

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：25301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591730

研究課題名（和文） 急性肺傷害に対する一酸化炭素吸入の治療効果と抗炎症作用の解明

研究課題名（英文） Elucidation of therapeutic and anti-inflammatory effect of carbon monoxide inhalation against acute lung injury

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

研究成果の概要（和文）：

出血性ショックは全身性炎症をきたして急性肺障害 ALI を引き起こす。近年、内因性一酸化炭素 CO が抗炎症効果を有することが分かってきた。われわれは、ラット出血性ショックモデルによる ALI に対して、ショック蘇生後に 250ppm の CO を 3 時間吸入させて、治療効果とそのメカニズムについて検証した。出血性ショックによって、肺の組織障害度スコア、細胞浸潤、肺重量 (Wet/dry 比)、炎症性メディエータ (TNF- α , iNOS) の発現、アポトーシス細胞 (TUNEL 法) のいずれも有意に増加していた。これに対して、CO 吸入群では、上記いずれの値も全て改善が見られた。さらに CO 吸入群では、抗炎症性サイトカイン IL-10 と核内受容体ホルモン PPAR γ の発現が有意に増加していた。CO 吸入による血圧や動脈血酸素分圧に変化はなく、組織低酸素 (Hypoxyprobe) も見られなかった。出血性ショック蘇生後の 250ppm/3 時間の CO 吸入は、CO 毒性をきたすことなく ALI を改善させて、その抗炎症作用として PPAR γ による炎症性メディエータ発現抑制と抗炎症性サイトカイン産生が関与していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Even after successful resuscitation, hemorrhagic shock frequently causes pulmonary inflammation that induces acute lung injury (ALI). We previously demonstrated that when CO is inhaled at a low concentration both prior to and following hemorrhagic shock and resuscitation (HSR) it ameliorates HSR-induced ALI in rats due to its anti-inflammatory effects. In the present study, we administered CO to the same model of ALI only after resuscitation and examined whether it exerted a therapeutic effect without adverse events on HSR-induced ALI, since treatment of animals with CO prior to HSR did not prevent lung injury. HSR were induced by bleeding animals to achieve a mean arterial pressure of 30 mmHg for 1 h followed by resuscitation with the removed blood. HSR resulted in the upregulation of inflammatory gene expression and increased the rate of apoptotic cell death in the lungs. This was determined from an observed increase in the number of cells positive for transferase-mediated dUTP-fluorescein isothiocyanate (FITC), nick-end labeling staining and activated caspase-3. HSR also resulted in prominent histopathological damage, including congestion, edema, cellular infiltration and hemorrhage. By contrast, CO inhalation for 3 h following resuscitation significantly ameliorated these inflammatory events, demonstrated by reduced histological damage, inflammatory mediators and apoptotic cell death. The protective effects of CO against lung injury were notably associated with an increase in the protein expression level of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ , an anti-inflammatory transcriptional regulator in the lung. Moreover, CO inhalation did not affect the hemodynamic status or tissue oxygenation during HSR. These findings suggest that inhalation of CO at a low concentration exerts a potent therapeutic effect against HSR-induced ALI and attenuates the inflammatory cascade by increasing PPAR γ protein expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：周術期管理学、炎症、出血性ショック、急性肺障害、一酸化炭素

1. 研究開始当初の背景

1. 急性肺傷害(ALI)に対する抗炎症療法確立の必要性

周術期管理学の進歩にも関わらず侵襲の大きな手術や出血性ショック後に発生する急性肺傷害(Acute Lung Injury: ALI)の死亡率は依然として高い。ALIの病態には過剰な炎症反応の結果、肺に集積した好中球が産生する活性酸素やプロテアーゼによる細胞傷害が大きな役割を果たしている(N. Engl. J. Med., 2000)。しかし、ALIに対する決め手となる治療法は無く、多大な医療費が費やされており、効果的な抗炎症療法の確立が待たれている。(AJRCCM, 2003)

2. CO吸入のALIに対する抗炎症療法の可能性

炎症反応に対する生体防御反応として細胞にはストレス蛋白が誘導される。申請者らは出血性ショック蘇生によるラットALIモデルを確立し、炎症抑制作用を有するストレス蛋白：HO-1(Heme Oxygenase-1)をショック前に誘導したところALIが軽減することを明らかにした。さらに、HO-1の酵素反応産物である一酸化炭素(CO)を低濃度(250ppm)かつショック前後での吸入させたところ炎症促進反応カスケードを抑制しALIを阻止することを見出した。興味深いことに、このALIモデルにおいては内因性の抗炎症反応—Interleukin-10(IL-10)発現の上昇—がみられ、CO投与はこのIL-10発現をさらに増加させた。

3. CO吸入療法確立のための極低濃度での治療的投与方法と抗炎症作用解明の必要性

CO吸入はALIに対する抗炎症療法となる可能性がある。しかし、これまでの申請者らの研究ではHO-1の前投与による発現上昇が6時間以上持続したことからCOをショックの前後で投与している。さらに250ppmのCOは血中のCO-hemoglobin濃度は約20%まで上昇させる。したがってCO吸入療法の

確立に近づくためには極低濃度でかつショック蘇生後のみの投与によりALIが改善することを示さなければならない。さらに臨床応用に向けては炎症促進シグナル抑制のみならず抗炎症シグナル活性化の面からCOの薬理作用を明らかにする必要がある。ごく最近、脂質代謝に関わる蛋白の発現調節因子として発見された転写因子PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ)が、マクロファージはじめとする炎症細胞にも発現し抗炎症性因子として作用するとの報告が相次ぎ注目を集めている(J. Clin. Invest, 2006)。以上よりCOの治療的投与方法と抗炎症作用における転写因子PPAR γ の関与を明らかにすることを目的に本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

出血性ショックは、臓器の低灌流、虚血、虚血再灌流によって全身性炎症を引き起こす。全身性炎症は肺に波及すると急性肺障害(ALI)を来し、その治療には炎症の抑制がまず挙げられる。一酸化炭素(CO)は生体内で様々なシグナル伝達の役割を担っており、その1つとして抗炎症作用がある。われわれは以前、ラット出血性ショック蘇生 Hemorrhagic shock and resuscitation (HSR)モデルで、HSRの前と後にCOを吸入させると肺障害が軽減することを確認した。そこで本研究では、HSR前のみ、HSR後のみのCO吸入のいずれに治療効果があるかを検証し、さらにCOの抗炎症作用のメカニズムについて分析した。

3. 研究の方法

動物
体重380–420gの雄性Sprague–Dawleyラットを用いた。

出血性ショック蘇生 (HSR) プロトコール
ペントバルビタール 50mg/kg で前処置の
のち、左大腿動静脈にカテーテルを挿入し、
動脈側では観血的動脈圧をモニタリングし
た。静脈側から約 15 分かけて脱血を行って
平均動脈圧を 30 ± 5 mmHg に維持した。1
時間後に再度 15 分かけて返血を行って蘇生
を完了した。Sham 群では、HSR 群と同様に
動静脈の処理を行ったが、脱返血は行わな
かった。

実験デザイン

ラットは各群にランダムに振り分けた。
Sham 群、HSR のみを行った HSR/AIR 群、
蘇生後に CO を 3 時間吸入させた HSR/CO
群、出血性ショック前に CO を 1 時間吸入さ
せた CO/HSR 群の 4 群とした。サンプル採
取は全群で蘇生後 3 時間の時点で合わせてエ
ーテル麻酔下で断頭犠死にて行った。また肺
組織 CO 濃度測定のために、HSR/AIR 群と
HSR/CO 群では蘇生 3 時間後にエーテル麻酔
下で腹大動脈にカテーテルを挿入して血液
を生理食塩水に置換後にサンプル採取を行
った。CO 吸入は 250 ppm の CO を充満させ
たゲージで行った。

組織学的評価

HE 染色による肺組織標本を使用した。組
織傷害度スコアとして、うっ血、浮腫、細胞
浸潤、出血の 4 項目につき 0 (正常)、1 (軽
度)、2 (中等度)、3 (重度) でそれぞれ評価
して合計した。

好中球集積の評価に、Naphthol AS-D
chloroacetate 染色を用いた。

肺 Wet/dry 比

肺葉を採取して重量を測定したのち、
110°C のオープン内に 24 時間静置してから
再度重量を測定した。重量比を算出して、肺
浮腫の指標とした。

RNA 分離とノーザンブロット

Tri- Reagent を用いて total RNA を分離抽
出した。アガロースゲル電気泳動を行い
Bio-Rd Zeta-Probe membrane 上にブロット
したのちに、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ -labeled cDNA を
用いてハイブリダイゼーションした。TNF- α
mRNA、iNOS mRNA をそれぞれ測定した。

核抽出とウエスタンブロット

Nuclear and Cytoplasmic Extraction
Reagents を用いて肺組織から核抽出物を分
離した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動を
行い Hybond-P PVDF membrane 上にブロ
ットしたのち、抗 PPAR γ 抗体を反応させてペ
ロキシダーゼで標識した。

リアルタイム RT-PCR

DNaseI を用いて total RNA を前処置した
のち、T-printed first-strand reaction mix
を用いて cDNA を生成した。プライマー
(IL-10 mRNA) と SYBR Premix Ex Taq
を加えて、LightCycler で PCR を行った。コ
ントロールには β アクチンを用いた。

アポトーシスの評価

MEBDTAIN Apoptosis Kit II による
TUNEL 法によってアポトーシス細胞を同定
した。FITC-avidin で標識して、核はヨウ化
プロピジウムで染色した。

Asp 175 を用いた activated caspase-3 の
ラージフラグメント (17/19kDa) の検出を行
い、Cyanine 3 で標識した。

COHb と肺組織 CO 含有量

血液中の COHb は OSM3 Hemoximeter
を用いて計測した。
凍結保存の肺組織 0.3g にフタル酸塩 pH 標準
液を加えてトータル 1.0g として試験管内で
ホモジネートしたのち、フェリシアン化カリ
ウムを 0.5mL 加えて攪拌のち 5 分間静置
する。ガス層 1mL を 10mL チューブに入れ
て TRI lyzer で遊離 CO を測定した。

組織低酸素の検出

HypoxyprobeTM-1 を用いた組織低酸素の
評価を行った。サンプル採取 90 分前にラッ
トに低酸素マーカーであるピモニダゾール
塩酸を腹腔内投与した。スライド標本でピモ
ニダゾールに対するモノクローナル抗体を
反応させたのち、FITC で標識して観察した。
酸素 6% を 90 分間吸入させたラットをポジ
ティブコントロールとした。

統計学的分析

データは mean \pm SEM で示し、解析には
Student's *t* test と Scheffé's *F* test を用いた。

4. 研究成果

[結果]

HSR 後の CO 吸入は肺傷害度スコアを改善
する

HSR によって 4 項目のスコア全てが増加
していたが、HSR 後の CO 吸入によって有意
に改善が見られた。一方で、HSR 前の CO 吸
入では組織傷害は軽減されず、以下の分析で
は Sham、HSR/AIR、HSR/CO の 3 群で行
うこととした。

CO 吸入は HSR による ALI の好中球集積を
抑制する

HSR によって好中球は間質を中心に著し
い集積を示したが、CO 吸入によって改善が
見られた。

CO 吸入は HSR による ALI の肺浮腫を改善する

HSR による肺浮腫は、CO 吸入によって有意に軽減された。

CO 吸入は HSR による ALI の炎症性メディエータ (TNF- α , iNOS) の発現を抑制する

TNF- α mRNA と iNOS mRNA の発現は HSR によって著明に増加していたが、CO 吸入はいずれの発現も抑制していた。

CO 吸入は抗炎症性サイトカイン IL-10 と核内受容体ホルモン PPAR γ の発現を促進する

IL-10 mRNA の発現は HSR によっても増加の傾向が見られた。CO 吸入は IL-10 mRNA の発現をさらに促し、PPAR γ protein の産生を誘導した。

CO 吸入は HSR による ALI のアポトーシスを抑制する

HSR によってアポトーシス細胞および activated caspase-3 陽性細胞のいずれも増加していたが、CO はこれらアポトーシスに関して有意な抑制を示した。

250ppm/3 時間の CO 吸入は肺組織 CO 含有量を有意に増加させる

CO 吸入によって、血中 COHb は $19.40 \pm 0.66\%$ 、肺組織から得られた CO は 5.43 ± 0.89 pmol/mg と有意に増加していた。

250ppm/3 時間の CO 吸入は血液ガス分析や血行動態に影響しない

250ppm/3 時間の CO 曝露は心拍数、平均血圧、動脈血酸素分圧、動脈血二酸化炭素分圧のいずれも変化させなかった。

250ppm/3 時間の CO 吸入は組織低酸素を来たさない

低酸素 (6%/90 分) で見られるような組織低酸素は、HSR ラットや HSR 後 CO 吸入ラットでは観察されなかった。

[考察]

本研究でわれわれは CO 吸入が HSR による ALI に治療効果を示し、その作用機序として PPAR γ の活性化を介した抗炎症作用の可能性を示した。

CO 吸入の研究には実験動物にストレスを加える前に CO を投与しているものが多いが、ストレス後に CO を投与して効果が得られた報告もある。治療的観点からすれば後投与が現実的・臨床的であり、われわれの結果でも後投与の CO の有効性が証明された。

CO の抗炎症作用の機序は p38 MAPK の関与が有名である。近年、PPAR γ の臓器保護効

果が注目されており CO の抗炎症カスケードにも関わっているとの報告がある。われわれの結果はそれを裏打ちするものであり、CO は PPAR γ を介して治療効果を発揮している可能性がある。

CO 吸入を臨床応用するためには、その毒性が大きな問題である。われわれの結果では 250ppm/3 時間の CO 吸入は低酸素といった毒性を来たすことなく治療効果が得られた。

実験動物のげっ歯類と比較してヒトは体重当たりの分時換気量が少ない、酸素と比較した CO の Hb に対する親和性が高い、COHb の半減期が短い、という違いがある。つまり、標的臓器へ CO を十分取り込むためには、ヒトはより高濃度の CO を長時間吸入する必要があり、かつ COHb はなかなか排出されないということである。近年、さらに低濃度の CO でも効果があるとの報告があり、さらなる研究が必要である。

[結論]

HSR による ALI に対して CO 後投与は治療効果があり、その作用機序の 1 つとして PPAR γ を介した効果が示唆された。ヒトへの安全な投与方法と CO 作用機序の更なる解明が、治療方法の選択肢を広げてくれるかもしれない。

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 8 件)

1. Kawanishi, S, Takahashi T, Shimizu H, Omori E, Sato K, Matsumi M, Maeda S, Nakao A, Morimatsu H, Morita K. Inhalation of Carbon Monoxide after Resuscitation Ameliorates Hemorrhagic Shock-Induced Lung Injury, *Mol Med Rep*, 7: 3-10, 2013
2. Kawakami T, Puri N, Sodhi K, Bellner L, Takahashi T, Morita K, Rezzani R, Tim Oury TD, and Abraham, NG. Reciprocal Effects of Oxidative Stress on Heme Oxygenase Expression and Activity Contributes to Reno-Vascular Abnormalities in EC-SOD Knockout Mice. *Int J Hypertens*, Article ID 740203, 11pp, 2012
3. Matsumi J, Morimatsu H, Matsusaki T, Kaku R, Shimizu H, Takahashi T, Yagi T, Matsumi M, Morita K. Heme breakdown and ischemia/reperfusion injury in grafted liver during living donor liver transplantation. *Int J Mol Med*, 29:135-140, 2012

4. Maeda S, Arai Y, Higuchi H, Tomoyasu Y, Mizuno R, Takahashi T, Miyawaki T. Induction of apoptotic change in the rat hippocampus caused by ferric nitrilotriacetate. Redox Rep, 16: 114-120, 2011
5. Arimori Y, Takahashi T, Nishie H, Inoue K, Shimizu H, Omori E, Kawanishi S, Toda Y, Morimatsu H, Morita K. Role of heme oxygenase-1 in protection of the kidney after hemorrhagic shock. Int J Mol Med, 26: 27-32, 2010
6. Kanagawa F, Takahashi T, Inoue K, Shimizu H, Omori E, Morimatsu H, Maeda S, Katayama H, Nakao A, Morita K. Protective effect of carbon monoxide inhalation on lung injury after hemorrhagic shock/resuscitation in rats. J Trauma, 69:185-194, 2010
7. Suzuki S, Morimatsu, H, Omori E, Shimizu H, Takahashi T, Yamatsuji T, Naomoto Y, Morita K. Responses to surgical stress after esophagectomy: Gene expression of heat shock protein 70, toll-like receptor 4, tumor necrosis factor- α and inducible nitric oxide synthase. Mol Med Rep, 3: 765-769, 2010
8. Morimatsu H, Takahashi T, Matsusaki T, Hayashi M, Matsumi J, Shimizu H, Matsumi M, Morita K. An Increase in Exhaled CO Concentration in Systemic Inflammation/Sepsis. J Breath Res, Vol. 4: Article ID 047103, 4 pp, 2010.

[学会発表] (計 3 件)

1. Toru Takahashi, *et al.*: Increase in exhaled CO concentration after reperfusion of the grafted liver during living donor liver transplantation, 15th International Symposium on Molecular Medicine, Crete, Greece
2. Toru Takahashi *et al.*: GLUTAMINE-INDUCED HEME OXYGENASE-1 PROTECTS AGAINST INTESTINAL TISSUE INJURY IN A RAT MODEL OF HEMORRHAGIC SHOCK, the 11th Joint Scientific Congress of Korean-Japanese Intensivist, Seoul, Korea
3. Toru Takahashi *et al.*: Protective role of heme oxygenase-1 induction in

hemorrhagic shock-induced intestinal tissue injury, The 10th Joint Scientific Congress of the KSCCM and JSICM, Hiroshima, Japan, 2010

[図書] (計 1 件)

1. Morimatsu H, Takahashi T, Shimizu H, Matsumi J, Kosaka J, Morita K: Heme proteins, Hemeoxygenase-1 and Oxidative stress. In "Oxidative Stress - Molecular Mechanisms and Biological Effects", edited by Volodymyr Lushchak and Halyna M. Semchyshyn, pp. 109-124, ISBN 978-953-51-0554-1, InTech - Open Access Publisher, Rijeka, Croatia, 2012.

[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

<http://www.okadaimasui.com/jp/departmen t/research/basic.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 徹 (TORU TAKAHASHI)

岡山県立大学・保健福祉学部・教授

研究者番号: 40252952

(2) 研究分担者

森田 潔 (KIYOSHI MORITA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 40108171

清水 裕子 (HIROKO SHIMIZU)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号: 80423284