改善効果は認めなかった。

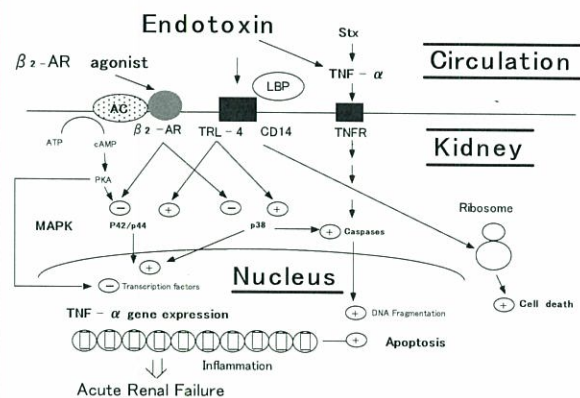
(3) 組織病理への影響: 腎臓の組織変性、壊死、fibrin 血栓、顆粒球の浸潤、単核球/マクロファージの浸潤は明らかに改善した。しかし、トロンボモジュリン、組織因子活性、E-セレクトインの発現には変化なく、血管の内皮細胞障害および内皮細胞の凝固系には作用なかった。一方、アポトーシス細胞の検出 (TUNEL 法)、アポトーシス関連蛋白群 (Bax, Fas, Fas-L, Caspase 3) は変化せずアポトーシスへの作用は示さなかった。

(4) 投与経路:  $\beta_2$ AR 遺伝子の単回皮下注射のみでも腎臓、肝臓、肺の  $\beta_2$ AR を充分に増加させることができ、敗血症による致死率の改善にも効果を認め、その有効性を確認できた。

(5) 安全性評価:  $\beta_2$ AR 補充療法はアデノウイルスを利用した遺伝子導入治療であるが、血液生化学検査および組織学検査において、使用ウイルスによる炎症所見は認めなかった。

#### 2. $\beta_2$ AR 補充療法の効果機序

本実験の敗血症モデルラットでは、腎臓、肝臓および肺における臓器障害を合併し、循環虚脱やサイトカイン (主に TNF- $\alpha$ ) 上昇による腎不全への発展が認められた。この状況においては  $\beta_2$ AR 活性の減弱とその伝達系を担う PKA-cAMP 系の抑制の他、MAPK と CD14-TLR4-TNF $\alpha$  系の活性化による TNF- $\alpha$  産生刺激と、apoptosis の促進が認められた。しかし、 $\beta_2$ AR の補充により PKA-cAMP は回復し、TNF- $\alpha$  産生抑制により IL-10 が増加し炎症が抑制され、apoptosis の抑制も加わることにより腎不全への発展を回避できた。このことから、敗血症の臓器障害に対する防御機構として  $\beta_2$ AR から細胞内伝達系各因子を通じての腎臓内炎症反応の調節と apoptosis 促進の阻止効果の重要性を確認できた。



一方、 $\beta_2$ AR 補充療法によって神経系 (アドレナリン、ノルアドレナリン、ドーパミン)、内分泌系 (アンジオテンシン II、エンドセリン、アドレノメデュリン、一酸化窒素代謝産物、内因性大麻)、免疫系 (マクロファージ、接着分子、NOS 産生) は、過剰な亢進や抑制反応を示さないことから、 $\beta_2$ AR 補充療法による臓器保護機序には、サイトカインを中心とする全般的な免疫関連メディエーター

の調節作用や apoptosis の抑制、そして生体の恒常性を維持しようと努める神経、免疫、内分泌の生体防御システムの安定化作用が関与していると結論した。

## 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 7 件)

1. Nakamura A, Niimi R, Yanagawa Y. Renal  $\beta_2$ -adrenoceptor modulates the lipopolysaccharide transport system in sepsis-induced acute renal failure. *Inflammation*. 32(1):12-19,2009
2. Nakamura A, Yanagawa Y. Role of  $\beta_2$ -adrenoceptor activation in sepsis-induced renal inflammation. *Current Immunology Review*. 5(1):49-53,2009
3. Nakamura A, Yanagawa Y. Pharmacogenomics and sepsis-induced renal failure: Effects of  $\beta_2$ -adrenoceptor function on the course of sepsis. *Current Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. 6,98-107, 2008
4. Nakamura A, Niimi R, Imaizumi A, Yanagawa Y. Renal effects of  $\beta_2$ -adrenoceptor agonist and clinical analysis in children. *Pediatr. Res.* 61,129-133, 2007
5. Nakamura A, Niimi R, Yanagawa Y. Renal hypouricemia in school-aged children: screening of serum uric acid level before physical training. *Pediatr. Nephrol* 21:1898-1900, 2006
6. Nakamura A, Imaizumi A, Yanagawa Y, Niimi R, Kohsaka T, E, J, Johns. Adenoviral delivery of the  $\beta_2$ -adrenoceptor gene in sepsis. *Clin. Science* 109:503-511, 2005
7. Nakamura A, Imaizumi A, Yanagawa Y, Kohsaka T, Johns E, J.  $\beta_2$ -adrenoceptor activation attenuates endotoxin-induced acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*.15(2):316-325, 2004

[学会発表] (計 2 件)

1. Nakamura A, Imaizumi A, Niimi R, Yanagawa Y. Impaired  $\beta_2$ -adrenoceptor-linked signal transduction mechanisms in pyelonephritis. 第 39 回米国腎臓学会議 2006, San Diego USA
2. Akio Nakamura, Niimi R, Imaizumi A, Yanagawa Y, Kohsaka T. Renal effects and adverse effects of  $\beta_2$ -adrenoceptor agonist given to children. 第 43 回欧州腎臓透析移植会議 2006, Glasgow, UK

[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]

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 明夫 (NAKAMURA AKIO)  
帝京大学・医学部・講師  
研究者番号：70266287

(2) 研究分担者

(平成 17-18 年度)

新実 了 (NIIMI RYO)  
帝京大学・医学部・助手  
研究者番号：10286990

(3) 連携研究者

今泉 晃 (IMAIZUMI AKIRA)  
医療法人珠光会・開発企画室・室長  
研究者番号：なし

Edward J. Johns  
College of Cork, Ireland, Department of  
Physiology, Professor  
研究者番号：なし