

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861247

研究課題名(和文)敗血症における臓器障害保護をめざした一酸化炭素供与体により安全な投与法の確立

研究課題名(英文) Carbon monoxide releasing molecule attenuate pulmonary injury through modulating macrophage M1/M2 phenotype

研究代表者

水口 真二郎 (MIZUGUCHI, SHINJIRO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師

研究者番号：10464629

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)：水溶性一酸化炭素(CO)供与体の敗血症治療薬の可能性を投与法の差異を検討した。マウス敗血症モデルを作製し、COを経静脈、腹膜、気道的に投与し検討した。結果、経静脈、腹膜投与では肺急性障害をほぼ同等に制御した。気道投与では炎症制御効果は乏しかった。次にいずれの投与法にも関与するマクロファージへの細胞特異的影響を検討した。マクロファージM1誘導刺激下でCOにより24時間まで継続的に炎症抑制していた。一方、M2誘導ではCOにより1、3時間にさらにM2誘導(組織修復)した。これらよりCOはマクロファージの表現型に影響し、特に早期には炎症制御機序の一因と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project was to assess the difference modulation of septic lung injury by water-soluble carbon monoxide releasing molecule-3 (CORM-3) via several administrations (intra-venous, peritoneal, and tracheal) in septic mouse model (in vivo). CORM-3 administrated by intra-venous and peritoneal were attenuated lung injury, although those by intra-tracheal was not attenuated lung injury. Next, modulation of M1/M2 phenotype in alveolar macrophages (AMs) by CORM-3 was assessed in vitro. Treatment of unstimulated AMs with CORM-3 promoted progression of M2 phenotype (the increased expression of CD206 and Ym-1). CORM-3 reduced LPS/IFN $\gamma$  (M1 stimulus)-induced expression of iNOS protein. On the contrary, CORM-3 acutely upregulated CD206 and Ym-1 levels in IL-4/IL-13 (M2 stimulus)-treated AMs. CORM-3 can modulate macrophage M1/M2-phenotype in vitro via continuous suppression of iNOS expression in M1-polarized AMs and upregulation of CD206 and Ym-1 proteins in M2-polarized AMs.

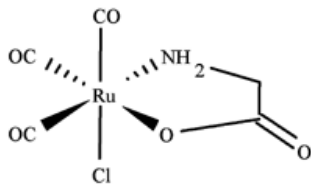
研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺保護 一酸化炭素 マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

重症感染症により惹起される敗血症は、死亡率の高い重篤な病態でありいまだ根本的な治療法は確立されていない。近年、敗血症の本態が局所炎症の起因する循環不全であることが報告され、その治療として臓器血流の維持や局所における炎症反応の制御が新たな治療法として注目されている。

ガス状低分子化合物にヘムの分解時に生じる一酸化炭素 (CO) は、血管弛緩作用および抗炎症作用を有するため、敗血症病態を改善する可能性が期待される。しかしながらCOはガス状の低分子であり容易にヘム鉄と不可逆に結合するため、吸入などにより安全に生体内に投与するためには厳密な濃度管理が必要となる。近年、生体への吸入以外のCO投与方法として一酸化炭素供与体 (carbon monoxide-releasing molecule; CORMs)が精製された【下図】。



Tricarbonylchloro(glycinato)ruthenium (II)  
[Ru(CO)<sub>3</sub>Cl(glycinate)]  
**CORM-3**

申請者らは、種々の炎症モデルや敗血症モデル実験において水溶性のCORM-3の臓器保護効果を報告してきた。確かにCORMs投与により敗血症モデルや移植モデルにおいて明確な臓器保護効果を認めるもののCORMs由来のCOの体内動態は不明である。CORMsは経静脈性あるいは経腹膜的に投与されるため投与方法によって明らかに暴露される細胞・臓器が異なると考えられる。しかし生体内において生理的な二次的ドナー化合物の生成も否定できず、CORMsやCORMs由来COの細胞内動態を解析することが臨床応用上では必須であり、ひいては副作用防止につながると思われる。

## 2. 研究の目的

敗血症における臓器障害保護をめざした一酸化炭素供与体のより安全な投与方法を確立する。COによる抗炎症効果を解明するには臓器あるいは細胞レベルでいつ、どこで発生するのか、つまり局所でのガス分子動態、ガス受容体、シグナル伝達、その下流にある蛋白発現などを解明する意義は極めて大きい。内因性COのメカニズムに加え、外因性COに対する細胞特異的反応を解明することにより、その特性を最終的には臨床医学応用することにある。このことにより致死的な病態である敗血症治療における外因性CO投与という新たな治療法開発の可能性がある。これらを含めた本研究の特徴である水溶性一酸化炭素供与体 (CORM-3) を使用する利点はCOガス吸入と比べその作用機序は不明であるがCOHbを上昇させないため臨床上也安全性が高い。更に様々な投与方法(経腹腔、静脈、気道、臓器還流液など)への発展が期待され、安全なCOドナーの開発により最終的に細胞・臓器特異的に投与も可能となる。本研究においてCO投与方法を含めた抗炎症/臓器保護の特異的病態機序の解明および敗血症に対する臓器特異的治療効果を検討する。

## 3. 研究の方法

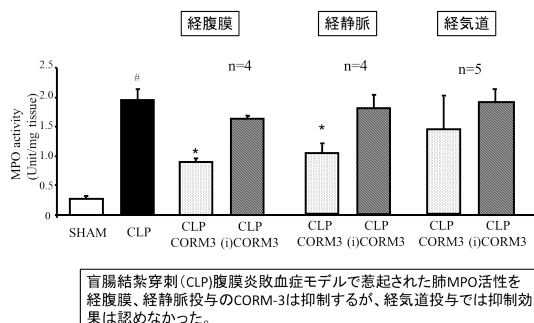
(1)一酸化炭素供与体投与が敗血症病態にどのように影響するかを評価するため、マウスを用いて盲腸穿孔穿孔 (CLP) 腹膜炎敗血症モデルを作製する。これらの腹膜炎モデルにCOを経静脈的、腹膜的、経気道的に投与し、至適投与方法 (10,50 および 100 μM) 濃度投与方法の違いによる作用機序差異を検討する。作成したマウスを6時間後、24時間後に犠牲死させ気管支肺胞洗浄液を採取し、洗浄液のタンパク濃度、MPO活性を測定する。また肺実質のMPO

活性を測定する

(2) 異なる投与方法により最初に CO 暴露される細胞が異なる。すなわち経静脈的であれば血管内皮細胞、好中球、マクロファージ、経腹膜的であれば腹膜由来細胞株、マクロファージ、経気道であれば気道上皮細胞およびマクロファージであると考えられる。特にすべてに存在するマクロファージの表現型として、炎症時に誘導される M1 型、創傷治癒やがん転移に關与する M2 型が知られており、種々の病態で表現型バランスが変化するため、炎症制御への關与が推察される。炎症下の肺胞 M の M1/M2 バランスに CO が及ぼす影響を解析した。NR8383 細胞株(ラット肺胞 M )を用いて、LPS(5 ng/ml)/IFN (10 U/ml)による M1 刺激下、IL4(1 μg/ml)/L13(1 μg/ml)による M2 刺激下に CORM-3(100 μM)を速やかに添加し、1・3・6・24 時間後に細胞を回収。ウェスタンブロットで M1 型 (iNOS 発現と TNF- 発現)と M2 型 (mannose receptor; Man R 発現および Ym-1 発現)を解析し、そのバランスと経時変化を検討した。

#### 4. 研究成果

経静脈、腹膜的投与では敗血症モデル肺急性障害 (肺実質内の MPO 活性を測定) をほぼ同等に容量依存的に制御した。経気道的投与では炎症制御効果は乏しく、これらより経静脈、腹膜投与の有効性が期待される。【下図】



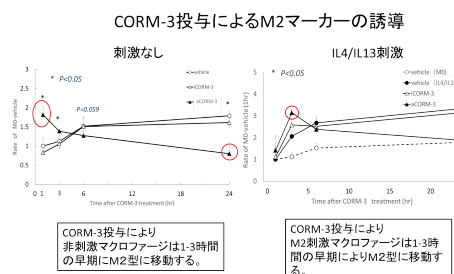
同様に肺胞洗浄液でも経静脈、腹膜的投与

で好中球遊走を CORM-3 投与で抑制していたが、気管内投与では抑制効果は乏しかった。同様に投与方法は腹腔内注入か経静脈内投与の効果が期待される。

(2) マクロファージ細胞株において CO 単独投与では、6 時間後には炎症型マーカーである 2.5 倍 iNOS と一過性に誘導されるが、24 時間後には抑制された。M1 刺激下では、CO 非投与群で iNOS は 6 時間で 10 倍、24 時間で 25 倍に誘導されるが、CO 投与により 6・24 時間後ともに惹起された iNOS 発現を約半分に抑制し、抗炎症効果を認めた。

一方で、M2 マーカーの結果は、CO 単独投与では 1、3 時間後に Man R が約 1.8 倍誘導され 24 時間後には抑制された。M2 刺激下での Man R 発現および Ym-1 は 1,3, 時間後に約 2.0 倍と更なる誘導をみとめた。

【下図】



(3) 以上より、投与方法により CO の効果に差異があること CO 投与により、肺胞 M の表現型・バランス変化に影響を与えることが判明した。特に好中球遊走に關与する 6 時間以内での iNOS 発現抑制、Man R 発現惹起は CORM-3 による炎症制御のメカニズムの一因と考え、炎症のトリガーであるマクロファージおよび好中球遊走を抑制することで敗血症治療の臨床応用に近づくと考えられる。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

山本寛子、水口真二郎、他。一酸化炭素  
供与体 (CORM-3) による肺胞マクロファージ  
への影響、第 116 回日本外科学会 2016 年 4  
月 14 日-16 日、大阪国際会議場(大阪府大阪  
市)

Hiroko Yamamoto-Oka, Shinjiro Mizuguchi,  
et,al. Carbon monoxide releasing  
molecule-3(CORM-3) modulates progression  
of M1/M2 phenotypes in alveolar  
macrophages. SFRR-E/SNFS conference.  
2015.9.02-04. Hohenheim, Germany.

〔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

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水口 真二郎 (Mizuguchi, Shinjiro)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講  
師

研究者番号 : 10464629

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

西山 典利 (Nishiyama, Noritoshi)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号 : 90438226

山本 寛子 (Yamamoto-Oka, hiroko)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・大学院生