

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790933
 研究課題名（和文） 新規 NF- κ B 選択的阻害剤 DHMEQ による急性膵炎の重症化および多臓器不全の抑制

研究課題名（英文） Inhibition of severity of acute pancreatitis and MOF by a novel NF- κ B inhibitor, DHMEQ.

研究代表者

細田 充主 (HOSODA MITSUCHIKA)
 北海道大学・北海道大学病院・医員
 研究者番号：40443931

研究成果の概要：セルレインによる急性膵炎モデルで、新規 NF- κ B 選択的阻害剤 DHMEQ を用いて、重症化、多臓器不全の抑制効果について検討した。セルレイン膵炎を誘導することはできたが、DHMEQ による膵炎の抑制は血清学的にも、組織学的にも効果がなかった。そのため、多臓器不全モデルのセルレイン膵炎と LPS による致死率モデルを検討したが、モデルの確立には至らなかった。また、膵炎の程度、多臓器障害の程度を血清、組織学的に評価したが、DHMEQ による抑制効果は認められなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野：医試薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：NF- κ B、急性膵炎、多臓器不全、DHMEQ

1. 研究開始当初の背景

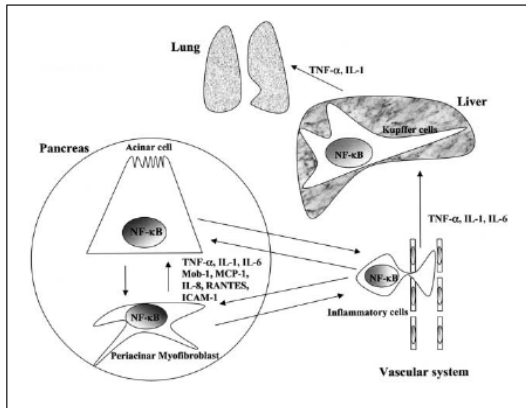
重症急性膵炎は良性疾患でありながら致命率は高く、予後不良の疾患であることから、1991年に難病に指定され、2003年には急性膵炎の診療ガイドラインが発行され実際の診療指針を提供するに至っている。しかし、重症例では抗生物質、蛋白分解酵素阻害剤、持続動注療法、持続血液濾過透析などの特殊療法を施行しても致死率は10～20%と高率で、いまだに有効な治療法が確立されていないのが現状である。最近、急性膵炎の重症化機序に免疫能障害の関与が示唆されており、急性膵炎により産生された炎症性 mediator が

発症後早期の全身性反応症候群（SIRS）による臓器障害を惹起する。この炎症性 mediator の代表例が IL-1, IL-6, TNF- α などのサイトカイン、ケモカイン、一酸化窒素(NO)であり、その産生の調節に関与しているのが NF- κ B と呼ばれる転写因子である。この NF- κ B は DNA に直接結合し様々な炎症性 mediator の産生を引き起こすため(図 1)、NF- κ B の抑制が急性炎症による SIRS の病態を沈静化させ、さらには引き続き起こる急性肺障害(ARDS)、急性膵炎の死因として重要な多臓器不全症候群(MODS)への進行抑制に寄与すると示唆されている(図 2)。

図1 NF-κBにより誘導される炎症性 mediator

<i>Tumor necrosis factor</i>	<i>Chemokines</i>
TNFα	IL-8
TNFβ	Gro α, β, γ
<i>Colony stimulating factors</i>	RANTES
G-CSF	MCP-1/JE
GM-CSF	<i>Adhesion molecules</i>
<i>Interleukins</i>	ICAM-1
IL-1β	E-selectin
IL-2	V-CAM
IL-6	<i>Enzymes</i>
IL-12	COX-2
<i>Interferons</i>	iNOS
IFN-β	

図2 急性膵炎による多臓器不全とNF-κBの関与



2. 研究の目的

新規NF-κB選択的阻害剤のDehydroxymethylepoxyquinomicin(DHMEQ)を用いて、急性膵炎の抑制、MODSへの進行の抑制を試み、重症化の機序、MODSのメカニズムとNF-κBの関与を解明し、新規の重症急性膵炎抑制法の基礎的開発法を検討することである。

3. 研究の方法

(1) 急性膵炎の重症化因子に対するDHMEQによる抑制効果の検討(In vitro)

分離予定細胞：①腺房細胞 ②肺マクロファージ ③好中球

上記細胞を分離し、セルレインまたはLPSあるいは両者による刺激に対する反応とDHMEQ添加による下記因子の活性抑制を評価する。

評価項目：①cytokine(IL-1 / IL-6 / TNF-α / IL-10 / TGF-β) ②NF-κB(EMSA)

上記各細胞における各種刺激に対する

①サイトカイン産生の上昇、あるいは②NF-κBの活性上昇とDHMEQによるサイトカイン産生抑制、NF-κB活性抑制効果の評価を行う。

(2) 急性膵炎重症化モデルにおける致死率の検討

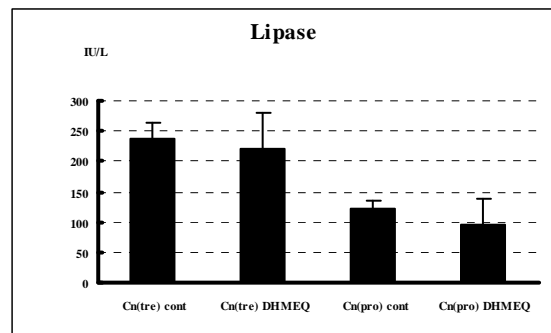
10～12週齢のC57BL/6Jマウスを用いて急性膵炎による多臓器不全を発症させる。急性膵炎はコレシストキニンanalogのセルレインを50ug/kgの投与量を1時間おきに7回腹腔内投与する。その2時間後にLPSを10mg/kgの投与量で静脈内投与することで2次感染を模倣し多臓器不全を発症させる。

膵炎発症前(prophylactic group)あるいは発症後(treatment group)にDHMEQを12mg/kgの投与量で腹腔内投与し致死率の改善効果について検討した。

4. 研究成果

(1) 急性膵炎の重症化と多臓器不全の機序とNF-κBとの関与を解明するため、新規NF-κB選択的阻害剤DHMEQを用いて、セルレイン(Cn)膵炎モデルで検討した。

まず、C57BL/6Jマウスを用いてCn急性膵炎を作製した。コレシストキニンanalogであるCnを1時間おきに6回腹腔内投与(ip)することで急性膵炎が起きていることを確認した。DHMEQによる急性膵炎の抑制効果を検討するため、まずCn投与2時間前にマウスにDHMEQを12mg/kgの用量でipし(予防的投与群:pro)、文献上言われている膵炎のピークであるCn初回投与12時間後に血清、組織学的検討を行ったが、血清のlipaseではcontrol群に比較し、やや低かったものの有意の抑制を認めず、amylaseは有意の抑制をみなかった(図3)。そこで、犠牲死の時間を変えて検討したが、いずれもcontrol群と比較して差がなかった。そこで、DHMEQ投与時間をCn最終投与後2時間に変更し(治療的投与群:tre)血清、組織学的検討を行った。しかし、予防的投与群と同様に血清、組織とも膵炎の程度はcontrol群と同程度で膵炎を抑制することは出来なかった(図3)。



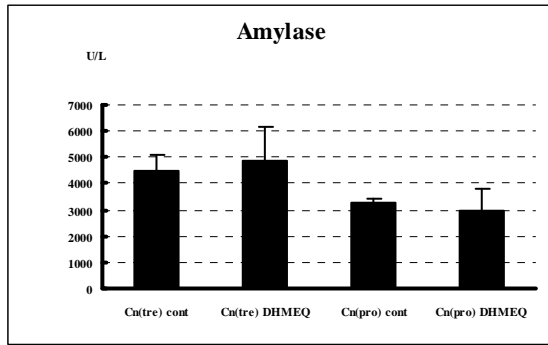
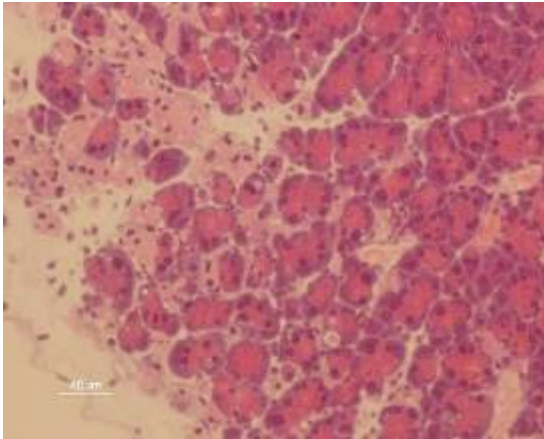


図3 Cn 膵炎後アミラーゼ、リパーゼ
Cont: control

(2) また、組織学的検討においても膵炎の程度(空砲化、壊死性変化、浮腫)は、予防、治療的投与群に関わらず control 群と同程度であった(図4)。

A: control (12h) pro



B: DHMEQ (12h) pro

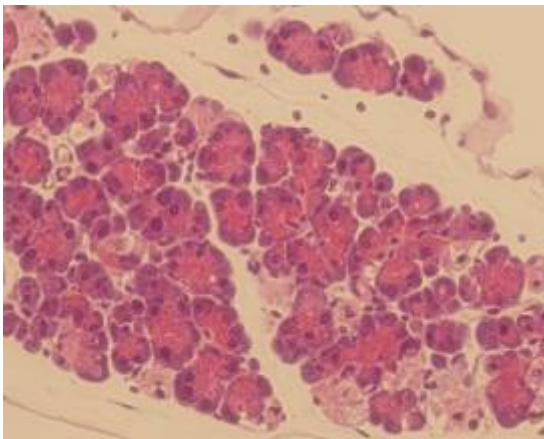


図4 Cn 膵炎後組織学的評価
12 時間後予防的投与群
A: コントロール
B: DHMEQ 投与群

(3) さらに、全身への影響として肝機能、腎機能の指標として GOT, GPT, LDH, BUN, Cre を測定したがいずれも予防、治療的投与、測定時間に関わらず control と同程度であった(図5、6)。

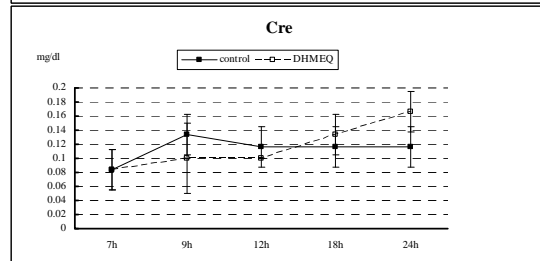
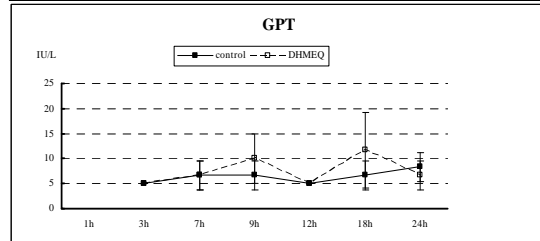
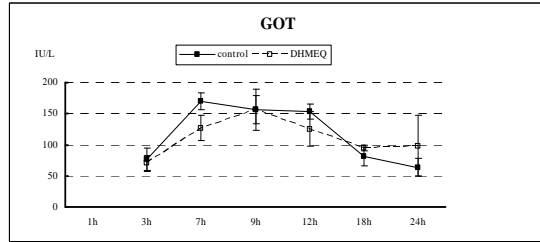


図5 Cn 膵炎後肝腎機能評価
(予防的投与群)

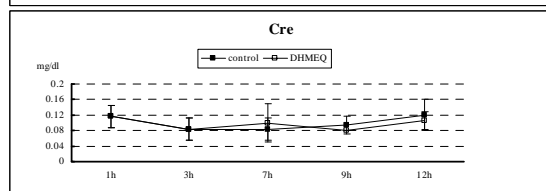
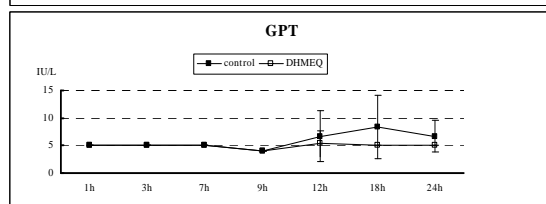
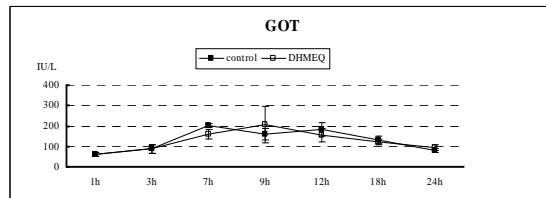


図6 Cn 膵炎後肝腎機能評価
(治療的投与群)

(4) Cn 膵炎モデルでの DHMEQ による膵炎抑制効果は認められなかったことから、Cn 膵炎後 LPS を腹腔内投与(ip)し、致死モデルを作製した。まず、LPS の投与量による致死量を決定するため、LPS 単剤による致死率を検討した。過剰投与にても致死が得られないため、LPS の投与方法を ip より静脈内投与(iv)へ変更した。しかし、確実な致死率が得られないため、マウスの種類を C57BL6 より BALB/c へ変更した。その結果、安定した致死率が得られ、LPS 投与量も 3mg/kg と決定した。重症急性膵炎モデル(Cn+LPS)による致死率を検討した。Cn を 1 時間おきに 6 回 ip し、その 2 時間後に LPS を iv する致死性急性膵炎モデルを検討した。DHMEQ は Cn 投与終了時に 12mg/kg ip した。しかし、Cn+LPS モデルではコントロールでも全例生存してしまう結果となってしまった。Cn、LPS の溶解に用いている生理食塩水が Cn 投与 6 回で補液効果となってしまい、生存が得られたのではと考えられた。

(5) 血清学的評価では、amylase, lipase のピークは Cn 初回投与後 9 時間で Cn 膵炎より早めにピークが来ていたが、特に逸脱量に相違はなかった。また、治療群と control 群ではほぼ同程度であった(図 7)。

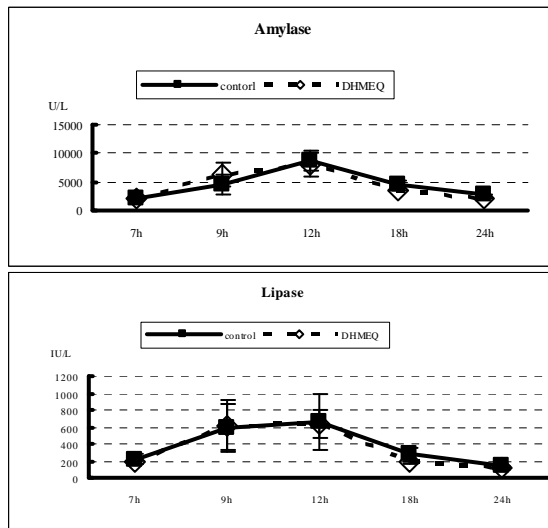
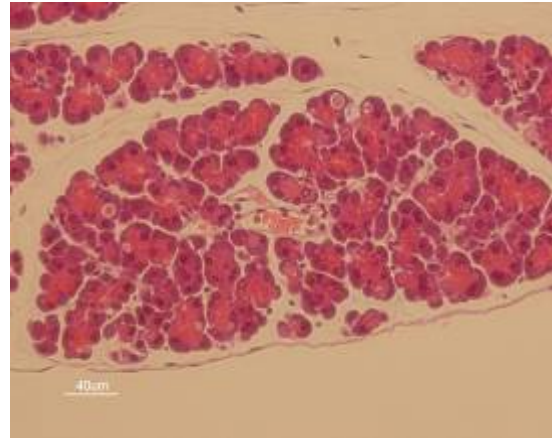


図 7 : Cn+LPS 膵炎後のアミラーゼ、リパーゼおよび DHMEQ の予防的投与の検討

(6) また、組織学的検討においても膵炎の程度(空砲化、壊死性変化、浮腫)は control 群と同程度であった。

A: Cn+LPS Control 12h pro



B: Cn+LPS DHMEQ 12h pro

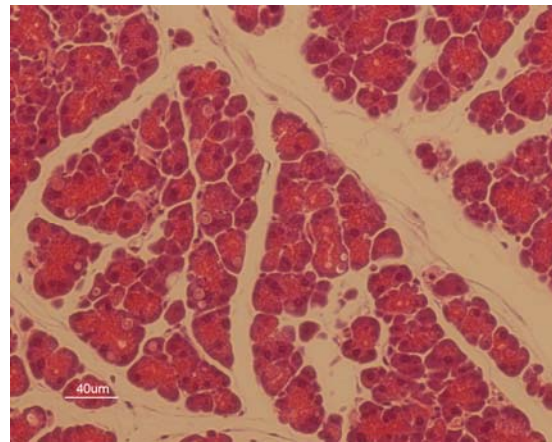
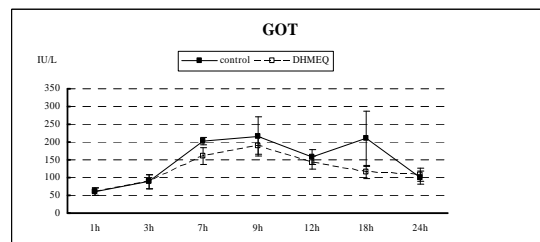


図 8 Cn+LPS 膵炎後組織学的評価
12 時間後予防的投与群
A:コントロール
B:DHMEQ 投与群

(7) 全身への影響として肝機能、腎機能(GOT, GPT, LDH, BUN, Cre)を評価したがいずれも測定時間に関わらず control と同程度であった(図 9)。DHMEQ の投与時期を変更(予防的投与、治療的投与)しても変わらなかった。また、組織学的評価において、肝細胞の ballooning などの浮腫、炎症所見も control と DHMEQ 群で同程度であった。

すなわち、DHMEQ による Cn 膵炎における膵炎の重症化を抑制することはできなかった。



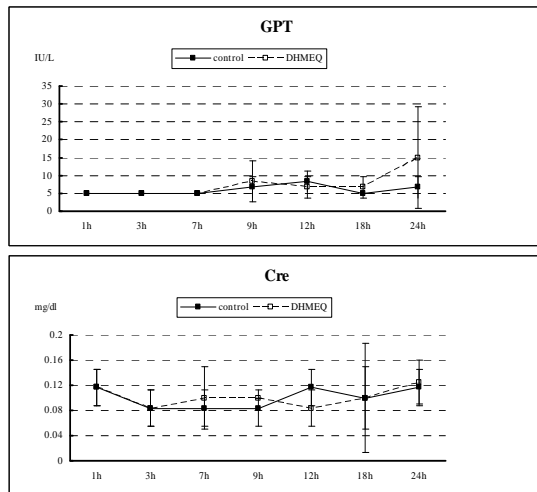


図 6 Cn+LPS 膵炎後肝腎機能評価
(治療的投与群)

(3) 連携研究者
なし

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 2 件)

- ① 日本臓器保存生物医学会
(H20.11.22) 高橋 徹 膵ラ氏島における新規 NF- κ B 阻害薬 dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) の IBMIR 及び免疫抑制効果について (六本木アカデミーヒルズ)
- ② 第 20 回代用臓器・再生医学研究会
(H20.2.2) 高橋 徹 選択的 NF κ B 阻害剤 DHMEQ のドナー投与によるマウス肝内膵島移植成績の改善効果
北海道大学学術交流会館(小講堂)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細田 主充 (HOSODA MITSUCHIKA)
北海道大学・北海道大学病院・医員
研究者番号：40443931

(2) 研究分担者

藤堂 省 (TODO SATORU)
北海道大学・医学研究科・教授
研究者番号：60136463

松下 通明 (MATSUSHITA MICHIAKI)
北海道大学・保健科学研究所・教授
研究者番号：20250425