

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 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791447

研究課題名（和文）Hsp70誘導による周術期臓器保護の可能性

研究課題名（英文）The possibility of perioperative organ protection by inducing Hsp70

研究代表者

中野 裕子（NAKANO YUKO）

福島県立医科大学・医学部・助手

研究者番号：70529205

研究成果の概要（和文）：

抗潰瘍薬であるテプレノンを経口投与し、Hsp70を誘導することで周術期の臓器保護効果が認められるかを検討したに役立つ研究を行った。ボランティアにテプレノン150mgを内服させ、内服後4日間に亘って末梢血中のHsp70の誘導を検討したが、Hsp70は検出限界以下であった。腰椎手術予定の患者8人をテプレノン内服群（術前3日前）とコントロール群に割り付け、炎症反応やサイトカイン、臓器障害の指標を比較した。その結果、内服群ではIL-6の低下が早い傾向にあった。これはテプレノンの経口投与で、臓器保護効果を得られる可能性を示唆する。今後は症例数を増やしてさらに検討し、内服群でHsp70の誘導を証明することが課題で必要がある。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the effect of preoperative administration of teprenone, an anti ulcer drug, for perioperative organ protection by inducing HSP70. Teprenone (150 mg/day p.o.) was administered to healthy volunteers and we studied the induction in peripheral blood for 4 days, however, HSP70 was undetectable. Eight patients scheduled for lumbar spinal spine surgery were assigned to receive either teprenone or no medication (control). Hematological parameters, acute phase proteins, cytokines, liver function and renal function were determined. The postoperative IL-6 level tended to be lower in the administered group than that of the control group. This suggests the possible perioperative organ protection of teprenone. Further research is needed to determine the induction of HSP70 in more patients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成23年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,500,000	450,000	1,950,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：麻酔・蘇生学

1. 研究開始当初の背景

細胞は熱ショックタンパク (Heat Shock Protein: HSP) に代表されるストレスタンパクを誘導することで様々なストレスに対して耐性化する。HSP は変性したタンパクを元の高次構造に戻したり (シャペロン機能)、分解することで耐性化に関与し、その分子量により Hsp60、Hsp70、Hsp90 などの複数のファミリーに分類されている。研究代表者が着目した Hsp70 は、本来の分子シャペロンとしての役割の他に、TNF α などの炎症性サイトカインの産生抑制、虚血耐性形成などの作用を持つことが知られ、注目されている。

HSP を誘導するのは熱や毒物など細胞毒性を持つものであり、毒性のない HSP 誘導剤はほとんど発見されていない。その中で毒性が低く臨床応用が期待されるのがテプレノンと亜鉛である。

抗潰瘍薬であるテプレノン (商品名セルベックス) は 20 年以上臨床で使用されており、副作用の極めて少ない安全性の高い薬物であるが、Hsp70 を誘導することが知られている。多くの動物実験でテプレノン投与が Hsp70 誘導に伴い臓器障害を低減することが証明されている。しかしながら、ヒトの体細胞レベルでの保護作用を明らかにした研究は極めて少ない。

1996 年には、モルモットでテプレノンの Hsp70 を介した細胞保護作用を明確に示した報告がなされ注目を集めた。(Gastroenterology . 1996 Aug; 111(2): 345-57.)。具体的には、モルモットの胃粘膜細胞をテプレノン 1 μ M (この濃度は現在臨床量で得られる血中濃度である) 存在下で培養し、経時的に Hsp70 発現を調べると、投与後 30-240 分間で Hsp70 が誘導され、60 分後が最大となることが示され、た。それに加えてテプレノンを投与した後に 30 分エタノール暴露を行った場合、細胞より放出される LDH を指標とした細胞障害の程度が軽減されることが示された。この 1996 年の論文以降、動物実験による研究が進み、テプレノンが Hsp70 を誘導し、消化管だけでなく緑内障モデル、脳梗塞モデル、肝移植モデル、心筋虚血再還流モデル、ポリグルタミン病モデルなどあらゆる病態、臓器で保護作用を示すことが明らかにされてきた。しかし、ヒトでの臨床、その現象を証明した論文は胃の粘膜を採取することで Hsp70 誘導との関連を証明した 2007 年の論文一編のみである。(Digestion. 2007; 75(2-3): 148-55.)。臨床、胃以外の臓器保護を示した研究は未だにない。

また、生体微量元素として知られ、300以

上の酵素活性維持に重要とされている亜鉛もまた Hsp 誘導能をもつことが分かっている。亜鉛欠乏症は味覚障害や肢端皮膚炎、創傷治癒遅延などの症状を示すが、積極的に摂取することでヒト末梢単核球における Hsp70 を介した効果的なストレス反応が誘導できることがヒト末梢単核球で証明されている。その他、実験的に敗血症や緑内障の動物モデルに対して、また培養細胞を利用した神経筋疾患への亜鉛投与による Hsp70 を介した効果なども認められている。テプレノン投与によりヒトにおいても Hsp70 が誘導され、臓器保護効果があることが確認されれば、これまでにない成果である。

2. 研究の目的

本研究では周術期の臓器保護に焦点を置き、テプレノンによる Hsp70 誘導効果を調べ、実際の臨床の有用性を確認する研究を計画したことである。現在臨床に適応使用量とされている 1 日量 150mg に近い量を内服することで Hsp70 が誘導されることを証明し、さらに術後の臓器障害が抑制されていることを明らかにしたいと考えた。抗潰瘍薬としての本来のターゲットである胃以外にヒトの臓器、細胞でテプレノンによる Hsp70 誘導を示した研究はなく、成功すれば初の成功例となる。加えて周術期の臓器保護効果が明らかになれば、テプレノンの多臓器保護薬としての可能性を開くものとなる。また、Hsp 研究としてだけではなく臓器保護研究という観点からも大きな一歩となりうる。

3. 研究の方法

(1) 健常人ボランティア

健常人ボランティア 5 人にテプレノン (GGA) カプセルを朝食後 1 回、150mg 内服してもらいさせ、内服後 3、6、12、24、48、72、96 時間後に採血し、末梢血中の Hsp70 誘導の有無をの誘導効果 Hsp70 EIA キットを用いて調べた。

(2) 手術予定患者

整形外科で腰椎の手術を予定されている患者さん 8 人を 2 群に分け、無作為に 4 人ずつをの無作為に内服群、非内服群に割り付けた。内服群では、術前 3 日前からテプレノンカプセル 150mg x 2 回/日を内服しさせた。執刀前、閉創時、術後 1, 3, 6 日後にサイトカイン測定用に 2ml 採血し、遠心分離後、血清を -30 度の冷凍庫に保存した。後日、フローサイトメトリーを使用して血液中のサイトカイン (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF α) を測定した。また、術前検査時の値をコントロー

ルとして術後の検査値の推移から、炎症（CRP、白血球数）、臓器障害（AST、ALT、BUN、Crea）の程度を把握した。

4. 研究成果

(1) 健常人ボランティア

いずれも測定感度以下で、明らかな Hsp の誘導効果は観察されなかった。

(2) 手術予定患者

① 患者背景

各群 4 人ずつの年齢、性別、体重、身長、手術時間、出血量は以下の表の通りであった。

	GGA(+)	GGA(-)
No. of patient	4	4
Age(years)	68.0±5.1	60.6±20.4
Sex(M/F)	4/0	2/2
BW(kg)	65.6±11.0	62.5±7.9
Height(cm)	163.5±7.1	157.0±7.8
Length of operations(min)	131.8±21.0	103.5±42.6
Blood lost(ml)	167.5±126.3	61.3±43.7

② サイトカイン

IL-6, IL-8, TNF- α が測定可能であった。

IL-1 β , IL-10, IL-12 は検出感度以下であった。

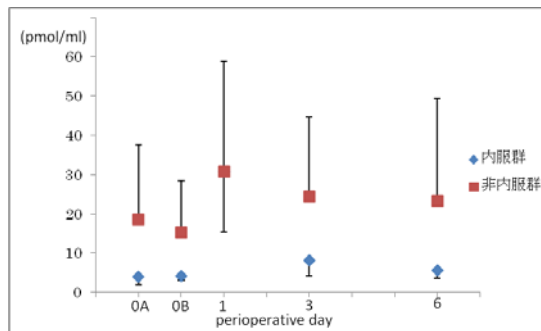
IL-6 は術後 1 日目で両群とも最高値を示した

(非内服群 30.859±15.3 pg/ml、内服群

30.879±27.92 pg/ml)。術後 3 日目には非内

服群 24.364±20.3 pg/ml であったのに対し、

内服群 8.21±4.1 pg/ml であった。



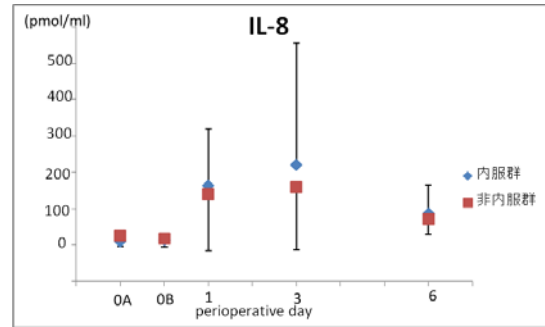
IL-8 の最高値は両群とも術後 3 日目であり、(

非内服群 159.687±173.22 pg/ml、内服群

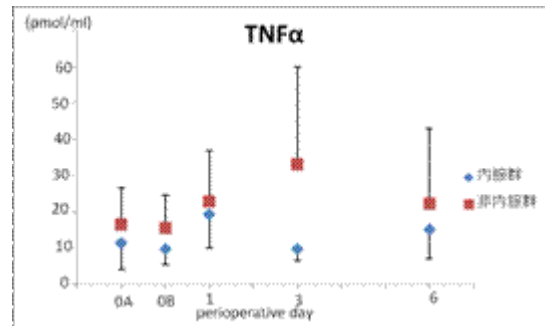
220.162±336.33 pg/ml) 両群とも 6 日目には

低下した (非内服群 70.54±40.384 pg/ml、内

服群 86.263±78.90 pg/ml)。



TNF α の最高値は非内服群で術後 3 日目 (32.973.0±26.869 pg/ml)、内服群で術後 1 日目 (19.22±9.21 pg/ml) であった。内服群の方が最高値が低く、血中濃度の低下も早い傾向にあった。



測定可能であった IL-6、IL-8、TNF α はいずれも炎症性サイトカインであり、手術侵襲が加わった後に上昇することが知られている。特に IL-6 は CRP や好中球エラストラーゼと相関することが報告されている。本研究では、テプレノン内服群で周術期全体にわたり IL-6 の値が低い傾向にあったが、最高値は両群ともほぼ同様であった。IL-8 は両群間に差を認めなかった。TNF α は、テプレノン内服群で術後 3 日目の最高値が低い傾向を認めた。したがって、テプレノン内服により周術期の IL-6 が低く抑えられる可能性、TNF α の上昇が抑制される可能性がある。これは、テプレノンによる臓器保護効果の可能性を示唆する結果といえる。

③ 炎症反応

炎症反応の指標として CRP、白血球数を調べた。

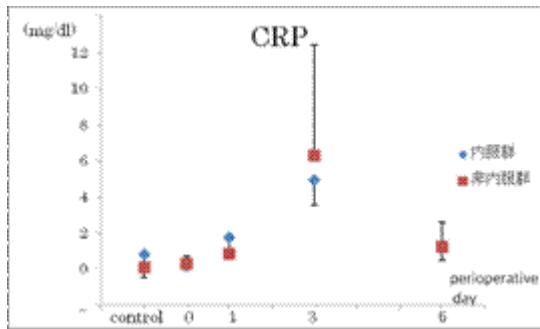
CRP の最高値は両群とも 3 日目 (非内服群

6.253±6.14 mg/dl、内服群 4.92±1.40

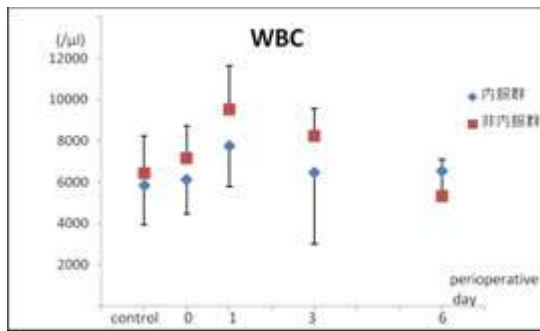
mg/dl) であり、6 日目には同程度まで低下した

(非内服群 1.23±1.33 mg/dl、内服群

1.162±0.697 mg/dl)。



白血球数の最高値は両群とも 3 日目(非内服群 $8250 \pm 348790.60 / \mu l$ 、内服群 $6140 \pm 135560.73 / \mu l$)であり、6 日目には術前と同程度まで低下した(非内服群 $532520 \pm 13910.34 / \mu l$ 、内服群 $6020 \pm 19310.84 / \mu l$)。

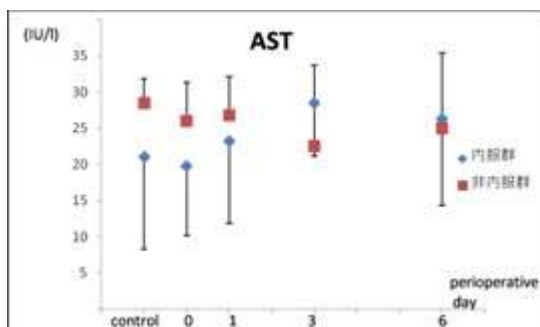


CRP、白血球数では、両群間に差を認めなかった。

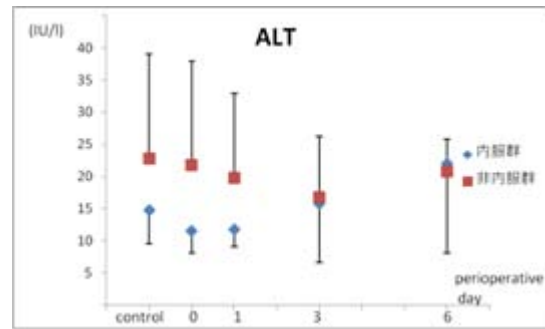
④ 臓器障害

肝障害の指標として AST、ALT、腎障害の指標として BUN、Crea について調べた。

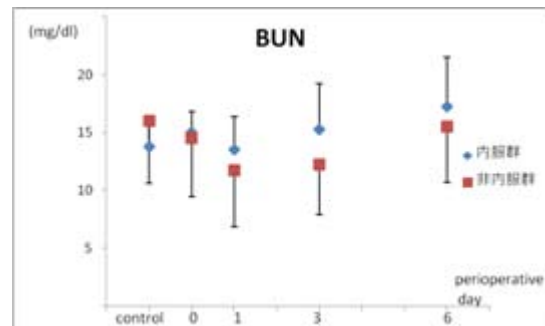
AST の最高値は非内服群で術前コントロール (28.50 ± 12.71 IU/l) 内服群で術後 3 日目 (28.50 ± 11.273 IU/l) であった。



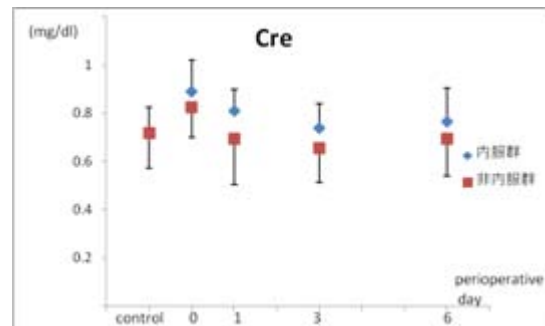
ALT の最高値は非内服群で術前コントロール (22.758 ± 16.30 IU/l) 内服群で術後 3 日目 (15.758 ± 9.071 IU/l) であった。



BUN の最高値は非内服群で術前コントロール (16.00 ± 5.354 mg/dl)、内服群で術後 6 日目 (17.253 ± 4.273 mg/dl) であった。



Cre の最高値は両群とも術当日であった(非内服群 0.83 ± 0.13 mg/dl、内服群 0.899 ± 0.13 mg/dl)。



AST、ALT は、非内服群ではいずれも術後に低下したのに対し、テプレノン内服群では術後に上昇し、両群とも術後 6 日目には同程度の値を示した。これが群間の個体差によるものか、テプレノンの影響によるものかは判別できない。

BUN、Cre は両群間に差を認めなかった。

⑤ 今後の課題

本研究は、各群 4 名ずつで行った。今回得られた結果をふまえ、今後症例数を増やしてさらに検討する必要がある。

また、テプレノンの内服により HSP が誘導されているかどうかの検討が必要である。

研究者番号：

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：
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

中野 裕子 (YUKO NAKANO)
福島県立医科大学・医学部・助手
研究者番号：70529205

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()