

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792090

研究課題名(和文) 上行結腸穿孔敗血症モデルにおける転写因子エヌエフカップビーとアラキドン酸の役割

研究課題名(英文) The role of NFkB decoy and arachinoid acid in the CASP model.

研究代表者

虻川 有香子 (Abukawa, Yukako)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：00318148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,300,000円、(間接経費) 390,000円

研究成果の概要(和文)：我々は臨床に即したモデルとしてマウスの上行結腸穿孔ステント敗血症モデル(CASP)を確立した。炎症関連分枝の発現の抑制作用をもつNFkB認識配列を有する二本鎖オリゴヌクレオチド(NFkBデコイ)を治療薬として投与した。16時間前に100µg投与後、術後に200µg投与する群の死亡率は27%から0%に改善され、気管内洗浄液中のロイコトリエン濃度は、4.2ng/mlから1.3ng/mlと有意に減少した。腹腔内投与により腹腔内の炎症が抑えられ、肺への炎症が抑えられた結果と考えられる。臨床的にも腹腔内投与で簡便で著しい侵襲性を要せず、消化管穿孔の手術待機時の敗血症性ショックの予防になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We established the colon ascendens stent puncture model in mice. An NFkB decoy was used for this treatment. The survival rate improved from 73% to 100% in the pre-treatment group. The concentration of leucotoriene in the BALF decreased from 4.2ng/ml to 1.3ng/ml in the pre-treatment group. A significant difference was thus observed between the CASP group and pre-treatment group. We concluded that the inflammation in the abdominal cavity had been suppressed by intra-peritoneal administration of NFkB decoy. Thereafter inflammation of the lungs had been suppressed. It may prevented the onset of sepsis-related shock.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：敗血症 アラキドン酸カスケード NFkBデコイ

### 1. 研究開始当初の背景

敗血症 (Sepsis) は、敗血症ショックや多臓器不全を引き起こす予後不良な疾患である。集中治療進歩や抗菌薬の開発にもかかわらず、先進国における死因の第3位を占めその死亡率は40~50%にもなる。病態の中心は全身の過度な炎症で、細菌による全身性炎症反応症候群 (SIRS) である。我々は、NFkB ならびに炎症の1つの重要なカスケードである「アラキドン酸カスケード」に注目し、関連性を調べることで次世代の周術期管理、集中治療の管理に役立てる。

現在の動物実験敗血症モデルは、グラム陰性菌の細胞壁から遊離されるリポポリサッカロイド (LPS) を外部より投与する非生理的で臨床に即さないものであり、敗血症患者との比較が困難であった。今回用いる上行結腸穿孔スtent敗血症モデルは、より臨床に即したモデルといえる。

アラキドン酸から発生するロイコトリエンやプロスタグランジンは、重要な炎症反応のメディエーターである。LTC<sub>4</sub> は1940年代に発見され、マスト細胞や好酸球の細胞表面に存在する cysLT<sub>1</sub> と cysLT<sub>2</sub> 受容体を刺激する。これらは、肥満細胞、好酸球、内皮細胞に存在している。細胞表面の受容体を刺激することで、内皮細胞への炎症誘発性の刺激やマスト細胞によるケモカインの産生を生じさせる。これらの機序により cysLT は炎症性疾患に関与する。近年、プロスタグランジンはシクロオキシゲナーゼ (COX) の経路だけではなく、cysLT<sub>1</sub> 受容体や LTC<sub>4</sub> によっても生じることが判明した。またこの反応は、炎症反応のシグナルを受けていない時は生じないことから COX-2 によるものであると断定され LPS による刺激も同様の COX-2 の活性化により生ずる。よってこの cysLT<sub>1</sub> 受容体拮抗薬や LTC<sub>4</sub> の拮抗により、COX-2 の活性化が抑制され、上行結腸穿孔スtent敗血症モデルの炎症反応も抑制され、生存率の増加につながると仮説をたてた。

一方、1986年に免疫グロブリンのκL鎖遺伝子のエンハンサー領域に結合する転写因子として同定された NF-κB は炎症の刺激に対する細胞内シグナルとして重要な働きを持つため、この経路を阻害すれば炎症のカスケードを根本から断つ事が出来ると推測する。LPS の実験系では立証されている。我々は炎症のカスケードの根本である NFkB ならびに、炎症の1つの重要なカスケードであるアラキドン酸カスケードに注目し、関連性を調べることで次世代の周術期管理、集中治療の管理に役立てる。

### 2. 研究の目的

より臨床に即した上行結腸穿孔スtent敗血症モデルを使用し、炎症のカスケードの根本である NFkB ならびに重要なアラキドン酸カスケード内の cysLT<sub>1</sub> 受容体、LTC<sub>4</sub> 受容体の関連性を検討した。これらの拮抗が上行結腸穿孔スtent敗血症モデルの炎症反応も抑制、生存率の増加につながるという仮説を立て検討した。

### 3. 研究の方法

(1) 麻酔導入: C57BL6J マウス (8 - 10 週、体重 20 - 25g) を導入後、1週間温度、湿度、光度の規定された飼育室でマウスに異常がないことを確認し実験を開始した。マウスにキシラジン 25mg/kg の麻酔を腹腔内投与し、疼痛反応がないことを確認後 22G カテーテルにて挿管を行う。挿管後、小動物用呼吸器 SAR-830 にて人工呼吸を行い、呼気二酸化炭素モニターを使用し二酸化炭素濃度を測定しながら管理を行った。吸入麻酔のイソフルランを挿管後より手術終了後まで 0.5 ~ 1.5% 投与し、マウスに疼痛のない外科的処置を以下の通り行った。また手術中は直腸温を測定し、保温パットにて体温保持した。(2) 手術手技: 右下腹部に 1cm の切開を入れ腸管を腹腔外に出し、回盲部上 5mm の部位に、5mm にカットした 14G カテーテルを 7/0 エチロンにて腸管に固定した。腸管内容物がカテーテルを通して出てくることを確認後カテーテル付の腸管を腹腔内に戻した。腹壁を 5/0 エチロンにて縫合し手術終了後、吸入麻酔薬を切り抜管後、回復室にて保温、酸素投与をし、回復を待った。手術手技の所要時間は、5分程度でありすべての工程は 20 分ほどで行われた。(3) 術後管理: マウスは回復後、定められた飼育環境条件の整った場所にて飼育され、12時間、24時間、48時間後に観察を行った。それぞれの時間に上記した内容と同様、再度キシラジン 25mg/kg 腹腔内投与し、疼痛反応がないことを確認後、挿管を行いイソフルランにて吸入麻酔を行いながら、電気メスを使用し下開腹、開胸を行った。採血、気管内洗浄 (BALF) を採取し下記の測定を行う。経過観察後、上記の事項を治療群にも行い、測定、比較する。(4) 測定法: 採血 麻酔下、開胸されているため左心室および右心室より 31G の針付ヘパリンコーティングスタンプにて採血を行った。その後エッペンドルフチューブに移し、遠心 5000G、5 分を行い上澄みの血清のみ採取し - 80 冷凍保存した。気管内洗浄 (BALF)

ペントバルビタール 100mg/kg の麻酔過量投与により安楽死させ、22G の挿管チューブより気管内洗浄を行った。生食 0.8cc のスタンプを 1 検体に対し 3 本準備し氷にて冷却しておく。挿管チューブより気管内洗浄を 3 回行い、回収液は吸着されないポリプロピレン

の容器に入れ、15000G 4 10 分間遠心し上澄みのみを回収し液体窒素にて瞬間冷却後 -80 にて冷凍保存した。ELISA 各種ロイコトリエンやTNF- のELISAキットを使用した。血清ならびに気管洗浄液をサンドウィッチ法にて測定し、検量線を作成後定量した。(5) 治療群の作成：治療薬の投与方法は、静脈注射ですぐに分解されてしまうため腹腔内投与とし 2 群にわけた。NFkB デコイ 200 µg を上行結腸穿孔ステント術後に単回投与する群(NFkB群)と16時間前に100 µg投与後術後に200 µg投与する群(pre NFkB群)である。

#### 4. 研究成果

我々は、臨床に即したモデルの上行結腸穿孔ステント敗血症モデル(CASP群)を確立した。その24時間死亡率は30%弱(27%)であった。そして、炎症性サイトカインや炎症関連分子の発現を調節し発現抑制作用をもつNFkB認識配列を有する二本鎖オリゴヌクレオチド(NFkBデコイ)を治療薬として投与した。投与方法は、静脈注射ですぐに分解されてしまうため腹腔内投与とし 2 群にわけた。NFkB デコイ 200 µg を上行結腸穿孔ステント術後に単回投与する群(NFkB群)と16時間前に100 µg投与後術後に200 µg投与する群(pre NFkB群)にした。NFkB単回投与群の死亡率は25%とCASP群と比較し、有意には減少しなかったが、pre NFkB群では死亡率は100%であり改善された。ただうち1匹は麻酔をかけただけで死亡した。

CASP群の体重減少は5.9%であったが、NFkB単回投与群では7.7%であった。Pre NFkB群では1.6%だった。

各群の気管内洗浄液中のロイコトリエンの濃度は、CASP群4.2ng/mlがNFkB単回投与群1.2 ng/ml、pre NFkB群では1.3ng/mlと有意に減少した。

このことは、腹腔内投与により腹腔内における炎症がある程度抑えられ、敗血症性ショックになるまでの時間が長くなり、肺への炎症も抑えられた結果であると考えられる。今回の投与方法は臨床的にも腹腔内投与という簡便で著しい侵襲性を要せず、手術待機時の敗血症性ショックの予防ともなる可能性がある。

今回の測定で各群の気管内洗浄液中のTNF-は、CASP群、NFkB単回投与群、pre NFkB群間の差はなかった。

効果を判定するには、治療後6時間などのもっと早期の気管内洗浄液中の測定が必要な可能性がある。より効果を得るためには、HVJリポソームなどでNFkBデコイを封入し、静脈内投与し肺に集積させ肺への炎症抑制を強めるなどの工夫が今後必要となってくると思われる。また今回は上行結腸にステント

を留置したため、腸管の修復はなかったが穿孔だけ行うCLPモデルでは、さらなる改善が期待できる可能性がある。

#### 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0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

虹川 有香子(Abukawa, Yukako)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：00318148

##### (2) 研究分担者

なし

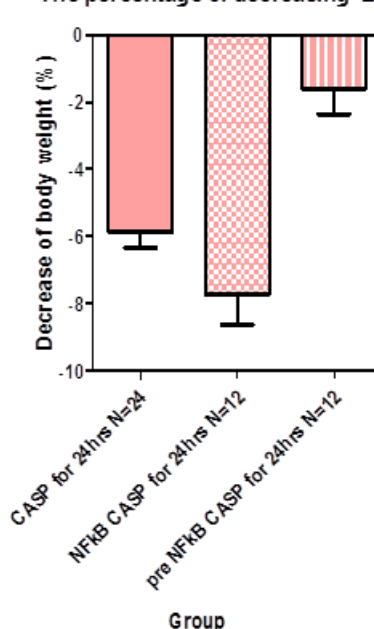
研究者番号：

##### (3) 連携研究者

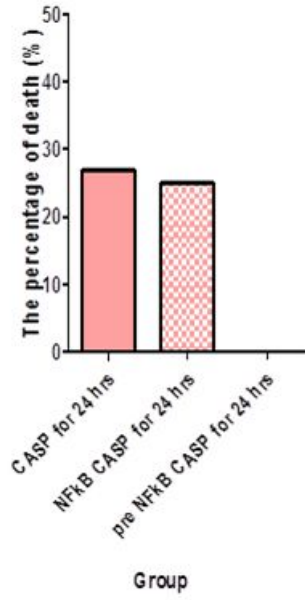
なし

研究者番号：

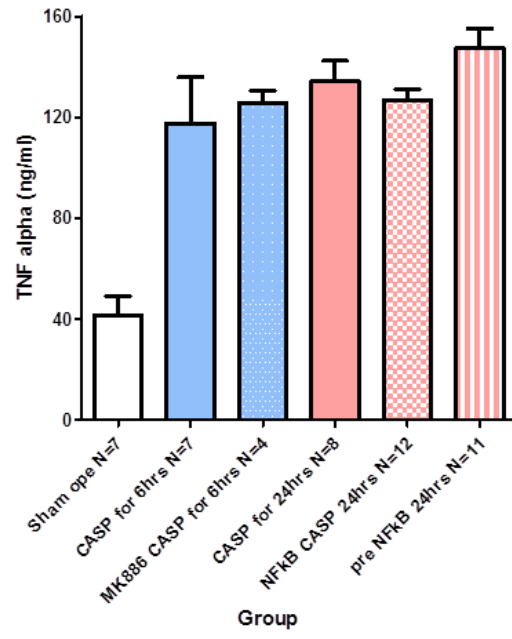
The percentage of decreasing BW



The percentage of death within 24 hrs



The concentration of TNF-alpha in BALF



The concentration of LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub> in BALF

