

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 11 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462832

研究課題名(和文)敗血症腎傷害への治療戦略：糖質コルチコイドを標的とする 2アドレナリン受容体療法

研究課題名(英文)Combination therapy of beta2 -adrenoceptor activation and steroids for sepsis-induced renal injury

研究代表者

中村 明夫(Nakamura, Akio)

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：70266287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：2アドレナリン受容体(2-AR)とグルココルチコイド(GC)の組み合わせによる抗炎症効果の相加・相乗作用が、敗血症による急性腎傷害(AKI)の防止に有用かどうか検討した。その結果、2-AR過剰発現の腎臓にGCを投与すると、敗血症による腎機能低下・炎症反応が、cAMP-PKA、CB-1、CD14-TLR4-TNF- $\alpha$ 伝達経路を介して回復できた。さらに循環中のNOとANG II、腎臓ヒストン酵素を調節しTNF- $\alpha$ 遺伝子発現転写を抑制することで、生存率が回復した。以上から、2-ARとGCの組み合わせる療法は、TNF- $\alpha$ 細胞内伝達経路を通じて敗血症AKIからの防御効果を示すことを証明した。

研究成果の概要(英文)：This study was undertaken to explore whether cross-talk between 2-adrenoceptor(2-AR) and glucocorticoid may produce additive or even synergic anti-inflammatory effects, resulting in kidney protection against sepsis-induced acute kidney injury(AKI). Results demonstrated that administration of glucocorticoid in the kidney and renal cells with over-expression of 2-AR appeared to modulate renal dysfunction and inflammation following sepsis by altering cAMP-PKA, cannabinoid-1 and CD14-TLR4-TNF- $\alpha$  pathways. In addition, the combination therapy produced modulation of systemic nitric oxide and angiotensin II, and renal histone-modifying enzymes(HAT, HDAC, H3K9Ac), which further suppressed renal TNF- $\alpha$  gene transcription. Moreover, the combination therapy improved the survival of the rats exposed to sepsis-induced AKI. From these findings, the effect of 2-AR activation on glucocorticoid actions via TNF- $\alpha$  pathways was a critical effector in the host defense against sepsis-induced AKI.

研究分野：小児科学

キーワード：敗血症 腎傷害 2アドレナリン受容体 グルココルチコイド TNF- $\alpha$  ヒストン

1. 研究開始当初の背景

(1) 新生児、小児は成人よりも重症感染症や敗血症からショックに至るスピードが速く、早期治療が求められる。また、敗血症の予後は多臓器不全(MOF)の合併に規定されるため、その主要な病態である循環障害や炎症に対する積極的治療法の開発が必要となる。このMOFの中でも、腎傷害は死亡率を劇的に上昇させることから、敗血症の治療戦略を立てる上で、腎傷害の予防と治療対策は重要となる。

(2) 現在、敗血症腎傷害にたいする特有な治療法はなく、基本的に敗血症の治療に一致している。敗血症の治療方法の1つとして副腎ステロイド療法があるが、敗血症におけるステロイド療法の評価は定まっていない。一方、 $\beta_2$ アドレナリン受容体( $\beta_2$ AR)活性化には炎症調節効果を用いた敗血症治療法が紹介されている。 $\beta_2$ AR活性化には、副腎ステロイド薬のグルココルチコイド(GC)作用である抗炎症効果を増強させる薬理作用が報告されているが、その細胞内機序の全体像は不明のままであった。

(3) そこで、 $\beta_2$ AR活性化がGCの抗炎症効果を通じて腎臓での炎症を抑制する機序を解明し、さらに $\beta_2$ ARと副腎ステロイド薬を組み合わせた療法が敗血症腎傷害の治療に有用かどうかを検証する目的で本研究課題が提案された。

ヒストンに関する知見やその核内機序に関する情報は未解明のままであった。敗血症においては、炎症関連遺伝子の発現がエピジェネティックによる制御を受けることが知られている。そこで、敗血症における $\beta_2$ AR活性化とGCを組み合わせた療法が、エピジェネティック制御機構、特にヒストン修飾を介して、炎症関連遺伝子であるTNF- $\alpha$ 遺伝子発現にどのような効果を与えているかに焦点をあて、その機序を解明する本実験が計画された。さらに、 $\beta_2$ ARと副腎ステロイド薬を組み合わせた療法の敗血症腎傷害防止効果を検討した。この結果は昨年度までの成果と合わせて総括し、最後の“まとめ”として記載した。

3. 研究の方法

(1) 盲腸結紮と1回穿刺法(CLP)により敗血症モデル動物を作製した。このラットモデル動物を $\beta_2$ AR補充療法により腎臓の $\beta_2$ AR発現を亢進させ、さらにGC作用を示すデキサメサゾン投与し下記のように5つに群分けした。 $\beta_2$ AR補充療法とは、アデノウイルスをベクターとしたhuman  $\beta_2$ AR遺伝子を腎臓に直接導入する(Nakamura A. et al, J Am Soc Nephrol. 15:316-, 2004)遺伝子治療方法である。経時的に腎臓を摘出し、血液生化学的分析とともに腎臓での遺伝子発現因子やヒストン修飾などを測定した。

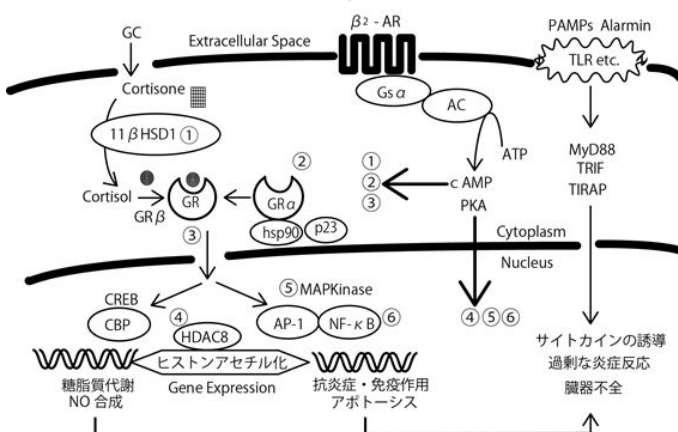
| Group | Treatment                   | ウイルス         | CLP  | ステロイド |
|-------|-----------------------------|--------------|------|-------|
| 1     | Control                     | -gal         | sham | ×     |
| 2     | 敗血症群                        | -gal         |      | ×     |
| 3     | 敗血症群 + $\beta_2$ AR群        | $\beta_2$ AR |      | ×     |
| 4     | 敗血症群 + $\beta_2$ AR + ステロイド | $\beta_2$ AR |      |       |
| 5     | 敗血症群 + ステロイド                | -gal         |      |       |

(2) ヒストン修飾の役割を解明するための実験として、次の1~3を実施した。

1. ヒストン修飾の定量的解析(H3K9Ac, H3K27Acなど)
2. ヒストンアセチル化の酵素化学反応の解析。(HAT, HDAC1~8)
3. 標的遺伝子へのヒストン修飾の特異的解析(ChIP assay)

(3) ラットモデル動物の全身状態を把握するため、実験期間中の生体反応の評価は常時行い、および生化学的解析として血液から腎などの臓器機能検査を経時的に行った。

敗血症におけるGC代謝機構と $\beta_2$ AR細胞内伝達との関係



2. 研究の目的

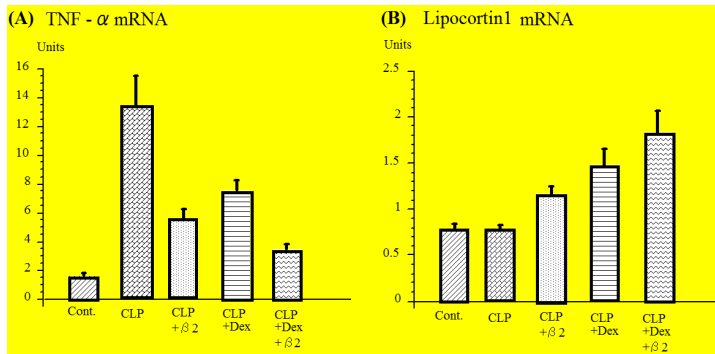
昨年度までに我々は、 $\beta_2$ AR活性化とGCとの関係においてグルココルチコイド受容体(GR)の役割を中心に上図の機序の関係性を証明してきた。しかしながら、サイトカインの誘導する炎症反応に与える

#### 4. 研究成果

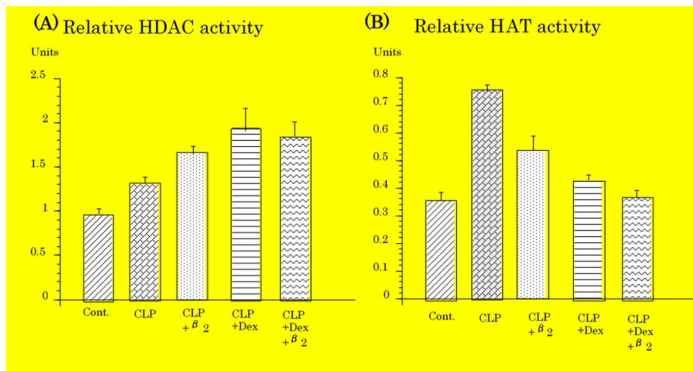
(1) CLP 処置後の生存率は、処置後 8 時間、24 時間、48 時間で大きな差はなかったが、4 群 (敗血症群 + 2AR + ステロイド) の 24 時間生存率が他群よりも高かった。

| Group | Dose                       | 8h(%)    | 24h(%)    | 48h(%)  |
|-------|----------------------------|----------|-----------|---------|
| 1     | Control                    | 6/6(100) | 6/6(100)  |         |
| 2     | 敗血症群                       | 6/6(100) | 10/18(56) | 0/18(0) |
| 3     | 敗血症群 + $\beta$ 2AR         | 6/6(100) | 15/24(63) | 1/18(5) |
| 4     | 敗血症群 + $\beta$ 2AR + ステロイド | 6/6(100) | 17/24(71) | 0/24(0) |
| 5     | 敗血症群 + ステロイド               | 6/6(100) | 12/18(67) | 1/24(4) |

(2) 敗血症の主たる標的遺伝子である TNF- $\alpha$  の遺伝子発現 (mRNA) を測定し、CLP (2 群) では過剰な上昇を示し、CLP + 2 (3 群) および CLP + Dex (4 群) で抑制、さらに CLP + 2 + Dex (5 群) で TNF- $\alpha$  の発現は減少した。また、グルココルチコイド (Dex) の標的遺伝子である Lipocortin 1 の遺伝子発現 (mRNA) を測定し、本実験の Dex 処置が核内発現に作用していることを確認した (下図)。

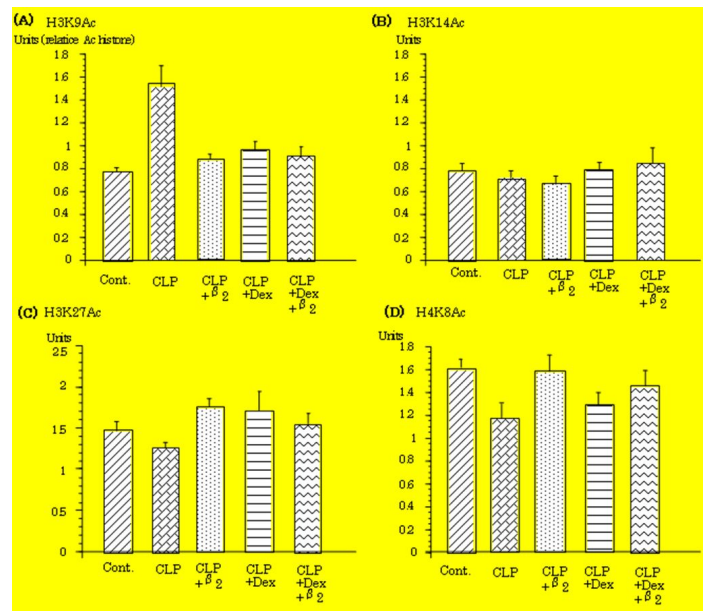


(3) ヒストンアセチル化の酵素化学反応の解析では (下図)

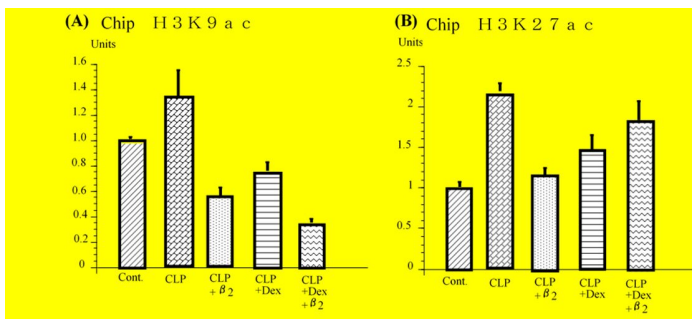


HDAC では、CLP (2 群) と比べて CLP + 2 (3 群) CLP + Dex (4 群) CLP + 2 + Dex (5 群) で増加し、HAT では、CLP (2 群) と比べて CLP + 2 (3 群) CLP + Dex (4 群) CLP + 2 + Dex (5 群) は抑制傾向を示した。敗血症によって亢進する HDAC, HAT 活性の調節機序に 2AR 活性とステロイドが関与する事が示唆された。

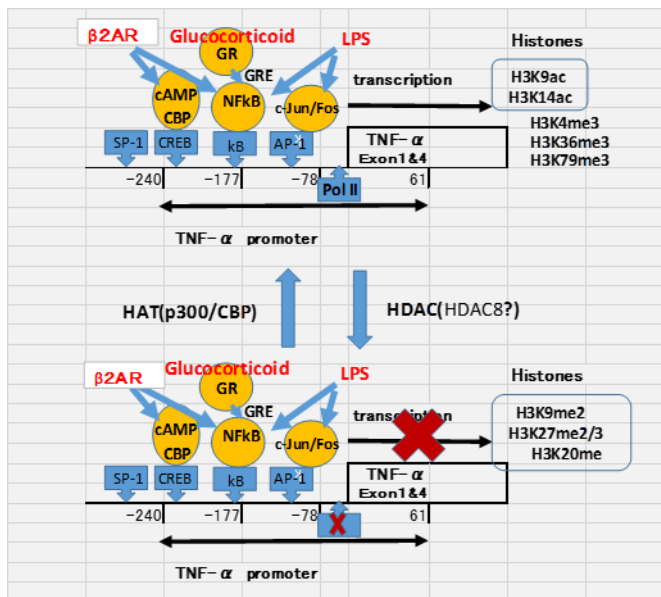
(4) ヒストン修飾の定量的解析 (下図) では、H3K9Ac で CLP (2 群) では有意な増加を示し、CLP + 2 (3 群) CLP + Dex (4 群) CLP + 2 + Dex (5 群) では、CLP による増加を等しく抑制した。また、H3K14Ac, H3K27Ac H4K8Ac は CLP の影響を受けなかった。一方脱アセチル化に関わる H3K9me2, H3K27me3, H4K20me も変化を示さなかった。敗血症によって亢進する TNF- $\alpha$  転写活性を 2AR 活性とステロイドが抑制する機序の一つとして H3K9 アセチル化の関与が示唆された。



(5) Chip法を利用した TNF- $\alpha$  遺伝子プロモーターへのヒストン修飾の特異的解析では、H3K9Ac と H3K27Ac が 2AR 活性と副腎ステロイド薬により増加し、これらの相加効果も認められた (次ページ図)。



(6) 以上の結果から、 $\beta 2AR$  と GC とを組み合わせる療法はヒストン修飾因子 (HAT, HDAC, H3K9Ac) に影響し TNF- $\alpha$  遺伝子発現を調節していることが判明した。この結果から、従来明らかになった  $\beta 2AR$  と GC、そして LPS と核内転写因子群 (GR, AP-1, NFkB など) との相互作用機序を合わせて考察すれば下記の図として説明される。すなわち、敗血症病態下 (LPS 刺激) では、 $\beta 2AR$  と GC が GR を通じて核内転写因子に相互作用し、その結果としておこるヒストン修飾因子への作用 (HAT, H3K9Ac は減少し HDAC, H3K27Ac は増加) を通じて TNF- $\alpha$  遺伝子転写を抑制しているものと考えた。



(7) まとめ。敗血症において低下した  $\beta 2AR$  を補充する  $\beta 2AR$  遺伝子導入法には、腎機能保護効果があり生存率を高める。腎  $\beta 2AR$  には、敗血症による過剰な生体反応 (内分泌、交感神経反応) を抑制、サイトカインを中心とする炎症反応や免疫応答を正常化、核

内転写因子を調節、そして TNF- $\alpha$  遺伝子発現を抑制する効果を持っている。これらの効果は、副腎ステロイド薬を組み合わせることにより増強し敗血症からの生存率をさらに高め腎保護にも働いている。本研究結果から、その効果機序の 1 つとしてヒストン修飾 (HDAC, HAT 活性および H3K9Ac, H3K27Ac) を通じての TNF- $\alpha$  遺伝子発現調節機構があり、敗血症腎傷害の予防に大きな貢献を果たすものと考えられた。

### 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)

Nakamura A. Genotypes of the renin-angiotensin system and glucocorticoid complications. *Pediatrics International* 57, 72-78, 2015 査読あり。

[学会発表](計4件)

中村明夫, 宮川誠. 敗血症腎障害に対する副腎ステロイド薬を組み合わせた  $\beta 2AR$  アドレナリン受容体活性化療法. 44 回日本集中治療学会. 2017年3月. ロイトン札幌 (札幌市・北海道)

中村明夫, 宮川誠. 敗血症腎障害: 臓器不全における  $\beta 2AR$  アドレナリン受容体活性化の役割. 第44回日本集中治療学会. 2017年3月. ロイトン札幌 (札幌市・北海道)

Akio Nakamura.  $\beta 2AR$  activation affords the kidney protection against sepsis-induced ARF. 第44回日本集中治療学会. 2017年3月. ロイトン札幌 (札幌市・北海道)

宮川 誠, 中村明夫. CLP 敗血症ラットモデルを用いた  $\beta 2AR$  交感神経受容体 (b2AR) とステロイド併用療法の腎臓に対する組織化学的観点からの軽減効果第44回日本集中治療学会. 2017年3月. ロイトン札幌 (札幌市・北海道)

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

中村 明夫 (NAKAMURA Akio)

帝京大学・医学部・講師

研究者番号: 70266287

#### (2) 研究分担者

宮川 誠 (MIYAKAWA Makoto)

帝京大学・中央動物施設・教務職員

研究者番号: 80398734

#### (3) 研究協力者

黒崎くみ子 (KUROSAKI Kumiko)