

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 24 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791586

研究課題名(和文)敗血症性急性肺傷害に対するHDAC阻害剤の効果に関する研究

研究課題名(英文)Protective effect of HDAC inhibitor for sepsis-associated acute lung injury

研究代表者

青木 優太(AOKI, YUTA)

富山大学・大学病院・助教

研究者番号：10621667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：エピジェネティクスは、DNAの塩基配列によらない遺伝子発現の多様性を生み出す機構であり、そのひとつにヒストンのアセチル化がある。本研究では、敗血症におけるヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の役割、HDAC阻害剤の敗血症に対する有用性について検討した。

新規HDAC阻害剤であるCG200745の投与は、敗血症におけるアポトーシスを抑制したが、炎症性サイトカインの抑制や炎症病理像の改善は認めなかった。同じくHDAC阻害剤のバルプロ酸も抗アポトーシス効果を示したが、炎症は抑制しなかった。

HDAC阻害剤によるヒストンアセチル化は、敗血症における細胞のアポトーシスを制御していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Epigenetic regulation works through modifying the structures of DNA, making it more or less accessible to transcription. Histone acetylation is one of the types of epigenetic process. In this study, we examined whether histone deacetylase(HDAC) can contribute to sepsis-associated inflammation and apoptosis.

Treatment of novel broad-spectrum HDAC inhibitor suppressed apoptosis induction in lungs and spleens of septic mice. However, it failed to inhibit elevated levels of serum cytokines and prevent lung inflammation in septic mice. Valproic acid also showed antiapoptotic but not anti-inflammatory effects in septic mice.

The data with HDAC inhibitors suggest that imbalance in histone acetylation may play a contributory role in expression or repression of genes involved in septic cell apoptosis.

研究分野：敗血症

キーワード：敗血症 ヒストン脱アセチル酵素 急性肺傷害

1. 研究開始当初の背景

敗血症などの全身炎症反応症候群(SIRS)では急性肺傷害(ALI)を高率に合併し、重篤な状態となることが多い。ALIは急性の経過をたどる呼吸不全、胸部レントゲン上の両側肺野の浸潤影、左房圧 18 mmHg 以下で左心不全がないものと定義されているが、米国においてこのALIを罹患する患者は年間 19 万人にものぼり、その 4 割程度が死に至っている。敗血症では、ALIを合併する頻度が非常に高く、また他の原因に比べ予後が悪い。

これらの敗血症を含む SIRS の病態では、炎症性サイトカイン、ケモカインのような炎症性物質が細胞内情報伝達を介し過剰に活性化され、その制御は転写因子である nuclear factor- κ B(NF- κ B)や activator protein-1(AP-1)によって行われていることが明らかにされてきた。このような転写因子を制御する方法として、DNA が取り巻いているヒストンの修飾が近年注目されている。

ヒストンにはアセチル化やメチル化などの修飾を受ける位置が多数あり、ヒストン修飾は遺伝子発現調節に重要な意味をもつことが知られている。転写が活性化されるためにはクロマチン構造が緩む必要があり、ヒストンのアセチル化と脱アセチル化のバランスによって制御されている。ヒストンのアセチル化はヒストンアセチル基転移酵素(HAT)によって制御され、過剰にアセチル化されたヒストンは、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)によってアセチル基が除かれる。現在、この HDAC の阻害剤が、血液腫瘍などに対し臨床で応用されてきている。HDAC 阻害剤は炎症性遺伝子の発現を抑制し、抗炎症作用をもたらすことが報告されているが、その臨床応用への展開や作用機序については明らかにされていない。

我々はこれまで、盲腸結紮・穿孔 (CLP) を施した敗血症マウスを作成し、肺傷害を含む多臓器の病態について観察し、その評価方法を確立、敗血症病態に治療効果のある薬剤の研究を進めてきた。本研究ではこの確立された敗血症急性肺障害モデルを用いて、HDAC 阻害剤の治療効果を観察し、その作用機序を解明するものである。

2. 研究の目的

敗血症に起因する炎症およびアポトーシスにおける HDAC の役割を明らかにし、新規 HDAC 阻害剤である CG200745 の敗血症に対する有用性について検討することである。

3. 研究の方法

雄性 BALB/c マウスに盲腸結紮穿孔 (CLP; cecal ligation and puncture) を施し、敗血症マウスを作成した。CG200745 投与群は CLP 施行の 3 時間前に 10 mg/kg を単回腹腔内投与した。

敗血症マウスにおける肺組織中 HDAC レベルの変化、アセチル化ヒストン H3, H4 の変化を観察した。

免疫染色により sham 群と CLP 群における肺および脾臓における組織学的変化を観察し、CG200745 投与、非投与群で比較した。

サイトカインである TNF α と IL-1 β 、ケモカインである MCP-1 については、肺組織中の mRNA をリアルタイム PCR により比較した。血清中においても同様に炎症性サイトカイン・ケモカインの量を比較した。

アポトーシス関連分子である cleaved caspase 3、cleaved PARP、アポトーシス抑制因子である Bcl-2、Bcl-xL の発現について CG200745 投与、非投与群で比較した。

HDAC 阻害剤であるバルプロ酸においても同様に、腹腔内に 500 mg/kg 投与し、肺・脾臓の組織学的変化、肺組織および血清中炎症性サイトカイン・ケモカインの発現について、非投与群と比較した。

4. 研究成果

HDAC class である HDAC1, 2, 3 は CLP の施行により有意に減少し、その結果と並行してアセチル化ヒストン H3, H4 は有意に増加した。また健常マウスに対する CG200745 腹腔内投与では、HDAC 総活性は投与 3 時間後まで有意に低下し 6 時間後に基礎値へ回復した。アセチル化ヒストン H3, H4 はこの結果とも並行して投与 3 時間後に有意に増加し 24 時間後までに基礎値へ復帰した。

肺および脾臓組織は CLP 施行により炎症病理像を呈し、CG200745 投与群と非投与群で組織学的炎症スコアおよび好中球数に差を認めなかった。また肺組織においては、CLP によりサイトカインである TNF α と IL-1 β 、ケモカインである MCP-1 の mRNA が著明に上昇し、CG200745 投与・非投与群間で差がなかった。血清中サイトカイン、ケモカインレベルについても同様に、CLP により上昇し、CG200745 投与・非投与群間で差を認めなかった。

一方、肺・脾臓組織のアポトーシスに関しては敗血症マウスで TUNEL 陽性細胞の著明な増加を認め、CG200745 投与群で有意に減少した。アポトーシス関連分子である cleaved caspase 3、cleaved PARP は敗血症マウスにおいて有意に増加したが、CG200745 投与群で

は健常マウスと同レベルに減少した。逆にアポトーシス阻害因子である Bcl-2、Bcl-xL は敗血症マウスで増加せず、Bcl-2 は CG200745 投与群で健常マウスに比べて減少、Bcl-xL は変化しなかった。

バルプロ酸投与群においては、炎症病理像を呈した肺および脾臓組織は、バルプロ酸非投与群と差を認めなかった。また、肺組織における TNF α と IL-1 β 、MCP-1 の増加は、バルプロ酸投与・非投与群間で差がなかった。血清中サイトカイン、ケモカインレベルについても同様に、バルプロ酸投与・非投与群間で差を認めなかった。肺・脾臓組織のアポトーシスに関しては、敗血症マウスで著名に増加した TUNEL 陽性細胞は、バルプロ酸投与群で有意に減少した。

新規 HDAC 阻害剤である CG200745 の投与は、敗血症におけるアポトーシスを抑制したが、炎症性サイトカインの抑制や炎症病理像の改善は認めなかった。同じく HDAC 阻害剤のバルプロ酸も抗アポトーシス効果を示したが、炎症は抑制しなかった。しかしながら、他の HDAC 阻害剤における抗炎症効果が報告されていることから、今回の結果は CG200745 の用量不足による可能性も否定できないといえる。

HDAC 阻害剤によるヒストンアセチル化は、敗血症における細胞のアポトーシスを制御していると考えられた。この結果は敗血症の病態において、炎症とアポトーシスは互いにその発症に必須ではないことを示唆している。また、アポトーシス抑制因子である Bcl-2 の減少は、Bcl-2 ファミリーメンバーを制御している癌抑制因子 p53 の発現が CG200745 により増加していることが考えられる。すなわち CG200745 のアポトーシス抑制作用は、p53 依存性の Bcl-2 ファミリーメンバー発現には関与しないことが示唆された。

過去の研究では、動物モデルおよび敗血症患者において、アポトーシスが臓器不全の発症および死亡率の増加に大きくかかわることが報告されている。このような一連の研究をさらに進めることで、敗血症のような SIRS に伴う多臓器傷害の病態解明、治療薬開発についての情報提供、敗血症の生存率改善に貢献できると考えられる。

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 1 件)

Mariko Takebe, Hirofumi Oishi, Kumiko

Taguchi, Yuta Aoki, Michinori Takashina, Kengo

Tomita, Hiroki Yokoo, Yasuo Takano, Mitsuaki

Yamazaki, and Yuichi Hattori. Inhibition of histone deacetylases protects septic mice from lung and splenic apoptosis. Journal of surgical research 2014; 187: 559-70 査読あり

Doi: 10.1016/j.jss.2013.10.050

〔学会発表〕(計 4 件)

武部真理子 大石博史 青木優太 他、Possible role of epigenetic modifications in the pathology of sepsis, Euroanaesthesia, 2013 年 6 月 1 日~4 日、バルセロナ スペイン

武部真理子 大石博史 青木優太 他、敗血症におけるエピジェネティクス制御の関与とヒストン脱アセチル化抑制による保護効果、日本麻酔科学会第 60 回学術集会、2013 年 5 月 23 日~25 日、ロイトン札幌 ホテル札幌 札幌市教育文化会館 札幌プリンスホテル(国際館パミール)

武部真理子 大石博史 青木優太 他、敗血症の病理学的変化におけるエピジェネティクス制御の関与、第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 21 日~23 日、福岡国際会議場

武部真理子 大石博史 青木優太 他、新規 HDAC 阻害薬 CG200745 は敗血症性アポトーシスを阻止する、第 63 回日本薬理学会北部会、2012 年 9 月 14 日、朱鷺メッセ：新潟コンベンションセンター

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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

青木 優太 (AOKI, Yuta)
富山大学・附属病院手術部・助教
研究者番号：10621667

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：