

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K11072

研究課題名(和文)水溶性・脂溶性に着目したスタチン系薬剤の細胞腫每での細胞障害作用の検討

研究課題名(英文)Differential cytotoxicity induced by statins in inflammatory milieu

研究代表者

張 京浩 (Chang, Kyungho)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：50302708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト肺胞上皮細胞由来のA549細胞に代表的な炎症性サイトカインを投与して、急性期肺障害のin vitroモデルとした。この系において、脂溶性/水溶性スタチンを中心として様々な抗炎症作用が期待される薬剤を共投与してその細胞保護作用と機序を検討した。スタチンについては種類を問わずむしろ細胞障害作用を惹起した。一方、グルココルチコイド・ラパマイシンは顕著な細胞保護作用を発揮し、特に両者の同時投与で相乗効果を認め、その細胞保護作用の機序としてはJNKの抑制とAKTの活性化を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性肺障害に対する抗炎症薬のin vitroでの保護効果としては、残念ながらスタチンの効果は認めなかったが、グルココルチコイドでの保護効果、抗炎症薬の共投与での相乗作用及び、その分子的機序の一旦を明らかにできた。奇しくも、この3年間の新型コロナウイルスパンデミックにおける、COVID-19重症肺炎でステロイドが有効なこと、他の抗炎症薬との共投与に意味があることに基礎研究上の裏付けを与えることができたので、今後とも学会発表及び論文公表で発信を行っていきたい。

研究成果の概要(英文)：Although pharmacological interventions have long been tried for resolution of ARDS, the results are far from satisfactory. We set an ARDS-simulating in-vitro model, where typical inflammatory cytokines are added in human alveolar epithelial cell-derived A549 cell culture, and searched for agents with cytoprotective property in this milieu. In this system, statins, irrespective of their hydrophilicity, did not show cytoprotection, but cytotoxicity. While, dexamethasone and rapamycin exerted significant cytoprotective effects through JNK inhibition and AKT activation. Especially, co-administration of both agents showed remarkable synergistic cytoprotective effect. This result gave a basic rationale for efficacy of dexamethasone and other anti-inflammatory agents on severe COVID-19 pneumonia in the situation of the novel coronavirus pandemic.

研究分野：集中治療医学

キーワード：急性呼吸促進症候群 ARDS デキサメサゾン 炎症性サイトカイン スタチン アポトーシス JNK AK

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

ARDS (急性呼吸窮迫症候群) の死亡率は依然として 30~50% と高く、薬物療法については、臨床研究で有効性を認めたものはほとんど無い。また唯一有望とされるステロイドも一貫した結果を示せておらず、またその作用機序も明らかではない。抗炎症効果を期待してのスタチンも一時有望とされたが、臨床研究では期待した結果を得られていない。ただし、スタチンについては薬物的特性に違いがあり、その特性に応じて臨床効果が変わってくる可能性があった。

加えて、スタチンは冠動脈疾患の予防のためにも広く臨床使用され、周術期にも継続が望ましいと推奨されている。しかしながら、これまでの臨床試験でも死亡率に対する改善効果が乏しいこと、また、最近のより動脈硬化ハイリスク群を対象とした臨床試験では心血管系イベントの抑制も弱いことが明らかになっている。この背景として、スタチンの中で特に脂溶性スタチンは肝以外の重要組織でも取り込まれ、そこでその毒性 (コレステロール以外の生体必須成分の産生阻害) が動脈硬化の抑制効果を相殺していることが懸念されている。そこで、様々な炎症状態をシュミレートした *in vitro* の細胞系でのスタチンの毒性及び細胞保護作用について、スタチン製剤の脂溶性・水溶性の違いに焦点をあてて検討し、スタチンそのもの、およびその周術期投与における安全性を、基礎的な生物学的データを基に再検証することは意義深いと考えた。

## 2. 研究の目的

様々な炎症状態をシュミレートした *in vitro* の細胞系でのスタチンの毒性及び細胞保護効果について、スタチン製剤の脂溶性・水溶性の違いに焦点をあてて検討し、スタチンそのもの、およびその周術期投与における安全性を、基礎的な生物学的データを基に再検証する。特に ARDS の薬物療法として、スタチンが、有効であるかどうかを *in vitro* の系で明らかにする。また、炎症性肺障害一般において、どのような細胞内情報伝達系が活性化されており、その中のどの系に介入することで細胞保護作用を引き出せるかどうかを検討する。

## 3. 研究の方法

ARDS の *in vitro* モデルとして、ヒト肺胞上皮細胞由来の A549 細胞に炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ ) を共投与して、炎症反応の惹起、細胞障害、及びアポトーシスシグナルが活性化する系を構築した。その系において、スタチンを始めとする様々な抗炎症薬を投与して、細胞保護作用があるか、あるとすれば、どのような細胞内情報伝達系が活性化しているかを解析した。

解析の手法としては、

### (1)細胞死の評価方法

培養液中の漏出 LDH の割合で細胞死を、生細胞 crystal violet 染色で survival を評価

### (2)アポトーシスシグナルの評価)

caspase3/7/9 の活性測定、Bcl/Bax 比、caspase により分断される蛋白断片の同定 (PARP や cytokeratin18 等) や、細胞保護因子 (HO-1 や heat shock protein ) の誘導量の変化、DNA 障害の有無 (histoneH2Ax のリン酸化) を western blotting 等で評価。

### (3)ミトコンドリア機能の評価)

チトクローム C の漏出を western blotting で、蛍光色素を用いてミトコンドリア膜電位を評価

## 4. 研究成果

2018 年度に、ARDS をシュミレートした *in vitro* モデルを構築し、その系での細胞傷害性を軽減するキー分子として、JNK と Akt が重要であることを明らかにできた。すなわち、炎症性サイトカインの関与する肺障害においては、少なくとも部分的には JNK の活性化によるアポトーシス経路が関与し、さらにその細胞障害性の軽減には、JNK そのものの活性抑制と、別途 Akt の活性化による survival 経路の賦活が重要である知

見を得たので、まずはその成果を論文として発表した。2019年度は、その系を用いて、主要な課題であるスタチンの前投与の効果を検証した。結果として、スタチンはその種類によらず細胞障害性を増幅するのみで、水溶性/脂溶性の違いによる生物学的効果の違いを見出すには至らなかった。2020年度には、新型コロナ肺炎の蔓延により、実験室での基礎的研究も一時頓挫することになったが、本実験課題での成果の一部として論文発表した知見（ステロイドが JNK の抑制と AKT の活性化を通じて炎症性肺障害に効果がある）が、予想外にも、現状のコロナ肺炎の標準治療薬となっている同薬剤の薬効の基礎的な機序の一部を説明していることとなった。他の論文でも新型コロナ肺炎でステロイドが効く機序として引用された。また、本研究で、ステロイドに加えて他の抗炎症薬を同時投与することで細胞保護作用が増強されることも示しているが、これも新型コロナ肺炎での抗炎症薬の複数同時投与の有効性の基礎的知見を与えることになった。2022年度には上記知見を、学会シンポジウム及び総説として発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

|  |                  |
|--|------------------|
| 1. 著者名<br>Ku wajima K, Chang K, Furuta A, Bougaki M, Uchida K, Sawamura S, Yamada Y.   | 4. 巻<br>7        |
| 2. 論文標題<br>Synergistic cytoprotection by co-treatment with dexamethasone and rapamycin against proinflammatory cytokine-induced alveolar epithelial cell injury. | 5. 発行年<br>2019年  |
| 3. 雑誌名<br>J Intensive Care   | 6. 最初と最後の頁<br>12 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1186/s40560-019-0365-5.  | 査読の有無<br>有       |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-        |

|                                       |                       |
|---------------------------------------|-----------------------|
| 1. 著者名<br>張京浩                         | 4. 巻<br>46            |
| 2. 論文標題<br>covid-19重症肺炎の病態生理と治療戦略     | 5. 発行年<br>2023年       |
| 3. 雑誌名<br>帝京医学雑誌                      | 6. 最初と最後の頁<br>inpress |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし         | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著<br>-             |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kyungho Chang, Ken Ku wajima, Ai Furuta, Masahiko Bougaki, Yoshitsugu Yamada, Shigehito Sawamura.  |
| 2. 発表標題<br>Synergistic cytoprotection by co-treatment with dexamethasone and rapamycin against inflammatory cytokine-induced alveolar epithelial cell injury. |
| 3. 学会等名<br>第46回日本集中治療医学会学術集会[Eng04]（国際学会）   |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|                            |
|----------------------------|
| 1. 発表者名<br>張京浩             |
| 2. 発表標題<br>covid-19肺炎の病態生理 |
| 3. 学会等名<br>第70回日本麻酔科学会学術集会 |
| 4. 発表年<br>2022年            |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kyungho Chang, Akihito Kainuma, Atsushi Yasuda, Daichi Onimaru, Shigehito Sawamura |
| 2. 発表標題<br>A pthological aspect of COVID-19 pneumonia as suggested by the L and H phenotyping |
| 3. 学会等名<br>日韓合同集中治療会議（国際学会）   |
| 4. 発表年<br>2023年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                          | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                           | 備考             |
|-------|--|---|----------------|
| 研究分担者 | 山田 芳嗣<br><br>(Yamada Yoshitsugu)<br><br>(30166748) | 国際医療福祉大学・国際医療福祉大学三田病院・教授<br><br><br><br>(32206) | 2019年度に分担から外れる |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

|         |         |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|