

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659705

研究課題名(和文)低酸素応答をターゲットとした新たな心停止後症候群治療法開発への展望

研究課題名(英文)Hypoxic response as a new treatment of Post cardiac arrest syndrome

研究代表者

南嶋 しづか (Minamishima, Shizuka)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20622088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は一酸化窒素(NO)が心停止(CA)/CPR後の予後を改善することを明らかにした。近年、NOと低酸素に対する低酸素応答を制御する転写因子HIF(hypoxia-inducible factor)には相互作用があることから、HIFの活性化はCPR後の予後を改善するのではないかと考えた。HIFを活性化させたマウスとその対照群にCA/CPRを試行し、生存率や心機能、神経学的機能を比較したが、HIFの活性化はCA/CPR後の予後を改善しなかった。また、CA/CPR後にHIFを活性化させたマウスを用いた実験においても予後改善は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that inhaled Nitric oxide (NO) could improve outcome after successful cardiopulmonary resuscitation (CPR) in mice. It is increasingly recognized that NO production in hypoxia correlate with HIF (hypoxia inducible factor), a transcription factor which regulate hypoxic response. The present study tried to demonstrate whether systemically activating HIF in mice could improve the outcome after CPR. Although survival rate, neurological and cardiac function were assessed after cardiac arrest and CPR, HIF activation did not work to improve outcome after CPR.

研究分野：医歯薬学

キーワード：低酸素応答 心停止 心肺蘇生

1. 研究開始当初の背景

心肺蘇生(CPR)技術の発達により心停止(CA)後の自己循環回復率は飛躍的に改善したものの、CPR後の死亡率は依然として高く、その主な原因の一つは全身性の虚血再灌流障害(IR injury)であると言われている。申請者は、IR injury に対して保護的に働く硫化水素(H₂S)が血管内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)の活性化を介してCPR後の予後を改善すること(Minamishima et al, Circulation 2009)、蘇生成功後の一酸化窒素(NO)吸入によってCPR後の予後が改善すること(Minamishima et al, Circulation 2011)を明らかにしたが、そのメカニズムは完全には解明されていない。

近年、虚血や低酸素に対する生理的反応(低酸素応答)が解明されつつある中、『低酸素環境下におけるNOと低酸素応答を制御する転写因子HIF(hypoxia-inducible factor)との相互作用』について言及しているものが増えている(Taylor et al, Arterioscler Thromb Vasc Biol 2010; Loo et al, Cell Death and Differentiation 2008)。HIFを介した低酸素応答は造血・血管新生・細胞内エネルギー代謝・オートファジー・細胞増殖・細胞死などを制御している。HIFの活性化が虚血性心疾患(Kido et al, J Am Coll Cardiol 2005)や脳血管障害(Siddiq et al, J Biol Chem 2005)、臓器移植(Bernhardt et al, PNAS 2009)に対して有効である可能性が動物実験の結果から報告されつつあり、これらIR injuryが病態に関与している疾患に対して、HIFをターゲットとした治療法が注目されている。そこで我々は、NOによる蘇生後の予後改善のメカニズムの一つとしてHIFの活性化が関与しており、HIFの活性化は蘇生後の虚血再灌流傷害に起因する心停止後症候群(心停止後の循環不全や神経学的機能不全、敗血症様の炎症)を軽減し、生存率や神経学的予後を改善するのではないかと考えた。

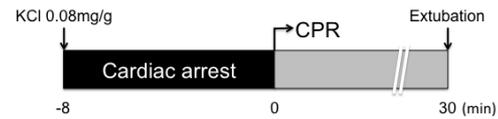
2. 研究の目的

心停止後症候群に対する治療において、低体温療法以外に有効な治療法の報告は無く、新規治療法の開発が待たれるところである。

主にHIFによって活性化される低酸素応答とは、本来、生体が低酸素状態に陥った際の生体防御反応であり、それを人為的に活性化させることによって臓器保護的な作用が期待できるのであれば、PHD2阻害薬によるHIFを活性化させることが心停止後症候群治療法の新たな選択肢の一つとなる可能性もある。本研究では、HIFを活性化させたマウスを用いた心停止・心肺蘇生モデルにおいて、HIFの活性化が心肺蘇生時に有効であることを確認し、将来的には低酸素応答をターゲットとした新しい心停止後症候群の治療法の開発へと展開させることを目標とした。

3. 研究の方法

HIFが恒常的に活性化したTamoxifen誘導型PHD2コンディショナルノックアウトマウス(*Phd2^{F/F};Cre-ER*。以後、PHD2 cKOと表記)と対照群(*Phd2^{+/+};Cre-ER*。以後、Controlと表記)を用いる。8分間のCA後(体温は37度に維持)手指による胸部圧迫と機械換気によるCPRを試行する(下図)。



(1) Pre-treatment

Tamoxifen 経口投与 48 時間後に CA/CPR を施行し各群の生存率を観察した。

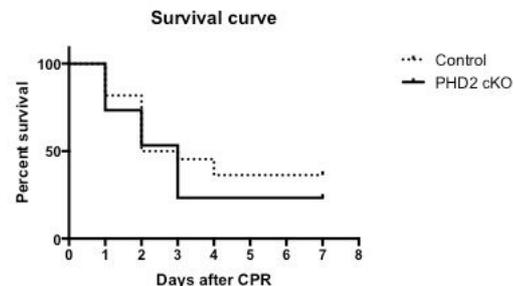
CA/CPR 施行 24 時間後にコンダクタンスカテテルを用いて心臓左室機能を評価した。

(2) After-treatment

前述の CA/CPR を施行した 30 分後に Tamoxifen を経口投与し、各群の生存率を評価した。

4. 研究成果

(1) PHD2 cKO マウスに Tamoxifen を経口投与した際、投与 48 時間後には心筋・肝臓・腎臓において 40~70%の、脳にて 30~40%の PHD2 遺伝子破壊効率が期待できる(Minamishima et al, Blood 2008)。CA/CPR 後の生存率を 7 日間観察したところ、Control 群の 7 日後の生存率は 36%であった。これに対し、PHD2 cKO 群では 23%で HIF の活性化による CA/CPR 後の生存率改善は認められなかった(下図)。

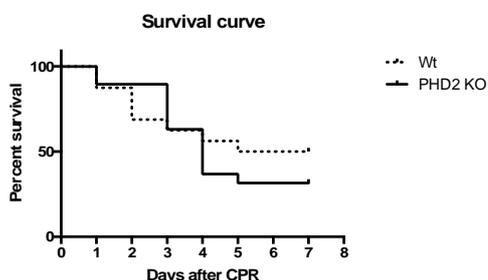


CA/CPR 施行 24 時間後にコンダクタンスカテテルを用いて心臓左室機能を測定した。Control 群、PHD2 cKO 群ともに CA/CPR による収縮能・拡張能の低下が認められたが、HIF の活性化による CA/CPR 後の左心機能低下の軽減作用は認められなかった(下表)。

	Sham	Control	PHD2 cKO
HR	610 ± 9	637 ± 9	664 ± 12
P _{max}	115 ± 11	94 ± 6	85 ± 9
dp/dt _{max} (× 10 ³)	16 ± 2	12 ± 1	12 ± 3
dp/dt _{min} (× 10 ³)	-14 ± 2	-10 ± 1	-10 ± 1

HR: Heart rate (bpm/min), P_{max}: Maximum pressure of LV (mmHg), dp/dt_{max}: Maximum rate of pressure rise (mmHg/s), dp/dt_{min}: Minimum rate of pressure rise (mmHg/s)

(2)CA/CPR 施行 30 分後（抜管直後）に Tamoxifen を経口投与し、生存率を 7 日間観察した。Control 群の 7 日後の生存率は 50% であった。これに対し、PHD2 cKO 群では 32% で HIF の活性化による CA/CPR 後の生存率改善は認められなかった（下図）。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

(1) Kikuchi D, Minamishima YA, Nakayama K Prolyl-hydroxylase PHD3 interacts with pyruvate dehydrogenase (PDH)-E1 and regulates the cellular PDH activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 451(2):288-94 DOI:10.1016/j.bbrc.2014.07.114. (査読有り)

(2) Bao Y, Mukai K, Hishiki T, Kubo A, Ohmura M, Sugiura Y, Matsuura T, Nagahata Y, Hayakawa N, Yamamoto T, Fukuda R, Saya H, Suematsu M, Minamishima YA. Energy management by enhanced glycolysis in G1 phase in human colon cancer cells in vivo and in vitro. *Mol Cancer Res.* 11(9):973-985, 2013 (査読有り)

(3) Igarashi T, Suzuki T, Mori K, Inoue K, Yamada T, Kosugi S, Minamishima S, Katori N, Sano F, Abe T, Morisaki H.

The Effects of Epidural Anesthesia on Growth of Escherichia coli at Pseudosurgical Site: The roles of the Lipocalin-2 Pathway. *Anesth Analg.* 2015 Mar17.[Epub ahead of print] (査読有り)

(4) Kida K, Minamishima S, Wang H, Ren J, Yigitkkanli K, Nozari A, Mandeville JB, Liu PK, Liu CH, Ichinose F Resuscitation. 83(10):1292-7 2012 DOI: 10.1016/j.resuscitation.2012.02.020. (査読有り)

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) “PHD2-HIF dependent hypoxic response regulates Cori cycle” Masataka Kasahara, Tomohiro Suhara, Noriyo Hayakawa, Makoto Suematsu, Yoji Andrew Minamishima ポスター発表（一般） Keystone Symposia “Sensing and Signaling of Hypoxia: Interfaces with Biology and Medicine (A1)” . 1/9/2014, Breckenridge, CO, U.S.A

(2) “低酸素応答と in vivo 糖・乳酸代謝” 南嶋洋司、笠原正貴、寿原明宏、早川典代、末松誠 ポスター発表（一般） 第 11 回がんハイポキシア研究会. 2013 年 12 月 14 日、東北大学片平さくらホールにて

(3) “Regulation of energy metabolism by hypoxic response in vivo” 南嶋洋司、笠原正貴、早川典代、寿原明宏、末松誠 ワークショップ口頭発表（指名） 第 36 回分子生物学会. 2013 年 12 月 3 日、神戸ポートアイランドにて

(4) “吸入一酸化窒素は心停止・心肺蘇生後のマウスの予後を改善する” 南嶋しづか、木田康太郎、徳田賢太郎、小杉志津子、武田純三、市瀬史 日本麻酔科学会第 59 回学術集会（2012 年 6 月 7 日～9 日）兵庫県神戸市、神戸ポートピアホテルにて

〔図書〕(計 3 件)

(1) “一酸化窒素 (NO) 吸入療法” 南嶋しづか、森崎浩、武田純三 メジカルビュー社 *Mebio* 31(2):74-79 2014

(2) “救急・緊急時に使用する薬剤” 南嶋しづか メディカ出版

(3) “一酸化窒素 (NO) 吸入療法の可能性と
未来：虚血再灌流障害に対する臓器保護作用
に期待して”

南嶋しづか、武田純三

メディカル・サイエンス・インターナショナル
Lisa 19(12):1278-1283 2012

〔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

<http://keio-anesthesiology.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南嶋しづか (Shiszuka Minamishima)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20622088

(2) 研究分担者

南嶋 洋司 (Yoji Andrew Minamishima)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：20593966

(3) 連携研究者

久保 亜紀子 (Akiko Kubo)

慶應義塾大学・医学部・特任講師

研究者番号：50455573

菱木 貴子 (Takako Hishiki)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：10338022

末松 誠 (Makoto Suematsu)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：00206385