

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592673

研究課題名(和文) 抗酸化能に着目した肺線維症に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Effects of Newly synthesized antioxidant DHLH₂Zn on Bleomycin induced pulmonary fibrosis

研究代表者

野口 隆之 (Noguchi, Takayuki)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：90156183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：ラットでのブレオマイシン投与による急性肺線維症モデルを作成し、非ステロイド骨格化合物である新規合成の α -リポ酸誘導体の亜鉛キレート化合物であるSodium Zinc Histidine Dithiooctanamide (DHL-HisZn)の肺線維症に対するに効果を検討した。安静時動脈血液ガス分析、肺組織のHE染色所見、肺障害の程度を見るアッシュスコア並びにAZAN染色による肺組織の線維化の程度を比較し、DHL-HisZn投与がブレオマイシンにより誘発される肺傷害、肺の線維化を軽減することを示すことができた。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the reduction in acute pulmonary fibrosis after Sodium Zinc Histidine Dithiooctanamide (DHL-HisZn) which was the zinc chelate of the α -lipoic acid derivative of the de novo synthesis, to inhibit oxidative stress induced by bleomycin in a rat model. After the administration of bleomycin, the animals were sacrificed and lung and serum samples were harvested and evaluated. This study results indicate that treatment with DHL-HisZn can alleviate pulmonary fibrosis in a model of bleomycin.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細目：外科系臨床医学、麻酔・蘇生

キーワード：肺線維症 ブレオマイシン 抗酸化作用 α -リポ酸誘導体

1. 研究開始当初の背景

急性期における呼吸不全に対しては、現在様々なデバイスや薬剤が開発され、治療に難渋しながらも救命できるケースが増加しつつある。しかし、急性期を乗り切った後、重度の肺線維症を合併することにより肺機能が悪化し、結果として命を落とす症例がある。このような症例に対して、現在の医療で有効性の高い治療法が皆無の状態である。

このような、晩期の肺線維症に対して、フリーラジカルの過剰産生が関与している可能性が最近の研究より報告されつつある。フリーラジカルは、通常直ちに消去系により除去されるが、何らかの理由によりこの消去系がうまく働かないと体内にフリーラジカルが蓄積し、結果既に損傷した組織をさらに障害することになる。

他方、このフリーラジカルを消去することで、治療に結びつける研究が進みつつある。例えば、抗酸化物質を投与することによりフリーラジカルの除去を促進させることで、炎症を抑制する可能性が指摘されている。また、当研究室におけるこれまでの研究結果では、活性酸素種による酸化ストレスが病態成立に関わる種々の疾患に対して、我々の開発した抗酸化作用を有するビタミン E 誘導体やアルファリポ酸誘導体が有効であることを示してきた。このような事実より、我々はより強力な抗酸化剤の投与により肺線維症のような慢性炎症性病変の治療が可能ではないかとの発想に至った。そこで、我々はリポ酸誘導体の新規化合物であるヒスチジンチオオクタナミド Na/亜鉛 (DHL-HisZn) に注目した。リポ酸はビタミン C やビタミン E の約 400 倍の強力な抗酸化力をもち、体内のフリーラジカルを中和する働きを有している。そして、リポ酸の安定化とリポ酸の効果をより強めるために、リポ酸にヒスチジンを付け、更に亜鉛で還元させて活性化させキレート化したものが DHL-HisZn である。この DHL-HisZn であれば肺線維症に対する治療効果を有する可能性があるのではないかと考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

肺線維症は活性酸素種による酸化ストレスがその発症メカニズムに強く関与していることから、新規に合成されたリポ酸誘導体の亜鉛キレート化合物である Sodium Zinc Histidine Dithiooctanamide (DHL-HisZn) と Sodium Zinc Taurine Dithiooctanamide (DHL-TauZn) が、フリーラジカルや活性酸素種を強力に抑制し、結果として肺線維症を抑制できるか否かについて検討を行う。更に、これらの新規化合物が副作用を起こさずに投与できるか否かについて検討を行う。

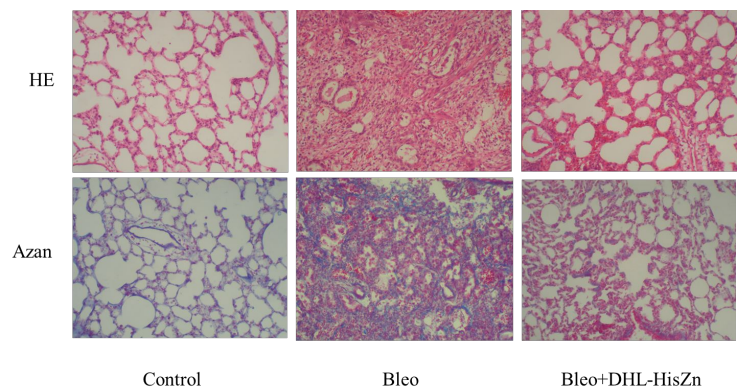
3. 研究の方法

Wistar 系雄性ラット(体重 250-300g)を用いて、プレオマイシン誘発肺線維症モデルを作成した。ラットは無作為に以下の 3 各群に分けた。a) コントロール群・・・全身麻酔下に生理食塩水のみを投与、b) プレオマイシン

	Control	Bleo+Saline	Bleo+DHL-HisZn
Pre体重	284.3±22.9	243.1±28.1	243±21.6
2週間後体重	313.7±36.4	224.5±27.7	290.5±9.6
PH	7.546±0.05	7.465±0.09	7.481±0.07
PCO2	33.8±3.0	46.6±11.5	38±5.6
PO2	107.6±14.32	51±21.5	85.1±17.7
BE	7±1.6	8.6±3.4	4.5±4.1
HCO3	29.2±2.1	32.3±3.3	28.4±3.8
sO2	98.6±0.5	82.9±11.3	95±4.8

投与群・・・プレオマイシンのみの投与、c) DHL-HisZn 投与 + プレオマイシン群・・・プレオマイシンを投与後、DHL-HisZn を投与。プレオマイシンは単回気管内投与で 10U/kg、DHL-HisZn は 10 mg/kg、2 回/日皮下投与を行った。

モデル作成 2 週間後、体重測定を施行。そして、全身麻酔下に気管内挿管を行った後に動脈採血を行い、血液ガス分析を施行した。更に、肺組織の傷害を評価するために、HE 染



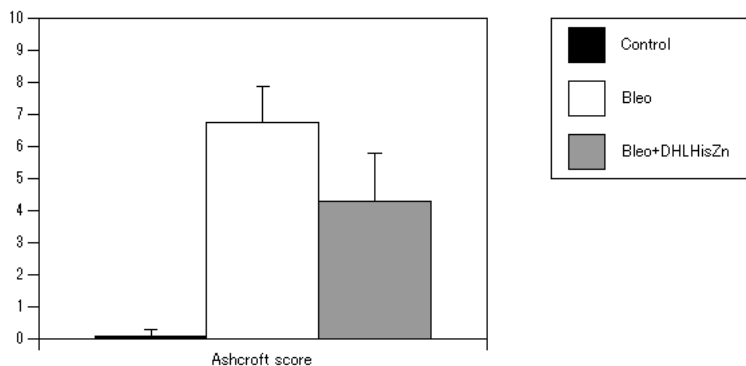
色所見、アッシュオフスコアの測定、AZAN 染色による肺組織の線維化の程度を比較した。また、肺組織中の線維タンパクを定量するために、コラーゲンの構成成分であるとヒドロキシプロリンを測定した。DHL-HisZn の作用メカニズムを探るために、肺組織中の酸化ストレスのマーカーとして MDA の測定を行った。

3. 結果

以下に、今回の研究により得た結果を順次示す。

1. 体重および血液ガスの変化について上

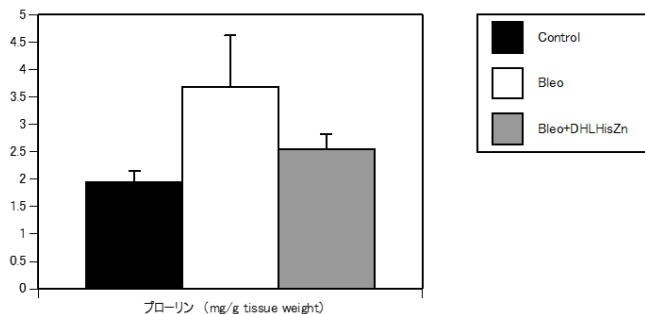
上記表に示す通り、プレオマイシン投与群では 2 週間後の時点において、血中酸素量の著大な減少を認めたが、



DHL-HisZn を投与することにより、この酸素化の低下を抑制できた。このことは、DHL-HisZn の投与がブレオマイシンによって生じる肺機能の低下を防止できたことによると考えられた。

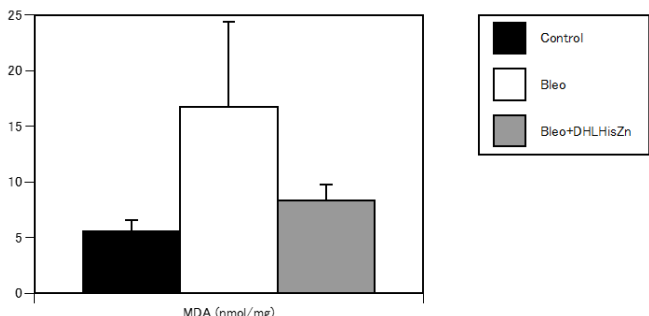
2. HE 染色肺組織と AZAN 染色肺組織所見

右より、コントロール群、ブレオマイシン投与群、DHL-HisZn 投与 + ブレオ



マイシン群を示す。ブレオマイシン投与により、AZAN 染色にて青色に染色される線維組織の増加を認めたが、DHL-HisZn 投与により、この線維組織の増加を抑制することが示された。この変化は、HE 染色においても同様の傾向を確認することが出来た。

3. アッシュオフスコア

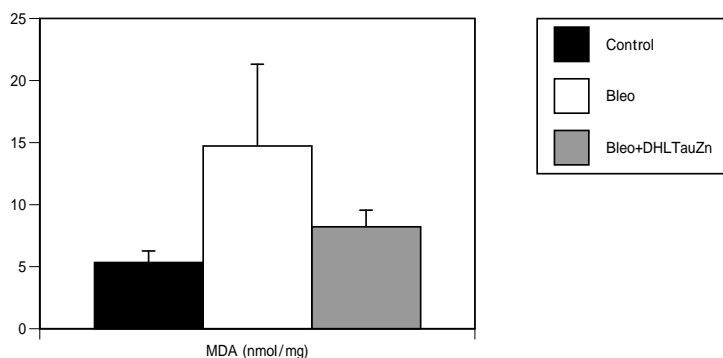


組織所見を元に、肺の線維化の程度を数値化したアッシュオフスコアを示す。肺の染色結果同様に、ブレオマイシン群では、コントロール群に比べ上昇するのを、DHL-HisZn 投与により抑制することが出来た。

4. プローリンの変化

肺組織中のプローリン量について示す。コントロール群に比較して、ブレオマイシン群では、肺の線維化により、上昇する。しかしながら、DHL-HisZn 投与により抑制することが出来た。このことは、DHL-HisZn 投与により、肺の線維化を抑制できることを示していると考えられる。

5. MDA の変化



肺組織中の酸化ストレスを定量化するために、組織中 MDA 量の測定を行った。ブレオマイシン投与により、コントロール群に比較して、3 倍程度の上昇を認めた。しかし、DHL-HisZn 投与でほぼコントロール群と同じ程度まで、抑制することが示された。これらのことから、DHL-HisZn 投与はブレオマイシンにより誘発される肺傷害にて重要な悪化因子である酸化ストレスを有効的に除去することで、線維化の進行を抑制していることが示されたと考えられた。

次に、DHL-HisZn 投与時のモデルをもし、DHL-TauZn 投与による肺線維症の抑制効果を検討する実験を行った。

現在までに、DHL-TauZn 投与の効果を見るために、肺組織中の酸化ストレス量を MDA にて測定した。

上記の結果が示す通り、ブレオマイシン投与により、コントロール群に比較して、3 倍程度の上昇を認めた。しかし、DHL-TauZn 投与でほぼコントロール群と同じ程度まで、抑制することが示された。この結果は、DHL-HisZn 投与による結果とほぼ同じであり、DHL-TauZn 投与は DHL-HisZn 投与と同様の結果を示す可能性が示されたと考えている。現在、更なる検討を行うべく、組織の染色等のデータ解析の準備を行っている。

これらの結果より、今回我々の着目した新

新規 -リポ酸誘導体の垂鉛キレート化合物である DHL-HisZn と DHL-TauZn には、肺線維症を酸化ストレス抑制を介して防止できる可能性が示された。

最後に、新規 -リポ酸誘導体に毒性がないかについて検討を行った。セボフルレン吸入全身麻酔下に前述の薬剤を 1 日 2 回 7 日間連日皮下に投与し、臓器障害が生じるかについて検討を行った。新規 -リポ酸誘導体を 10mg/Kg 投与した時、腎障害をはじめとした臓器障害を生じることなく安全に使用できることを示した。このことは、今回用いた新規 -リポ酸誘導体は副作用がなく、安全に使用できる薬剤である事を示した。

以上のことから、今回の研究において、新規合成 リポ酸誘導体 DHL-HisZn と DHL-TauZn には肺線維症抑制があり、かつ目立った有害事象がないことから、新規の鎮痛剤として開発できる可能性が示唆されたと考えられた。しかし、今回の研究では、同時投与でのデータであり、今後、肺傷害を生じた時点からの投与での有効性等を示すなど更なる研究が必要であり、現在、これらの研究の準備を始めており、これらのデータがそろえば、肺線維症に対する新規の治療法開発につながるかもしれない。

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)

野口隆之、リポ酸誘導体およびビタミンE誘導体の可能性、第2回 癌・炎症とリポ酸研究会、2011年11月12日、ホテル白菊(大分)

藤田和也、新規 リポ酸誘導体 DHL-HisZn を用いたブレオマイシン誘発肺線維症モデルでの治療効果の検討、公益社団法人日本麻酔科学会九州麻酔科学会 第49回大会、2011年9月17日、JA・AZM ホール(宮崎)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：肺線維化疾患の予防または治療薬

発明者：野口隆之

権利者：大分大学

種類：

番号：2010036642

出願年月日：

国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口隆之 (Noguchi Takayuki)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：90156183

(2) 研究分担者

日下淳也 (Kusaka Junya)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：40305058