

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592348

研究課題名(和文)敗血症における硫化水素吸入による治療効果に関する研究 分子細胞学的検討

研究課題名(英文)The therapeutic effect of inhalation of hydrogen sulfide against sepsis

研究代表者

照屋 孝二 (TERUYA, KOUJI)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50437985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウス敗血症モデルにおける硫化水素吸入療法の効果について検討した。その結果、LPS腹腔内投与による敗血症に対し硫化水素吸入は、その生存率を改善させた。さらに炎症性サイトカインのmRNAの発現も著明に抑えた。また、神経細胞におけるHMGB1の細胞質への移動については、硫化水素吸入により抑える傾向が認められた。この結果から、敗血症における硫化水素吸入療法はHMGB1の細胞質への移動ならびに炎症性サイトカインを抑制することでその生存率を上げることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether inhalation of hydrogen sulfide could prevent septic condition after LPS administration in mice. Our results showed that inhalation of hydrogen sulfide could improve survival rate and completely suppress expression of inflammatory cytokine after LPS administration in mice. And inhalation of hydrogen sulfide was able to inhibit transition of HMGB1 from nuclei into cytoplasm. Our results suggested that inhalation of hydrogen sulfide might potentially improve survival rate via inhibition of cytokine expression during sepsis.

研究分野：集中治療医学

キーワード：敗血症 硫化水素 炎症性サイトカイン HMGB1

1. 研究開始当初の背景

近年、敗血症の病態解析は、分子生物学、遺伝子学などの基礎医学の発展に伴い飛躍的に進んできた。しかしながら、敗血症患者の予後に関してはICU死亡率が約40%、院内死亡率が約50%と高率であり、今後さらなる研究が必要である。敗血症の予後は、高サイトカイン血症による全身の炎症反応(SIRS)とそれに伴う複数の臓器障害(MOF)が大きく関わっており、感染症の治療と並行してこの炎症反応の制御と臓器保護がその予後の改善に繋がると考えられる。昨今の敗血症の研究では、主にラットあるいはマウスに対しLipopolysaccharide(LPS)の腹腔内あるいは静脈内投与することにより敗血症性ショックを誘発し、血中サイトカイン濃度(TNF、IL-1、IL-6など)の上昇、各種臓器における誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)やサイクロオキシゲナーゼ2(COX2)の発現、病理組織学的臓器障害評価および生存率が検討されている。さらに、遺伝子チップ(Microarray)を用いた遺伝子発現の網羅的解析法を用い、遺伝子発現パターンによる生存率への影響なども研究されている。最近、我々の施設でもマウスを用いたLPS腹腔内投与敗血症モデルによる研究を開始した。その結果、LPS投与量依存的にマウスの生存率が低下し、さらに経時的に各種サイトカインの発現も肺、心、肝で増加することが明らかとなった(q-PCRによる結果)。今後、このモデルを用いることで臓器におけるサイトカイン発現、各種臓器位の病理組織学的検討(免疫染色も含む)を中心に研究を行える環境となった。

ところで、最近、生体内ガス分子である一酸化窒素(NO)、一酸化炭素(CO)そして硫化水素(H₂S)が、様々な病態において臓器保護効果を有することが明らかとなってきている(図1)。このH₂Sに関する最近の研究の中で、H₂S吸入による冬眠様作用(Science 2005;308:518)や低酸素環境での延命効果

ENDOGENOUSLY PRODUCED GASES			
	Nitric Oxide	Carbon Monoxide	Hydrogen Sulfide
Enzymatic Production	nNOS iNOS eNOS	HO-1 HO-2 HO-3	CBS CSE (CGL) 3MST
Blood Concentration	nM	nM	μM
Half life (in vivo)	Seconds	Minutes	Seconds
Year of Discovery as a Physiological Molecular	1987	1991	2002
Second Messenger signal	sGC-cGMP	sGC-cGMP	K _{ATP} Channel
Chemical Modification	s-nitrosylation	?	S-sulfhydration

(図1)

(Shock 2007;27:370)、またH₂Sドナーである硫化ナトリウム(Na₂S)や硫化水素ナトリウム(NaHS)の全身投与による心筋保護効果(Proc Natl Acad Sci USA 2007;104:15560)や肝腎保護効果(Liver Transpl 2009;15:1306)が報告されている。さらに興味深いことは、その病態としてSIRSを伴うマウス心肺蘇生モデルにおいて、心肺蘇生直前に静脈内投与したNa₂Sが蘇生後の臓器障害を軽減させ、蘇生後の生存率を著しく改善させることが報告(Circulation 2009;120:888)された。この病態に関わるサイトカイン血症と全身性炎症を疑似したマウス腹腔内LPS投与モデルに対し、硫化水素吸入(80ppm×6時間)を行ったところその生存率が遥かに改善することを見出した。

2. 研究の目的

最近、これらの病態に関わるサイトカイン血症と全身性炎症を疑似したマウス腹腔内LPS投与モデルに対し、硫化水素吸入(80ppm×6時間)を行ったところその生存率が遥かに改善することを見出した。そこで本研究では、敗血症におけるサイトカイン血症までの一連のカスケードに対する硫化水素の影響を、分子生物学的観点からアプローチし、この過程の中でターゲットとなる分子を探索しその後創薬に繋げていくことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス敗血症モデルにおける生存率に対する硫化水素吸入療法の効果

マウス腹腔内 LPS 投与による敗血症モデルにおいて硫化水素吸入（80ppm×4 時間）により生存の改善が認められるか観察した。

(2) 硫化水素療法とサイトカイン変化

マウス腹腔内 LPS 投与による敗血症モデルにおいて硫化水素吸入（吸入濃度・時間は MECx4 時間とする）群と対照群（空気吸入）の両群で、臓器別サイトカイン発現の差異を比較する。方法としては、H₂S 吸入終了から 2 時間後に犠殺し、肺、心、肝そして腎を採取し、Q-PCR にて TLR2、TLR4、TNF、IL6、IL10、ICAM1、誘導型 NOS、HO1 を測定し評価した。

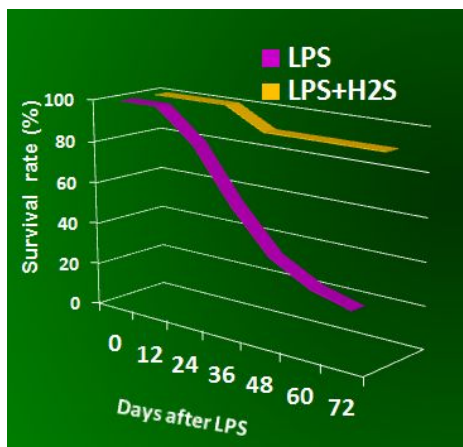
(3) 敗血症モデルにおける臓器 HMGB1 漏出に及ぼす硫化水素の効果

マウス腹腔内 LPS 投与による敗血症モデルにおいて各重要臓器（心、肝、腎）における HMGB1 の細胞外漏出に対する硫化水素の効果を検討した。

4. 研究成果

(1) マウス敗血症モデルにおける生存率に対する硫化水素吸入療法の効果

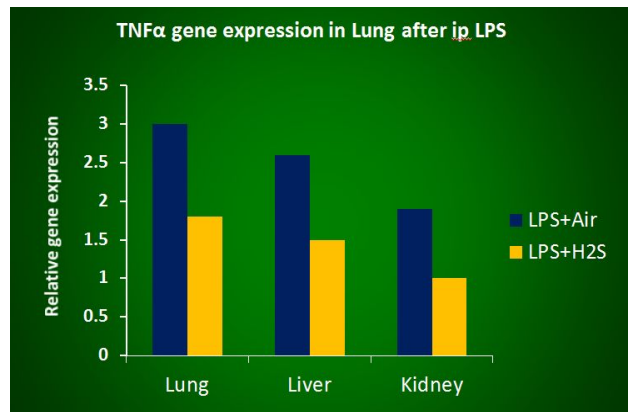
LPS 腹腔内投与による敗血症モデルにおいて硫化水素ガス吸入療法は、対照群と比較し生存率を改善させた（図 2）。



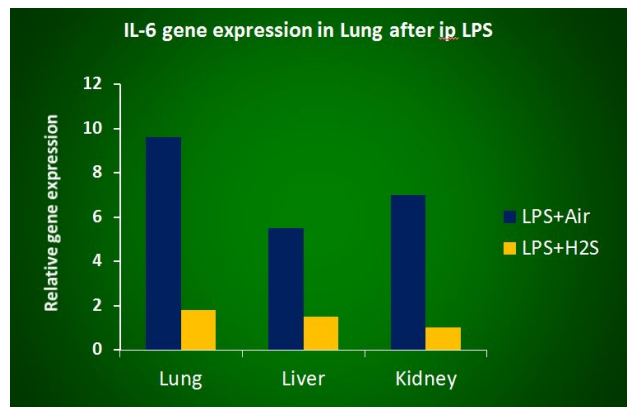
(図 2)

(2) 硫化水素療法とサイトカインの経時的変化

LPS 腹腔内投与敗血症モデルでは、経時的に炎症性サイトカインの mRNA 発現は著明に増加したが、硫化水素吸入群でその増加は完全に抑えられた（図 3、図 4）。



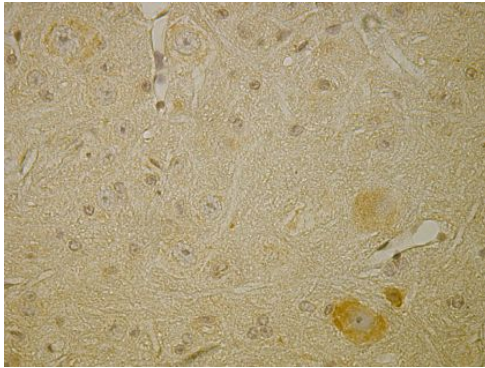
(図 3)



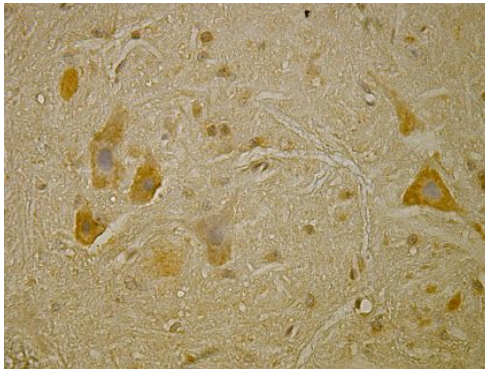
(図 4)

(3) 敗血症モデルにおける臓器 HMGB1 漏出に及ぼす硫化水素の効果

マウス腹腔内 LPS 投与による敗血症モデルにおいて HMGB1 漏出の効果を検討した。その結果、HMGB1 の細胞質への移動は硫化水素療法で抑える可能性を確認できたが、細胞外への漏出は確認できなかった。



(図5：硫化水素治療群)



(図6：対照群)

以上の結果から、腹腔内 LPS 投与による敗血症モデルにおいて、硫化水素吸入療法 (40ppm) はその後の死亡率を減少させ、重要臓器における炎症性サイトカイン発現を抑えることが明らかとなった。そのメカニズムとして敗血症の病態に関わる HMGB1 に着目し検討したが、硫化水素吸入群や対照群において HMGB1 の細胞外への漏出は認められなかった。

最近の研究では、硫化水素分子が転写因子である NF- κ B のチロシン残基に結合し、炎症性サイトカインの遺伝子発現抑制ならびに抗アポトーシス蛋白である Bcl-XL の遺伝子発現を促すということが報告された。

今回の研究では、硫化水素吸入により敗血症の病態に関わる HMGB1 の漏出を抑制することを示せなかったが、硫化水素吸入療法の機序として、その下流にある NF- κ B に対して修飾し炎症性サイトカインの遺伝子発現を抑えた可能性があると考えられた。

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 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)

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

照屋孝二 (TERUYA, Kouji)
琉球大学医学部・助教
研究者番号：624592348

(2) 研究分担者

大城匡勝 (OSHIRO, Masakatsu)
琉球大学医学部附属病院・助教
研究者番号：00315483

研究分担者
淵上竜也 (FUCHIGAMI, Tatsuya)
琉球大学医学部附属病院・講師
研究者番号：10381211

研究分担者
神里興太 (KAMIZATO, Kota)
琉球大学医学部附属病院・助教
研究者番号：10554454

研究分担者
垣花 学 (KAKINOHANA, Manabu)
琉球大学大学院医学研究科・教授
研究者番号： 20274897

(3)連携研究者
()

研究者番号：