

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：34104

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K16464

研究課題名(和文)敗血症VILIに対するTRPV4チャンネルを標的とした治療

研究課題名(英文)The role of TRPV4 channel in on Ventilator-induced lung injury in Septic rats

研究代表者

川合 真子(Kawai, Masako)

鈴鹿医療科学大学・医用工学部・助教

研究者番号：80460640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：高一回換気量による人工呼吸はVILIを引き起こす。敗血症ラットモデルに対して、高一回換気量の人工呼吸によってVILIを誘発させ、TRPV4阻害薬(HC-067047)投与の肺障害抑制効果を確認した。全身麻酔下にて、CLPによる敗血症ラットモデルを作成し、TRPV4阻害薬を投与した後、35ml/kgの高一回換気量、3時間の人工呼吸管理を行い、肺を損傷させた上で、TRPV4阻害薬の効果を確認した。肺組織のIL-6、IL-10、CXCL1、CXCL2、CCL2のmRNA発現量において非投与群と比較して、TRPV4阻害薬投与群では有意な低下がみられ一定の効果が確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人工呼吸誘発肺障害(VILI)の発生機序は、局所的な肺胞の過膨張による損傷が原因とされ、肺胞上皮の損傷や、それらによって放出されるメディエータによる障害も考えられているが、はっきりとした要因は明らかになっていない。本研究では、敗血症ラットモデルにおいて、圧刺激で活性化するTRPV4チャンネルを阻害することにより、炎症性サイトカイン・ケモカインが低下することを確認できた。これは、VILIのメカニズム解明に一定の寄与をするものであり、敗血症におけるTRPV4の役割について明らかにすることが、学術的にも医学的にも必要であるとの示唆を与える。

研究成果の概要(英文)：The pathogenesis of mechanical ventilation-induced lung injury (VILI) is thought to be caused by damage to the alveolar epithelium via local alveolar hyperinflation and release of inflammatory mediators. The detailed mechanism, however, has not been clarified yet. In this study, we have confirmed that mRNA expression and protein levels of inflammatory cytokines (IL-6, IL-10) and chemokines (CXCL1, CXCL2, CCL2) were suppressed by inhibiting TRPV4 channels using its inhibitor (HC-067047) in experimental sepsis model in rats. This will make a certain contribution to elucidating the mechanism of VILI, and suggests that clarifying the role of TRPV4 in sepsis is academically and medically important.

研究分野：臨床工学

キーワード：敗血症 人工呼吸誘発肺障害VILI TRPV4

## 1. 研究開始当初の背景

高換気量・高気道内圧による人工呼吸は、人工呼吸誘発肺障害 (Ventilator Induced Lung Injury, VILI) を引き起こす。敗血症では、全身性炎症を呈し、血管透過性の亢進により ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome) を発症するとともに、肺血管抵抗が上昇し、結果として肺高血圧にいたる。TRPV4 (Transient Receptor Potential Vanilloid type 4) チャネルは、圧という機械刺激により活性化され、浸透圧調節及びナトリウム調節の役割を有するため、肺水腫の発生に関与すると想定されるが、同チャネルの下流にあるメディエータの詳細は不明である。

## 2. 研究の目的

実験的敗血症モデルラットに対して、高一回換気量の機械的人工呼吸によって VILI を誘発させ、TRPV4 阻害薬 (HC-067047) の投与により肺障害が軽減するかを確認した。具体的には、敗血症性 VILI の治療標的としての TRPV4 チャネルの役割を明らかにするため、肺組織の炎症性サイトカイン、ケモカインを mRNA 発現量およびタンパクレベルで確認した。

## 3. 研究の方法

8 週齢 SD ラット雄 17 匹 (BW 289 g ~ 313 g) を、①敗血症ラット + TV (一回換気量) 35ml/kg + TRPV4 阻害薬投与 : HC (+)、②敗血症ラット + TV 35ml/kg + DMSO 投与群 : HC (-)、③正常ラット + DMSO 投与群 : Control、の 3 つの群に分けた。

TRPV4 阻害薬投与群に対してのみ HC-067047 を 20 mg/kg を腹腔内投与し、全てのラットについて、1 時間後、ペントバルビタール (45mg/kg) 麻酔を行なった。無菌状態の下、右下腹部を開いて盲腸を出し、盲端の 2 cm 腸管を結紮した後、0.5 cm の穴を開いて便を押し出し、腸管を腹内に戻して腹部を縫合、敗血症モデルを作成した。続いて、右頸動脈に動脈カテーテルを挿入、右頸静脈に肺動脈カテーテル (内径 0.31 mm、外径 0.64 mm) を挿入した。腹部皮膚を閉じて 3 時間後、気管切開し、チューブ (外径 0.5 mm、内径 1.5 mm) を挿入、人工呼吸器に接続した。人工呼吸は、高一回換気量 (35mL/kg)、ルームエアにて 3 時間実施した。人工呼吸管理中は、留置した動脈カテーテルから 0.1 cc 採血し、血液ガス分析を行った。人工呼吸管理終了後は、過量麻酔投与し、開胸後組織サンプルを採取および肺水分量を測定した。肺組織サンプルからは、real time PCR を用いて mRNA 発現量、Western blotting 法にてタンパク質レベルでの炎症性サイトカインの発現量を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 死亡率

TRPV4 阻害薬投与群では全てのラットで 3 時間の人工呼吸実施が可能であったが、非投与群では、6 匹中 2 匹のラットが、3 時間の人工呼吸完了前に死亡した。このことから、高一回換気量の機械的人工呼吸の影響が TRPV4 阻害薬投与により抑制されていたことがうかがえる。

### (2) 肺水分量

TRPV4 阻害薬投与群で  $85.5 \pm 1.7$  [%]、非投与群で  $89.1 \pm 2.7$  [%] となって、有意差はみられなかったが、減少傾向は確認できた。TRPV4 阻害薬の投与により、血管外への水分漏出が抑制されたものと考えられる。

### (3) 摘出後肺組織における mRNA 発現量

TRPV4 阻害薬投与群 HC (+) と非投与群 HC (-) との比較で、IL-6、IL-10 は有意に減少し、IL-1 $\beta$ 、IL-1 $\alpha$  では減少傾向がみられたことから、TRPV4 阻害薬投与による炎

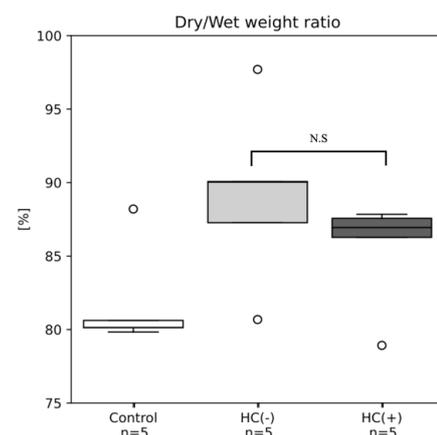


Fig.1 肺水分量

症の抑制が確認できたものと考えられる。

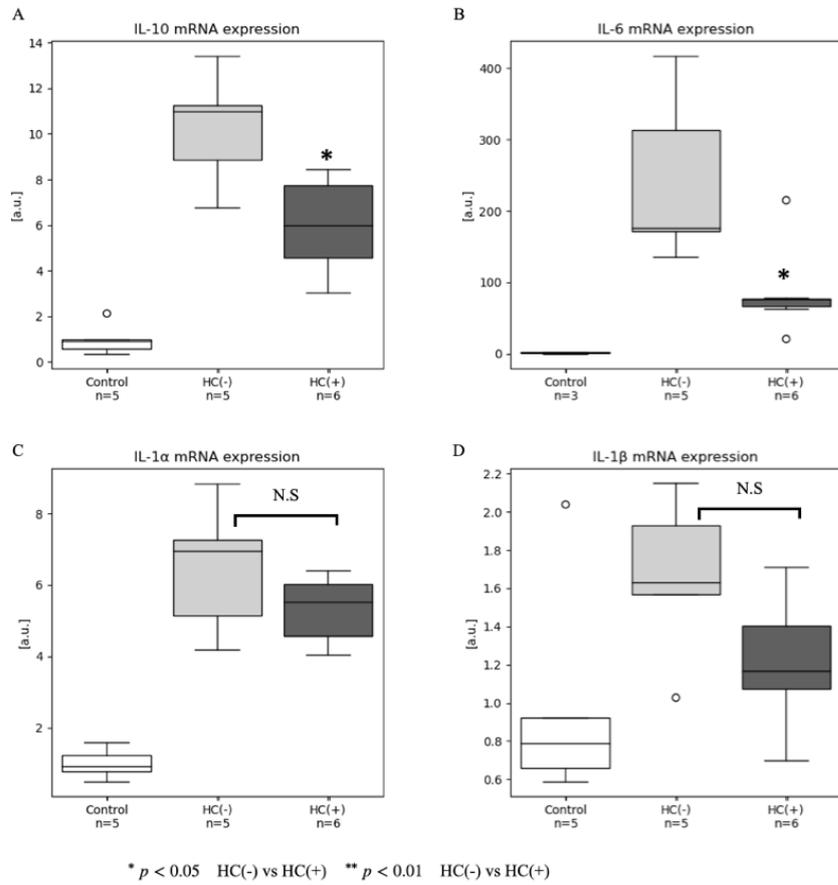


Fig.2 炎症性サイトカインにおける mRNA 発現量

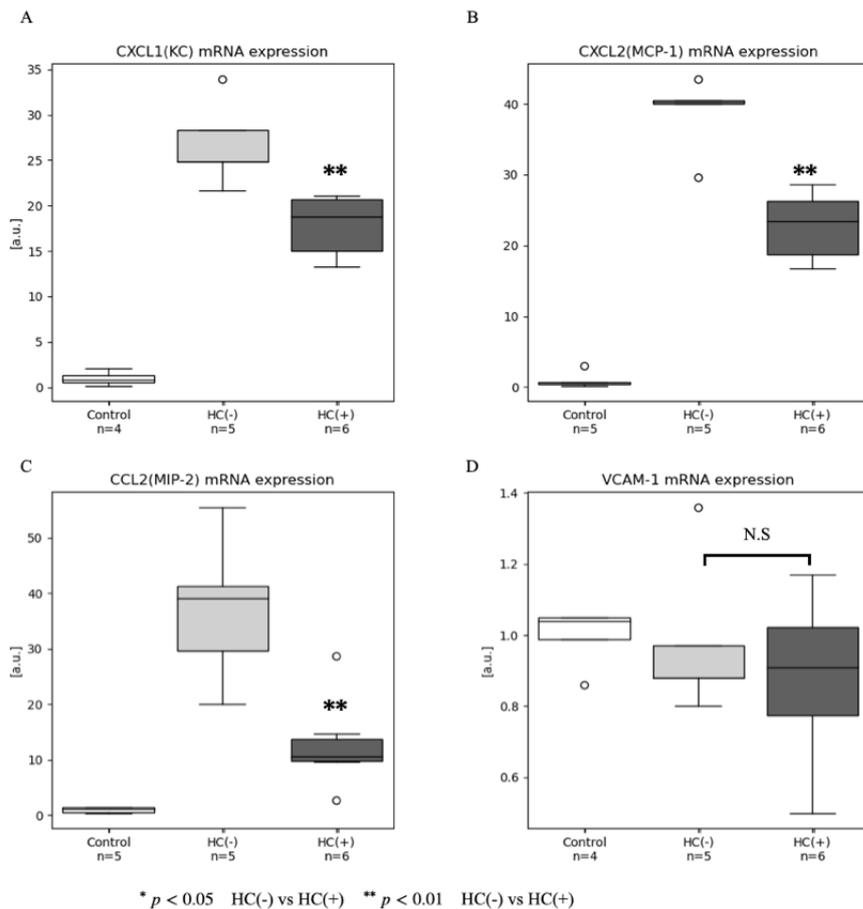


Fig.3 各種ケモカインにおける mRNA 発現量

また、CXCL1(KC)、CXCL2(MCP-1)、CCL2(MIP-2)におけるケモカインの発現量は、非投与群 HC (-) と比較して、TRPV4 阻害薬投与群 HC (+) で有意に減少していた。

(4) HMGB-1

TRPV4 阻害薬投与群 HC (+) において、非投与群 HC (-) と比較して、mRNA 発現量は上昇傾向であったが、有意差は認められなかった。一方タンパクレベルでは、TRPV4 阻害薬投与群 HC (+) で非投与群 HC (-) によりも有意な上昇がみられた。

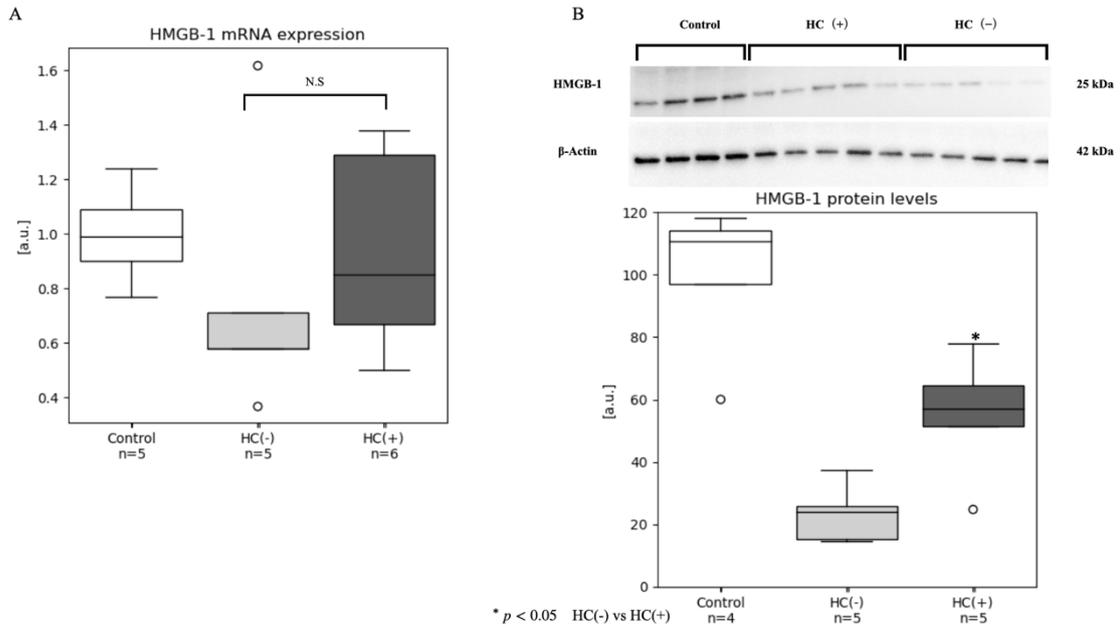


Fig.4 HMGB-1 A) mRNA expression B) protein level

(5) 平均肺動脈圧 (mPAP)

人工呼吸管理開始時から終了時にかけて、非投与群で TRPV4 阻害薬投与群よりも増加傾向を示したが、有意な差は認められなかった。

Table 1 平均肺動脈圧の変化 0 h : 人工呼吸開始時 3 h : 人工呼吸終了時

	mPAP - 0h	mPAP - 3h		mPAP - 0h	mPAP - 3h
HV(-)	20	30	HC(+)	13	22
HV(-)	20	20	HC(+)	13	13
HV(-)	18	30	HC(+)	16	17

以上の結果は、「TRPV4 阻害薬の投与は敗血症ラットに対する機械的人工呼吸誘発肺障害 VILI を抑制する可能性がある」ということを示唆している。本研究は、一種類の TRPV4 阻害薬のみでの結果であるから、引き続き今後の検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kawai Masako, Zhang Erquan, Kabwe Jane Chanda, Okada Amphone, Maruyama Junko, Sawada Hirofumi, Maruyama Kazuo	4. 巻 22
2. 論文標題 Lung damage created by high tidal volume ventilation in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Pulmonary Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/S12890-022-01867-6	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Masako Kawai 1 2, Erquan Zhang 1 3, Jane Chanda Kabwe, Amphone Okada, Junko Maruyama, Hirofumi Sawada, Kazuo Maruyama	4. 巻 78
2. 論文標題 Lung damage created by high tidal volume ventilation in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Pulmonary Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12890-022-01867-6	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Toshikazu Ito, Erquan Zhang, Ayaka Omori, Jane Kabwe, Masako Kawai, Junko Maruyama, Amphone Okada, Ayumu Yokochi, Hirofumi Sawada, Yoshihide Mitani, Kazuo Maruyama	4. 巻 21
2. 論文標題 Model difference in the effect of cilostazol on the development of experimental pulmonary hypertension in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Pulmonary Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12890-021-01710-4	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------