

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10680

研究課題名(和文)敗血症性肝不全の改善をめざした硫化水素供与体投与の効果に関する分子生物学的検討

研究課題名(英文)Molecular mechanism of H₂S donor on liver damage in an animal model of sepsis.

研究代表者

鵜沼 香奈 (Unuma, Kana)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授(キャリアアップ)

研究者番号：30586425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：硫化水素は抗炎症作用や抗酸化作用を有し、種々の炎症性疾患において臓器保護効果があるとされる。本研究ではリポ多糖(LPS)誘発性の敗血症によって生じる急性肝障害に対して、硫化水素が保護効果を発揮するという仮説をたて、そのメカニズムを解明することを目的として研究を行なった。その結果、敗血症群でのサイトカイン上昇が、低濃度硫化水素で緩和されることを明らかにした。さらに、敗血症群では新規抗酸化酵素として見いだされたペルオキシレドキシシン4(Prx4)の遺伝子発現量が上昇すること、この上昇が低濃度硫化水素で抑制傾向になることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PRX4は細胞内では小胞体に多く存在する分泌型のタンパク質である。本研究の結果から、PRX4は敗血症病態を反映する可能性が示唆され、敗血症早期診断の有用なマーカーとなり得る可能性を明らかにした。また、敗血症病態への早期硫化水素投与により敗血症病態緩和に働く可能性が示された。これらの結果は、致死率の高い敗血症の早期診断、治療応用につながる可能性があり、学術的意義があるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Hydrogen sulfide (H₂S) has anti-inflammatory and anti-oxidant effects, and is known to have organ-protective effects in various inflammatory diseases. The purpose of this study is to demonstrate that hydrogen sulfide has a protective effect against acute liver damage caused by lipopolysaccharide (LPS) -induced sepsis. We revealed that the increase in cytokines in the septic group was alleviated by low concentrations of hydrogen sulfide. Furthermore, the gene expression level of peroxiredoxin 4 (Prx4) was increased in the septic group, and this increase tended to be suppressed by low concentrations of hydrogen sulfide. These results indicate that administration of hydrogen sulfide may help alleviate the pathological condition of sepsis.

研究分野：法医学

キーワード：敗血症 硫化水素 リポポリサッカリド 敗血症性肝障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

敗血症は、感染により免疫系の正常な制御を逸脱した全身性炎症反応が生起された状態である。敗血症の予後は高サイトカイン血症やそれに伴う全身の炎症反応と臓器障害が大きく関わっており、肝障害を早期に合併した症例は死亡率が高まることが報告されている。したがって、早期からの炎症制御と臓器保護が予後改善の鍵となると考えられ、迅速な診断が要されるが、現在でも確実な早期診断マーカーはなく、治療開始の遅れから救命困難になり得ること、発症早期より急性多臓器不全を発症し死に至ることがあることなどから、法医学剖検事例としても経験することが少なくない。

硫化水素(H₂S)は、毒ガスとして知られるガス状分子であるが、生体内で産生され、抗炎症作用や抗酸化作用を有し、種々の炎症性疾患において臓器保護効果があるとされる。ごく最近、低濃度硫化水素吸入による敗血症モデル動物の生存率改善や炎症性サイトカイン抑制などが報告された。このように硫化水素は敗血症を含め様々な病態において臓器保護的に働くことが示されているが、その分子機構の詳細は未解明である。

2. 研究の目的

この研究では、敗血症性肝不全(敗血症による急性肝障害)の分子学的な機序の解明、硫化水素投与による臓器保護効果について、その作用メカニズムを生体および分子レベルで解明することを目的とした。

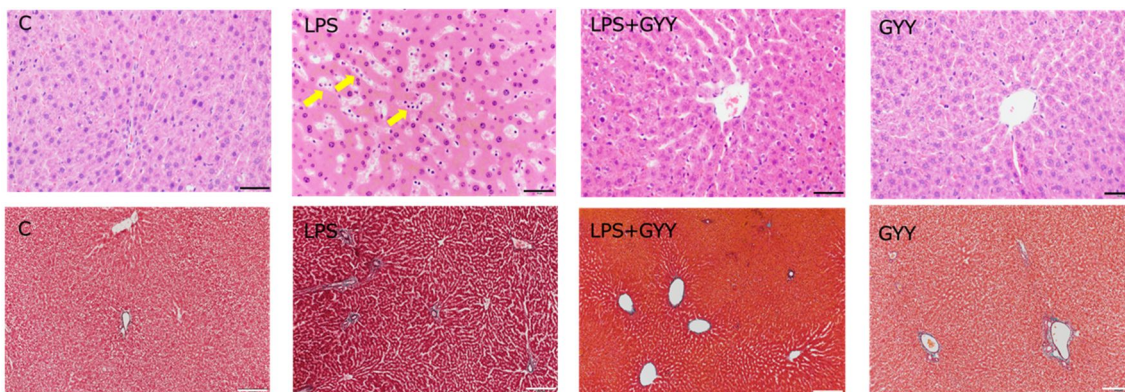
3. 研究の方法

8週齢のSD系雄性ラットに LPS15 mg/kg を腹腔内投与し敗血症モデル動物を作製、硫化水素処理群には GYY4137(徐放型硫化水素ドナー)50 mg/kg を腹腔内投与した。また、ラット初代培養肝細胞を用いて同様の実験を行った。回収したサンプルを用いてタンパク発現変化を比較検討したのち TOF 型質量分析計による同定を行い、生化学的・分子生物学的・組織学的手法を用いて解析を行った。

4. 研究成果

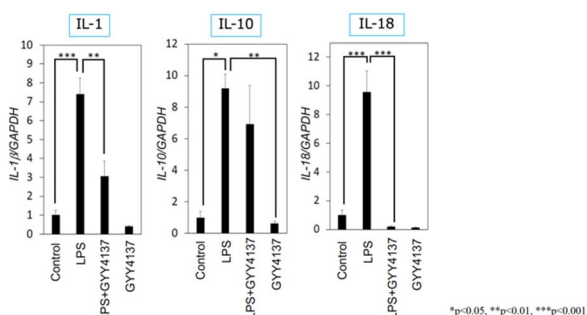
(1) 組織学的評価

LPS 群でのうっ血・類洞の拡張・炎症細胞浸潤などが GYY で改善傾向であった。



(2) RT-PCR によるサイトカインの評価

GYY 投与により、LPS 群での IL-1 と IL-18 (炎症性サイトカイン) の上昇が抑制された。

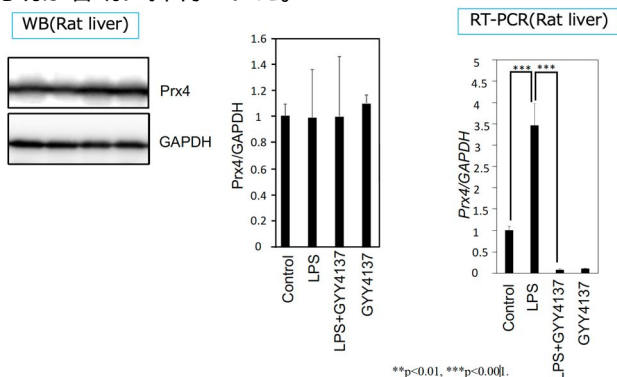


Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Rat-IL-1β	ATTGCCTGTGGACAGGATGC	CCACACACAATTCGGGCAAG
Rat-IL-10	AATAAAAGCAAGGCAGTGGAGC	ATTCATGGCTGTAGACACCT
Rat-IL-18	AACCGCAGTAATACGGAGCAT	ICTGGTCTGGGATTCGTTGG
Rat-Pdx4	CTGAATGACCTTCTGTGGGT	CACTACCAGGTTCCAGCCA
Rat-GAPDH	GGCTCTCTGCTCTCCCTGTCTA	TGCCGTGAACCTGCCGTGGG

プライマー

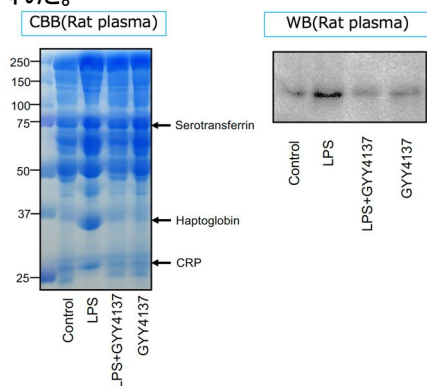
(3) ラット肝臓の Prx4 のタンパクおよび遺伝子発現変動

肝臓中での Prx4 タンパク量は各群変動はなかったが、遺伝子発現は LPS 群で増加し、GYE 投与で発現が著明に抑制された。



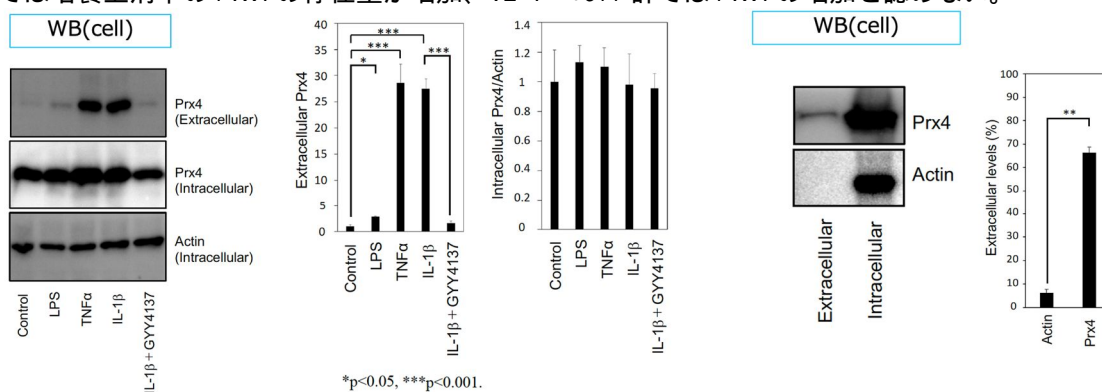
(4) ラット血清中の Prx4 の変動

ラット血清の MALDI-TOF-MS 解析の結果から LPS 群での各種炎症反応上昇が GYE 投与により抑制されることが示唆。また、ラット血清中の Prx4 タンパク量は増加し、GYE 投与でキャンセルされた。



(5) ラット初代培養肝細胞での Prx4 分泌量の評価

細胞内における Prx4 の存在量は各群殆ど変動はないが、サイトカイン群 (TNF 群・IL-1 群) では培養上清中の Prx4 の存在量が増加、IL-1 +GYE 群では Prx4 の増加を認めない。



(まとめ)

- ◆ LPS 投与により炎症性サイトカインが上昇、GYE 投与によりその上昇がキャンセルされたことから、硫化水素には LPS による炎症を抑制する働きがあることが示唆。
- ◆ Prx4 のタンパク量は殆ど変動しないが、遺伝子発現量は有意に増加していたことから、Prx4 は LPS 群での分解または分泌促進が示唆。
- ◆ TNF 群と IL-1 群で培養上清中の Prx4 存在量が著明に増加していたことから、主にサイトカイン刺激によって Prx4 が分泌されることが示唆。
- ◆ GYE 投与により IL-1 による Prx4 の分泌が抑制されたことから、硫化水素による敗血症性肝障害への保護作用は直接 LPS に作用するのではなく、LPS により産生・放出された炎症性サイトカインに対して働くことが示唆。

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 0件）

1. 著者名 Unuma Kana, Aki Toshihiko, Yamashita Ayaka, Yoshikawa Ayaka, Uemura Koichi	4. 巻 44
2. 論文標題 Hydrogen sulfide donor NaHS causes bronchitis with enhanced respiratory secretion in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 107 ~ 112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.44.107	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Unuma Kana, Yoshikawa Ayaka, Aki Toshihiko, Uemura Koichi	4. 巻 32
2. 論文標題 Increased circulating peroxiredoxin-4 in sepsis model rats involves secretion from hepatocytes and is mitigated by GYY4137	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Toxicologic Pathology	6. 最初と最後の頁 305 ~ 310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1293/tox.2019-0030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鷗沼香奈、秋利彦、吉川綾香、上村公一
2. 発表標題 敗血症性肝障害に対する硫化水素の影響
3. 学会等名 第103回法医学会全国集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鷗沼香奈、秋利彦、吉川綾香、上村公一
2. 発表標題 敗血症性肝障害に対する硫化水素の影響
3. 学会等名 第103回法医学会全国集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京医科歯科大学法医学分野研究
https://www.tmd.ac.jp/med/legm/houi_kenkyuu.html
東京医科歯科大学 法医学分野 研究業績
http://www.tmd.ac.jp/med/legm/houi_gyouseki.html

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