

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：25301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10972

研究課題名(和文)急性呼吸窮迫症候群に対するCO遊離分子投与療法においてマイトファジーが果たす役割

研究課題名(英文)The role of mitophagy in the therapy of CO-releasing molecule against acute respiratory distress syndrome

研究代表者

高橋 徹 (Takahashi, Toru)

岡山県立大学・保健福祉学部・教授

研究者番号：40252952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：外傷や外科手術にともなう大出血による著しい血圧低下(出血性ショック)に対して、大量の輸液・輸血により血圧を回復できた(蘇生)としても、それをきっかけに肺の炎症反応が引き起こされ、重篤な呼吸困難に陥ることがある。この蘇生後肺炎に対する現在の治療法は人工呼吸によって呼吸を助け肺の回復を待つ保存的療法であり、肺の炎症そのものを改善する積極的治療法は未だない。本研究では、本来、有毒ガスである一酸化炭素が微量では抗炎症作用を持つことに着目し、ラットの出血性ショック蘇生モデルに微量の一酸化炭素を遊離する分子を投与すると蘇生後肺炎がその抗炎症作用を介して治療効果を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重症肺炎に対する治療は、もちろん病原体に対する有効な薬物の投与を行うべきである。しかし、新型コロナウイルス肺炎のように病原体に対する有効な薬物が存在せず、かつ、過剰な免疫反応にともなう炎症がその重症化に寄与している場合、過剰な炎症反応を抑えることが非常に有効な治療法となりうる。本研究では、ラット出血性ショック蘇生後肺炎に対してCO遊離分子が有効なことを示した。CO遊離分子はまだ、臨床応用できる段階ではないが「重症新型コロナウイルス肺炎」に対する抗炎症薬となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Even after successful resuscitation, hemorrhagic shock due to trauma and massive surgical bleeding, etc., is known to induce a pulmonary inflammatory response that leads to acute lung injury, which is referred to as acute respiratory distress syndrome (ARDS). Although lung protective ventilation has been proposed for the treatment of ARDS in clinical settings, there is no definitive pharmacological therapy to prevent pulmonary inflammation in ARDS. Carbon monoxide (CO) is widely known to be a toxic gaseous molecule that produces carboxyhemoglobin due to its higher affinity to hemoglobin. However, carbon monoxide-releasing molecule-3 (CORM-3) has been reported to liberate and deliver extremely low amount of CO under physiological conditions, which exerts organ-protective effects during systemic insults. In the present study, we demonstrated that CORM-3 confers protection against hemorrhagic shock-induced ARDS mediated through its anti-inflammatory property in rats.

研究分野：麻酔・蘇生学

キーワード：出血性ショック 蘇生後肺傷害 炎症反応 一酸化炭素 CO遊離分子 抗炎症薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心臓大血管手術など、過大な侵襲の手術後に発生する急性呼吸窮迫症候群(ARDS)は周術期管理において問題となる大きな合併症の一つである。しかし、ARDS に対する治療は、肺保護換気をはじめとする支持療法の進歩はあるものの肺傷害の阻止に有効な薬物療法は確立されていない。我々はラット出血性ショック蘇生(HSR)後 ARDS モデルを確立し、蘇生後の炎症反応に起因する酸化ストレスによる肺胞上皮細胞のアポトーシスがその病態に関与し、ストレス蛋白：Heme Oxygenase-1 (HO-1) の過発現、HO-1 の酵素反応代謝産物である「CO の低濃度(250 ppm)吸入」が炎症反応・酸化ストレスを抑制し、アポトーシスを阻害することにより ARDS を改善することを明らかにしてきた。しかし、250ppm の低濃度の CO 吸入であっても Carboxyhemoglobin (COHb) がヒトにおける許容範囲を超えてしまうことが問題であった。近年、イタリアの Motterlini らは水に溶解すると CO を遊離する CO-releasing molecule (CORM)-3 を開発した。我々は、彼らから CORM-3 の供与を受けラットに投与したところ、COHb 値を有害レベルまで上昇させることなく(～3.5%)、肺組織中の CO 濃度が有意に上昇することを予備実験において確認した。

2. 研究の目的

以上より、本研究では、ラット HSR 後 ARDS に対する CORM-3 蘇生後投与が肺傷害に及ぼす影響と、酸素化や血行動態に与える影響を検討した。

3. 研究の方法

1) 動物実験

体重 370-430g の雄性 Sprague-Dawley ラットを用い、大腿静脈から脱血して平均血圧を 30mmHg に 45 分維持した後返血して、HSR モデルを作成した。蘇生 5 分後に生食 (HSR 群) CORM-3 (HSR/CORM-3 群) または inactive CORM-3 (HSR/iCORM-3 群) を投与した。Sham 群は血管確保のみとした。HSR3, 6, 12 時間後に臓器を摘出し、4 群を比較した。

2) バイタルサインと動脈血液ガス分析

血圧・脈拍を HSR 中 5 分毎に記録し、血液ガス分析をショック開始から 0、60、80、120 分に行った。

3) 組織学的評価

HSR12 時間後の肺に HE 染色をして、うっ血、浮腫、細胞浸潤、出血を各々 4 段階で評価し肺傷害スコアを算出した。また、Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-fluorescein isothiocyanate (FITC) nick-end labeling (TUNEL) 染色を行い、アポトーシスの評価を行った。

4) 気管支肺胞洗浄(BAL)と肺 wet/dry 比

HSR6 時間後の肺で BAL を行い、BAL 中蛋白濃度を測定した。また、HSR12 時間後の左肺重量と、110°C、24 時間で乾燥させた左肺重量を測定し、肺 wet/dry 比を算出した。

5) ノーザンプロットとリアルタイム RT-PCR

HSR3 時間後の肺から mRNA を抽出し、ノーザンプロットおよび RT-PCR で、TNF- α 、iNOS、IL-1 β 、IL-10 の遺伝子発現を調べた。

6) ウェスタンプロットと ELISA

HSR12 時間後の肺から蛋白を抽出し、ELISA およびウェスタンプロットで IL-1 β 、MIP-2、カスパーゼ-3 の蛋白発現を調べた。

7) 統計

データは mean \pm SDM で示し、解析には Tukey-Kramer test を用いた。

4. 研究成果

【結果】

1) 肺組織傷害に対する CORM-3 の効果

HSR によって肺に炎症細胞浸潤や浮腫が生じ、肺傷害スコアは有意に増加したが、CORM-3 投与で改善した。iCORM-3 投与は効果を認めなかった。

2) 肺 wet/dry 比と BAL 中蛋白濃度に対する CORM-3 の効果

HSR によって肺 wet/dry 比と BAL 中蛋白濃度は有意に増加したが、COMR-3 投与で改善した。iCORM-3 投与は効果を認めなかった。

3) 肺の炎症性サイトカイン発現に対する CORM-3 の効果

HSR によって肺 TNF- α 、iNOS、IL-1 β mRNA の発現が増強したが、CORM-3 はこれらを抑制し、また IL-10 mRNA を増強させた。CORM-3 は HSR12 時間後の肺 IL-1 β 、MIP-2 蛋白も抑制した。

4) アポトーシスに対する CORM-3 の効果

HSR によって肺の TUNEL 染色陽性細胞数とカスパーゼ-3 蛋白が増加したが、CORM-3 投与でいずれも軽減した。

5) CORM-3 は HSR 中の血行動態や酸素化に悪影響を及ぼさない

CORM-3 は血管拡張作用を持つが、本研究では CORM-3 投与による血圧の低下は認めなかった。また、薬剤投与に伴う血中 COHb の上昇や酸素化低下も認めず、HSR 施行 3 群で ABG に有意差を認めなかった。

【考察】

我々は、HSR 後肺傷害に対して CORM-3 が肺組織学的所見や肺 wet/dry 比、BAL 中蛋白濃度を低下させることを示した。CORM-3 は TNF- α 、iNOS、IL-1 β 、MIP-2 など炎症性サイトカインを低下させ、IL-10 の発現を増加させるとともに、TUNEL 陽性細胞とカスパーゼ-3 も減少させた。薬剤投与に伴う血液ガス分析や血行動態への悪影響はなかった。ラット HSR 後肺傷害において、CORM-3 は急性期に安全に投与でき、抗炎症、抗アポトーシス作用を介して肺傷害を改善させると考えられた。

HSR は酸化ストレスを惹起し、多量のヘム蛋白を遊離させて組織を傷害するが、その際、誘導されたヘムオキシゲナーゼ-1 はヘムを分解して細胞保護的に働く。ヘム分解産物である CO も p38MAPK やインフラマソーム、NF- κ B など種々の経路を介して細胞保護的に働くことが知られており、近年では CORMs を用いた同様の報告が多数上がっている。我々は以前に HSR 後肺傷害において CO が PPAR- γ の活性化や NF- κ B の抑制などを介して、抗炎症、抗アポトーシス作用を示すことを報告しており、今回の研究でも CORM-3 がこれらのシグナル伝達を介して肺傷害を減弱させた可能性がある。これまでに、HSR 後に CORM-3 を投与して肺傷害を調べた研究は殆どなく、本研究は HSR 後肺傷害に対する CORM-3 の治療効果を示したことに意義がある。

我々の以前の研究では HSR 後肺傷害に対する CO 250 ppm の吸入で、COHb が 20% 近くまで上昇することが問題であった。CORM-3 は CO を遷移元素に配位結合させた水溶性化合物であり、体内投与後急速に CO を放出し(t_{1/2} < 1 min)、COHb を上昇させずに細胞保護効果を示すとされており、本研究でも COHb の有意な上昇は認めなかった。

また、CORMs は可溶性グアニル酸シクラーゼや K チャンネル活性化を介する血管拡張作用を有し、正常ラットにおいては CORM-3 20-30 μ mol/kg で平均血圧が約 10mmHg 低下すると報告されているが、本研究では CORM-3 投与後に血圧の低下を認めなかった。その原因としては、投与量が 4mg/kg (13.58 μ mol/kg) と比較的少なかったことや、iNOS の発現を抑制したこと、虚血再灌流後の主要血管拡張因子である NO が減少し、CORMs による血管拡張作用が相殺された可能性が考えられた。いずれにしろ、今回の結果で、虚血再灌流早期においても CORM-3 を安全に投与できることが示唆された。

本研究における limitation であるが、まず、我々は肺組織の CO 濃度を測定していない。しかし、先行研究では複数臓器で CO 濃度を測定して、CORM-3 投与が濃度依存性に組織 CO 濃度を上昇させることを確認している。また、今回 iCORM-3 が何ら肺傷害を改善しなかったことも、CORM-3 からの遊離 CO が肺傷害を軽減させたことを支持する。次に、我々は CORM-3 が他臓器に与える影響を考慮していない。しかし、以前の研究で当 HSR モデルでは主に肺に傷害が生じ、肝臓や腎臓など多臓器に与える傷害は軽微であることが確認されており、CORM-3 の肺傷害治療効果が他臓器の改善に伴う間接効果とは考えにくい。最後に、今回 CORM-3 投与における各種臓器を含めた長期的な副作用がないかは検討しておらず、これに関しては今後さらなる研究が必要である。

【結論】

我々はラット出血性ショック蘇生後 ARDS において、蘇生後早期の CORM-3 投与が抗炎症作用、抗アポトーシス作用を介して肺傷害を軽減することを示した。また、出血性ショック急性期の CORM-3 投与は、血液ガス分析や血行動態に悪影響を及ぼさず、安全に投与できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|------------------------|
| 1. 著者名 Yamaoka M, Shimizu H, Takahashi T, Omori E, Morimatsu H | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Dynamic changes in Bach1 expression in the kidney of rhabdomyolysis-associated acute kidney injury | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 PLoS One | 6. 最初と最後の頁 e0180934 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0180934 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 高橋 徹 | 4. 巻 40 |
| 2. 論文標題 呼吸COガス：酸化ストレスの指標としての可能性 | 5. 発行年 2016年 |
| 3. 雑誌名 ICUとCCU | 6. 最初と最後の頁 533-538 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Yuta Kumada, Toru Takahashi, Hiroko Shimizu, Ryu Nakamura, Emiko Omori, Kazuyoshi Inoue, Hiroshi Morimatsu | 4. 巻 17 |
| 2. 論文標題 Therapeutic Effect of Carbon Monoxide-Releasing molecule-3 on Acute Lung Injury After Hemorrhagic Shock and Resuscitation | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Medicine | 6. 最初と最後の頁 3429-3400 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/etm.2019.7390 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件／うち国際学会 3件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Toru Takahashi, Yuta Kumada, Hiroko Shimizu and Hiroshi Morimatsu |
| 2. 発表標題 Protective role of Carbon monoxide (CO)/CO-releasing molecule against acute respiratory distress syndrome induced by hemorrhagic shock and resuscitation |
| 3. 学会等名 23th International Symposium on Molecular Medicine（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Toru Takahashi, Masakazu Yamaoka, Hiroko Shimizu and Hiroshi Moromatsu |
| 2. 発表標題 Significant changes in renal Bach1 expression in rhabdomyolysis-induced acute kidney injury |
| 3. 学会等名 20th International Symposium on Molecular Medicine (招待講演) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yuta Kumada, Hiroko Shimizu, Ryu Nakamura, Emiko Omori, Kazuyoshi Inoue, Toru Takahashi, Hiroshi Morimatsu |
| 2. 発表標題 Carbon Monoxide-Releasing Molecule-3 Ameliorates Lung Injury after Hemorrhagic Shock and Resuscitation |
| 3. 学会等名 The Anesthesiology Annual Meeting 2017 (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Toru Takahashi |
| 2. 発表標題 Induction of Bach1 mRNA in a rat model of acute liver injury |
| 3. 学会等名 19th International Symposium on Molecular Medicine (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2016年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|-------------------------|-----------------------------|
| 1. 著者名 高橋 徹 | 4. 発行年 2016年 |
| 2. 出版社 医学図書出版株式会社 | 5. 総ページ数 60 分担執筆pp.42-45 |
| 3. 書名 エンドトキシン・自然免疫研究 | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 森松 博史 (MORIMATSU hiroshi) (30379797) | 岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301) | |
| 研究分担者 | 清水 裕子 (SHIMIZU hiroko) (80423284) | 岡山大学・医学部・客員研究員 (15301) | |
| 研究分担者 | 荻野 哲也 (OGINO tetsuya) (90252949) | 岡山県立大学・保健福祉学部・教授 (25301) | |