

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23792078

研究課題名(和文) 下肢虚血再還流障害の病態解析～新たな治療法開発を目指して～

研究課題名(英文) Pathophysiological study of lower limb ischemia-reperfusion injury for development new drug therapy

研究代表者

加藤 菜穂 (Naho, Kato)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：20457766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：挫滅症候群の動物モデル・両後肢緊縛/再還流マウスを用い、シベレスタット(Siv)又はエダラボン(Ed)投与による遠隔臓器障害の変化を検討した。臓器遺伝子発現変化は腎でのSivによるTNF- $\alpha$ の減少とEdによるiNOS減少抑制が顕著で、IL-6は有意な変化を示さなかった。IL-6KO及びiNOSKOマウスを用いた生存分析、血中サイトカイン濃度、血液酸化ストレス度・抗酸化力測定と合わせると、虚血再還流障害軽減因子としてIL-6発現誘導促進、NO合成能力安定化、血中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$ 及びbの低下が浮上した。一方交配によりIL-6/iNOS DKOマウス作成を試みたが、研究期間内に誕生しなかった。

研究成果の概要(英文)：The mouse bilateral hind limb tourniquet-reperfusion model can be considered as an experimental animal model of crush syndrome. By using this model, we investigated mRNA expression levels of various inflammatory cytokines in the lung, liver and kidney. We were administered sivelestat (Siv), edaravone (Ed) or saline intraperitoneally into mice, at the various timings. In the result, we found that the TNF- $\alpha$  was reduced by Siv administration, and the suppression of iNOS was reduced by Ed administration in kidney. IL-6 expression level was remained static by any drugs. Summed up that the results of survival assay in IL-6 KO and iNOS KO mice, blood concentration of inflammatory cytokines, oxidative stress and antioxidative potency, it was emerged the factors of reduce I/R injury that induction of IL-6 expression, stability of NO synthesis ability, decreased blood levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . We tried cross IL-6 and iNOS double KO mice, but drought in birth within a time frame.

研究分野：医歯薬学

キーワード：虚血再還流障害 挫滅症候群 IL-6ノックアウトマウス iNOSノックアウトマウス シベレスタット エダラボン

1. 研究開始当初の背景

大地震被災者は、長時間にわたる四肢の圧迫により、救助後挫滅症候群を発症して死亡することが少なくない。挫滅症候群の主な病態は、筋組織の破壊・虚血とそれに引き続く再還流により、ミオグロビンやカリウム等の血中濃度が上昇して腎不全ほか多臓器不全を起こすことであるが、病態増悪因子として炎症性サイトカインや酸化ストレスの影響は無視できないと考えられている。

挫滅症候群の動物実験モデルである両後肢緊縛/再還流マウスを用いて遠隔障害臓器の一つである腎における炎症性サイトカイン類の遺伝子発現を検討したところ、IL-6 発現誘導と iNOS 発現抑制が観察された。これに C57BL/6J 野生型マウスとその IL-6 ノックアウト (KO) マウス、iNOSKO マウスを用いて作成した緊縛再還流後の生存曲線を合わせると、IL-6 の保護的作用と iNOS の増悪的作用が示唆された (2008~2010 年若手研究 B, 課題番号 20790464)。

種々の方法で IL-6 及び/または iNOS 発現状況を変化させることで、遠隔臓器障害を軽減させ、あるいは生存率を増加させることができれば、挫滅症候群ならびに種々の虚血/再還流障害に対する治療法の選択肢が広がると考えられる。

2. 研究の目的

両後肢緊縛/再還流マウスに IL-6 及び/または iNOS 発現状況を変化させようと考えられる薬物を投与して病態解析することで、挫滅症候群を含めた虚血/再還流障害の治療法の端緒をつかむことを目的とする。

3. 研究の方法

マウス両後肢緊縛/再還流モデル：C57BL/6J 野生型 (WT) マウス、同 IL-6 KO マウス及び iNOS KO マウス (11~14 週齢、雄性) を用い、2011~12 年度はペントバルビタール (PB)、2013~14 年度はメドミジン・ミダゾラム・ブトルファノール混合液 (Mix) 腹腔内投与による麻酔下に、両肩径部を輪ゴムで緊縛した。結果の項には、特に説明のない場合は混合液麻酔による実験結果を記す。

検討する薬物として、シベレスタット (以後 Siv) 及びエダラポン (以後 Ed) を選定した。Siv は好中球エラスターゼ阻害剤であり、全身性炎症反応症候群 (SIRS) における肺障害に対する治療薬として臨床使用されている。Ed はフリーラジカルスカベンジャーであり、急性虚血性脳血管障害における神経学的症状緩和目的に臨床使用されている。いずれの薬物も、他臓器の虚血再還流障害への保護作用があるとの研究報告は散見されるが、下肢虚血再還流障害における遠隔臓器障害に対する影響に関する報告はない。

緊縛時間は 1.5 時間、2 時間または 3 時間を設定、緊縛 30 分前・再還流 30 または 10

分前・再還流 30 分後のいずれかの時刻に、Siv 30mg/kg または Ed 3mg/kg を腹腔内投与した。一部マウスでは Siv を 15mg/kg ずつ再還流前後に分割投与した。同タイミングで生理食塩水 (NS) 10mL/kg 腹腔内投与したマウスをそれぞれの対照とした。両後肢緊縛/再還流後の生存率分析 (1) のほか、WT マウスについては、緊縛したまま、または緊縛解除 3 時間後に検体採取 (2) して各種分析 (3~5) を行った。

(1) 生存率分析：マウス両後肢緊縛/再還流後 48 時間以内の生存状況を、赤外線カメラを用いて記録・観察した (各群 n=5~7 匹)。

(2) 検体採取：深麻酔下に心臓採血後、肺・肝・腎を摘出した。心臓血からは血漿を分離し (3)(4) に、臓器は (5) に使用した (各群 n=3~7 匹)。

(3) ELISA による血中サイトカイン類の定量：(2) で採取した血漿を検体に ELISA によるサイトカイン類の血中濃度を測定した。測定には、Siv 投与群及びその対照群では Mouse Cytokine ELISA Strip 1 for Profiling 8 Cytokines または Mouse Inflammation ELISA Strip 1 for Profiling 8 Cytokines を、Ed 投与群及びその対照群では Mouse Oxidative Stress ELISA Strip 1 for Profiling 8 Cytokines (いずれも Signosis) を用いた。それぞれの測定項目を表に示す。

ELISA キット	測定項目
Cytokine	Leptin, TNF- $\alpha$ , IGF-1, IL-6, VEGF, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , G-CSF
Inflammation	IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , G-CSF, GM-CSF, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , SCF, Rantes
Oxidative Stress	TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , MCP-1, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12

(4) 血液酸化度・抗酸化力測定：(2) で採取した血漿を検体に、フリーラジカル解析装置 FREE carpe diem (DIACRON International) を用いて、d-ROMs (Reactive Oxygen Metabolites: 酸化度) 及び BAP (Biological Anti-oxidant Potential: 抗酸化力) を測定した。

(5) リアルタイム PCR による臓器遺伝子発現解析：(2) で採取した臓器のうち、肺は全量、肝は内側右葉の中央約 2mm 厚、腎は右腎を検体とし、ホモジネートから TROZOL 法で RNA を抽出、逆転写して合成した cDNA を検体に、StepOne Realtime PCR System (Applied Biosystems) を用いて以下の項目を分析した (実験条件により項目は異なるが、共通のものには明記)。

IL-6 (Mm000446190\_ml): 共通  
 iNOS (Mm00440502\_ml): 共通  
 TNF- $\alpha$  (Mm00443258\_ml): 共通  
 G-CSF (Mm00438335\_gl)  
 GM-CSF (Mm00438328\_ml)  
 Leptin receptor (Mm01265583\_ml)  
 IGF-1 (Mm00439559\_ml)  
 VEGF (Mm00437306\_ml)  
 NF $\kappa$ B (Mm00476361\_ml)  
 IL-1 $\beta$  (Mm01336189\_ml)  
 IL-10 (Mm00439614\_ml)  
 IL-12 $\alpha$  (Mm00434165\_ml)  
 IL-12 $\beta$  (Mm00434174\_ml)  
 CXCR1 (Mm00731329\_sl)  
 CXCR2 (Mm00438258\_ml)

いずれも、ハウスキーピング遺伝子である  $\beta$ -acton (Mm00607939\_sl) の発現量で除した値を比較した。

(6) IL-6/iNOS ダブルロックアウト(DKO) マウス作成: 継代飼育している IL-6KO と iNOS KO マウスを交配したところ, 第1世代計51匹の遺伝子型は全て IL-6 $^{+/-}$ ·iNOS $^{+/-}$ であった。これらを交配して IL-6/iNOS DKO マウスの作成を試みた。

#### 4. 研究成果

統計処理には, 生存率分析に対しては  $\chi^2$  検定を, その他の項目には Mann-Whitney 検定を用い,  $p < 0.05$  で有意差ありと判断した。

(1) 生存率分析 (一部未施行の条件あり) 薬物名の後の括弧内の数字は使用動物数 n を示す。NS 投与に対して有意差のあるものを赤字で表記した。

##### 緊縛 1.5 時間・緊縛前薬物投与

	薬物	24 時間	48 時間
WT	Siv (5)	100%	100%
	Ed (6)	83%	83%
	NS (6)	100%	100%
IL-6KO	Siv (5)	80%	60%
	Ed (5)	100%	100%
	NS (6)	83%	83%
iNOSKO	Siv (7)	100%	100%
	Ed (6)	100%	100%
	NS (6)	100%	100%

##### 緊縛 2 時間・緊縛前薬物投与

	薬物	24 時間	48 時間
WT	Siv (5)	80%	<b>0%</b>
	Ed (6)	100%	83%
	NS (6)	83%	83%
IL-6KO	Siv (5)	60%	40%
	Ed (5)	0%	0%
iNOSKO	Siv (6)	67%	<b>33%</b>
	Ed (5)	80%	80%
	NS (5)	100%	100%

##### 緊縛 3 時間・緊縛前薬物投与

	薬物	24 時間	48 時間
WT	NS (6)	0%	0%
IL-6KO	NS (6)	17%	0%
iNOSKO	Ed (6)	0%	0%
	NS (6)	0%	0%

##### 緊縛 1.5 時間, 再還流後薬物投与

	薬物	24 時間	48 時間
WT	Siv (5)	40%	40%
iNOSKO	Ed (6)	100%	100%
	NS (6)	100%	100%

##### 緊縛 3 時間, 再還流後薬物投与

	薬物	24 時間	48 時間
WT	Siv (6)	0%	0%
	Ed (5)	0%	0%
	NS (6)	0%	0%
IL-6KO	Siv (6)	68%	17%
	Ed (6)	0%	0%
iNOSKO	NS (6)	17%	0%
	Siv (7)	57%	43%
	NS (6)	0%	0%

Siv 投与は WT 及び iNOSKO マウスでは生存率を有意に低下させた。また, IL-6KO マウスの生存率は, 多くの条件で WT 及び iNOSKO マウスより低かった。IL-6 分泌抑制は, 虚血再還流障害を増強する重大な因子の一つと考えられ, IL-6 分泌促進が病態改善につながる可能性がある。

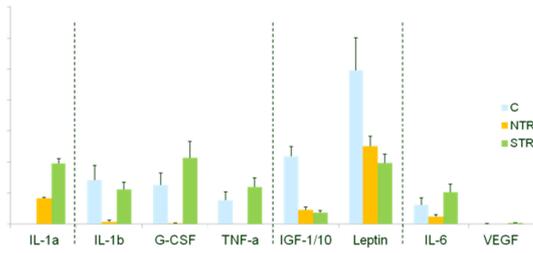
Ed 投与は WT 及び iNOSKO マウスでは, NS と比較して有意差を認めなかった。一方 IL-6KO マウスでは, Ed 投与により生存率が一段と低下しており, IL-6 分泌のない状況での酸化ストレス抑制が虚血再還流障害を増悪させた可能性が示唆される。

WT マウスでは, 有意な変化ではないものの, Ed 投与により生存率が軽度低下した。Ed は腎排泄性であり脱水や腎機能障害による有害事象が報告されている。今回の投与量は, 先行研究により虚血再還流障害を受けた骨格筋に対して保護作用を有するとされるものを参考に決定したが (Hori K et al, BMC Musculoskeletal Disorders 2013, 14: 113), 遠隔臓器, 中でも腎に対しては悪影響を及ぼす可能性があり, 適正な投与量の検討が必要である。

iNOSKO マウスでは, Siv, Ed, NS のいずれの投与においても, 緊縛 1.5 時間による死亡がないことから, 虚血再還流障害において IL-6 の有無より iNOS の有無, 即ち NO 合成能力の多寡の方が重要であると考えられる。

##### (2) ELISA による血中サイトカイン濃度

PB 麻酔・両後肢 3 時間緊縛・緊縛解除 10 分前 Siv 投与群において, 再還流後に IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , G-CSF, TNF- $\alpha$  が有意に増加した。



【縦軸 1 目盛は 10mg/mL】

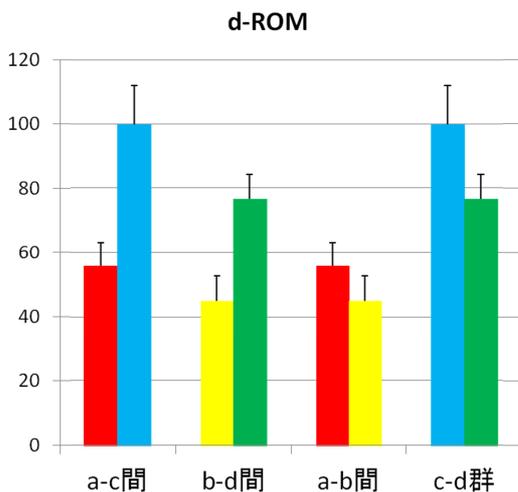
PB 麻酔・両後肢 1.5 時間緊縛・解除 30 分後 Siv 投与群において，“Information” 全項目の有意な変化は認めなかった。

Mix 麻酔・両後肢 2 時間緊縛・緊縛 30 分前 Ed 投与群において，TNF- $\alpha$  及び IL-12 は緊縛により有意に低下，IL-12 は再還流により有意に増加した。

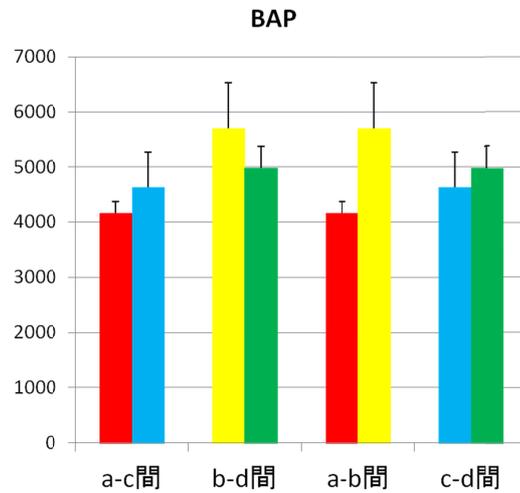
Siv 及び Ed の投与により，IL-6 血中濃度の著明な変化は認められなかった一方，Siv 投与により TNF- $\alpha$ ，IL-1 $\alpha$  及び  $\beta$  血中濃度は再還流後に増加，Ed 投与により TNF- $\alpha$  血中濃度は緊縛後に低下し，IL-1 $\alpha$  及び  $\beta$  血中濃度は変化しなかった。緊縛条件や薬物投与タイミングが異なるため一概には言えないが，緊縛 2 時間・緊縛前薬物投与の各群の生存率を比較した結果と考え合わせると，血中 TNF- $\alpha$ ，IL-1 $\alpha$  及び  $\beta$  の低下または上昇抑制は，虚血再還流障害軽減に寄与する可能性があると考えられる。

### (3) 血液酸化力・抗酸化度

Mix 麻酔・両後肢 1.5 時間緊縛・緊縛 30 分前または再還流 30 分前 Ed 投与群において，NS 群に対し d-ROMs 値は有意に低かったが，BAP 値は同等であった。



【a ( ) は緊縛前 Ed 投与，b ( ) は再還流前 Ed 投与，c ( ) は緊縛前 NS 投与，d ( ) は再還流前 NS 投与。】

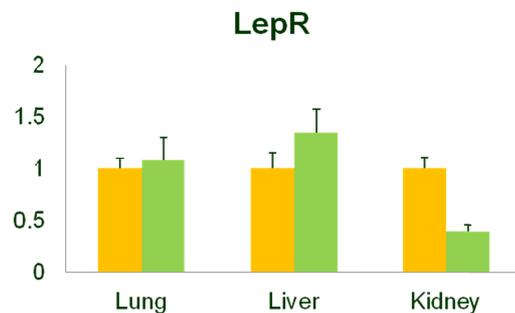


Mix 麻酔・両後肢 2 時間緊縛・緊縛 30 分前 Ed 投与群において，d-ROMs 値に有意な変化はなく，BAP 値は再還流後に増加した。また，NS 投与群において，d-ROMs 値は再還流で有意に低下し，BAP 値に有意な変化はなかった。

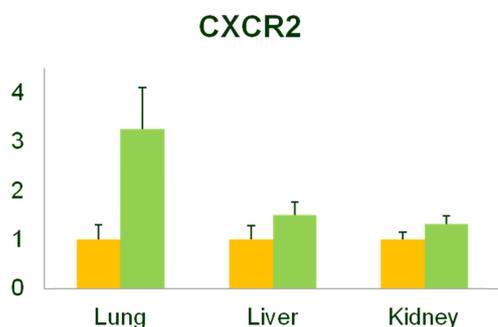
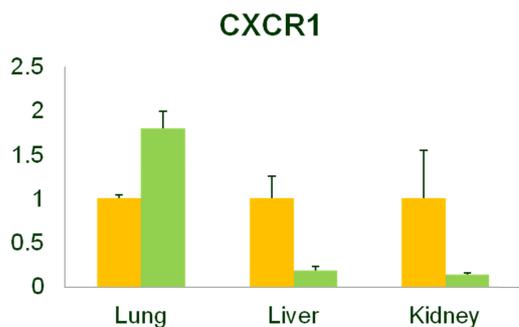
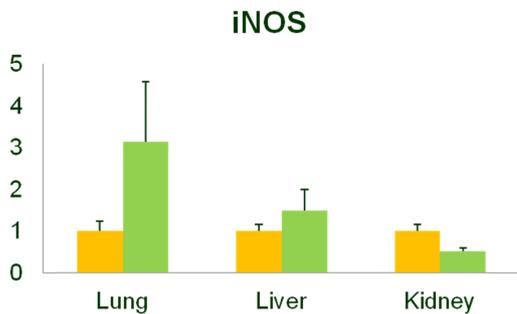
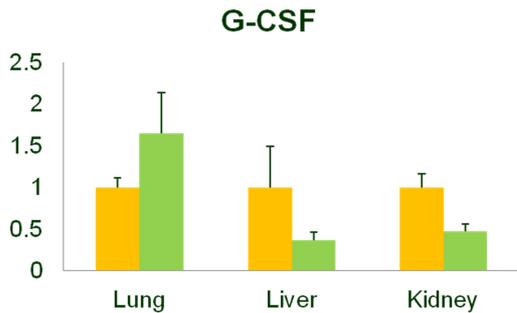
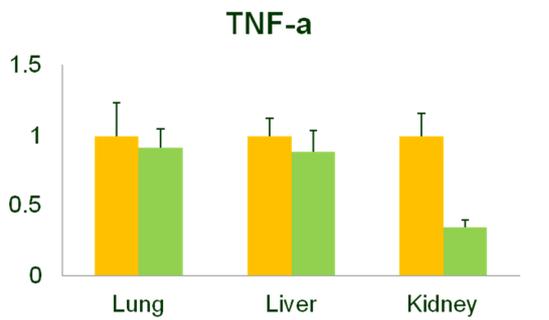
Ed はフリーラジカルスカベンジャーであり，投与から数時間にわたり酸化ストレス軽減するほか，酸化ストレスの変動を抑制する結果抗酸化力を高める可能性が示唆された。

### (4) リアルタイム PCR による臓器遺伝子発現解析

PB 麻酔・両後肢 3 時間緊縛・緊縛解除 10 分前 Siv 投与群において，再還流後の肺及び肝では LepR，TNF- $\alpha$ ，G-CSF 及び iNOS 発現に NS 群との差を認めなかったが，腎ではいずれも有意に低下した。CXCR1 は肺で 2 倍，肝で 1/5，腎で 1/6 でありいずれも有意な変化であったが，CXCR2 には差を認めなかった。



【 ( ) は NS 投与群， ( ) は Siv 投与群】



PB 麻酔・両後肢 1.5 時間緊縛・解除 10 分前 Siv 投与群において、肝の IL-6 は緊縛で有意に低下し、再還流で差を認めなかった。NS

投与群において腎の iNOS は再還流で有意に低下し、Siv 群では低下したが有意な変化ではなかった。NFκB は、Siv 群の緊縛・再還流において有意な変化を示さなかった。

PB 麻酔・両後肢 1.5 時間緊縛・解除 30 分後 Siv 投与群において、肺の GM-CSF は再還流後に有意に低下した。IL-6 及び iNOS は Siv 投与による有意な変化を示さなかった。

Mix 麻酔・両後肢 1.5 時間緊縛・緊縛 30 分前または再還流 30 分前 Ed 投与群において、肺・肝・腎ともに IL-6 及び iNOS の有意な変化は示さなかった。但し腎において、緊縛前投与群は再還流前投与群に対し、IL-6 が有意に高く、iNOS が有意に低かった。

Mix 麻酔・両後肢 2 時間緊縛・緊縛 30 分前 Ed 投与群において、再還流後の肺の iNOS、肝及び腎の IL-12α、肝の IL-12β は有意に高かった。IL-6 は肺及び腎において、Ed・NS 投与ともに再還流で有意に増加、iNOS は肺及び腎において、NS 投与群で再還流後に低下、IL-12β は腎において NS 投与群で再還流後に低下した。TNF-α には著明な変化は認めなかった。

Siv 投与・Ed 投与ともに、炎症性サイトカイン類の変動は、腎次いで肺に多く観察された。

多くの条件で共通して検討した項目のうち、IL-6 は Siv 及び Ed 投与による有意な変化は示さず、TNF-α 発現は Siv 投与により腎で減少、iNOS は Ed 投与により腎における減少が抑制された。

過去の研究結果から、後肢緊縛再還流後の腎においては IL-6 発現の増加と iNOS 発現の減少を抑制することを課題としてきたが、Ed 投与によって iNOS の変動は抑制できる可能性が示唆された。

一方で、生存率分析からは Ed による腎障害悪化の恐れが示唆されるため、より低容量での効果を検討する必要があると考えられる。

他方、TNF-α をはじめとして多くのサイトカイン類が病態形成に複雑に関与していることが改めて浮き彫りとなり、広く炎症を抑制するために複数の手段を組み合わせた検討も考慮するべきである。

(6) 交配による IL-6/iNOS DKO マウス作成：IL-6<sup>+/-</sup>・iNOS<sup>+/-</sup> マウス同士を交配して得られた第 2 世代以降のマウス計 639 匹について、順次 genotyping を行ったところ、次の結果であり、2015 年 3 月末までに IL-6/iNOS DKO マウスは確認されなかった。

IL-6<sup>+/+</sup>・iNOS<sup>+/+</sup> : 29 匹 (4.5%)  
 IL-6<sup>+/+</sup>・iNOS<sup>+/-</sup> : 27 匹 (4.2%)  
 IL-6<sup>+/+</sup>・iNOS<sup>-/-</sup> : 0 匹 (0%)  
 IL-6<sup>+/-</sup>・iNOS<sup>+/+</sup> : 158 匹 (24.7%)  
 IL-6<sup>+/-</sup>・iNOS<sup>+/-</sup> : 389 匹 (60.9%)  
 IL-6<sup>+/-</sup>・iNOS<sup>-/-</sup> : 24 匹 (3.8%)

IL-6<sup>-/-</sup>・iNOS<sup>+/+</sup> : 7 匹 (1.1%)

IL-6<sup>-/-</sup>・iNOS<sup>+/-</sup> : 5 匹 (0.8%)

IL-6<sup>-/-</sup>・iNOS<sup>-/-</sup> : 0 匹 (0%)

出産直後に死亡したマウスの genotyping は行わなかったが, IL-6/iNOS DKO マウスが致死性である可能性が示唆された。

#### 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 1 件)

1. S Mitazaki, M Hashimoto, Y Matsubashi, S Homma, M Suto, N Kato, O Nakagawasai, K Tan-No, K Hiraiwa, M Yoshida, S Abe. Interleukin-6 modulates oxidative stress produced during the development of cisplatin nephrotoxicity. Life Sciences, 92, 694-700, 2013

[学会発表](計 2 件)

1. 加藤菜穂, 西形里絵, 須藤美和子, 水澤郁文, 栗崎恵美子, 平岩幸一. 緊縛性ショックモデルマウスの血中サイトカイン濃度とシベレスタットの効果, 第 96 次日本法医学会学術全国集会, 2012 年 6 月 9 日, 浜松.

2. 加藤菜穂, 西形里絵, 須藤美和子, 林王真美, 水澤郁文, 栗崎恵美子, 黒田直人. 緊縛性ショックにおけるエダラボンの効果について, 第 99 次日本法医学会学術全国集会, 2015 年 6 月 11 日 (発表確定), 高知.

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 菜穂 (KATO NAHO)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 20457766

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし