

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592342

研究課題名(和文) 全身性炎症反応による心筋障害に対して硫化水素は保護的に働くか？

研究課題名(英文) Cardioprotective effects of hydrogen sulfide against endotoxin-induced myocardial dysfunction

研究代表者

神田橋 忠 (Kandabashi, Tadashi)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：10335961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、エンドトキシン(LPS)誘発性全身性炎症によって生じる心筋障害に対して、硫化水素が保護効果を発揮するのか、その作用メカニズムを生体および分子レベルで解明することであった。全身性炎症の誘導条件、使用する硫化水素供与体に関する条件検討を重ねた。またin vivoだけでなくin vitroでの検討も行った。本研究期間では硫化水素の心筋保護効果は見いだすことができなかった。今後別な条件検討を行い、硫化水素の臓器保護効果について研究を進めて行く予定である。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project was to investigate whether hydrogen sulfide exerts cardioprotective effects against myocardial dysfunction due to endotoxin-induced systemic inflammation, and to elucidate the biological and molecular mechanisms of action. We sought to examine the optimal conditions toward administration of several hydrogen sulfide donors as well as induction of systemic inflammation. In addition, we investigated the experimental conditions in vitro as well as in vivo. We could not clear the proposal, however, during the period of this project probably due to lack of seeking optimal condition against the endotoxin-induced systemic inflammation. We continue to proceed to demonstrate organ-protective effects of hydrogen sulfide proposed in this project in other ways.

研究分野：麻酔学

キーワード：硫化水素 全身性炎症

1. 研究開始当初の背景

重症感染症や虚血再灌流障害などの過度の生体侵襲に対して全身性炎症反応症候群(SIRS)が惹起される。SIRSでは原疾患による障害に加えて、全身性に生じる過剰な炎症反応によって多臓器に障害を生じ、不可逆的な臓器障害が生じると最終的には死に至る。SIRSに伴う臓器障害のうち、心筋障害が生じる場合には重要臓器の灌流が損なわれることで臓器障害がさらに進行する。そのため心筋に対する炎症反応を抑え心機能を維持することはSIRSの治療戦略上必要不可欠である。

硫化水素(H₂S)は、哺乳類の細胞内で恒常的に産生されるガス状シグナル伝達物質として存在する。三種類のH₂S産生酵素のうち、心血管系においてはCystathionine gamma lyase(CSE)が優位に発現しており、産生されたH₂Sが循環調節に関与していると考えられている。近年H₂Sの生理的あるいは病的状態における役割が徐々に明らかにされてきている。

H₂Sの生理作用として、ミトコンドリア電子伝達系を可逆的に阻害して細胞代謝を抑えるということが知られている。臓器虚血時にはこの作用を介して酸素需給バランスを改善し臓器保護効果を示すことが示唆されている。この電子伝達系阻害作用は、虚血再灌流障害の際に発生する活性酸素種を減少させ細胞障害を抑制する効果にもつながる。別の作用として、ATP依存性Kチャネルの活性化を介してミトコンドリア膜透過性遷移孔の開口を抑制し、ミトコンドリア保護作用およびアポトーシス・細胞死の抑制効果があることが示唆されている。そのためH₂Sは心臓虚血再灌流モデルや心停止・心肺蘇生後症候群モデルにおいて臓器機能あるいは予後を改善することが報告されており、米国においては心臓手術患者を対象とした臨床試験も開始されている。

その一方で、炎症におけるH₂Sの役割については未だ議論のあるところである。H₂Sが炎症促進物質として働くという主張がある一方で、抗炎症作用を持つという報告もみられる。申請者はこれまでに慢性炎症に関連した血管障害の分子機構についての基礎的な研究や、肝移植手術あるいは人工心肺を用いる心臓手術といった全身性に炎症の生じる大手術の際の循環調節に関する臨床研究に携わってきた。その経験の中で、全身性炎症反応による心機能障害の分子メカニズムならびにそれを抑制する可能性のあるメディエーターとしてH₂Sに注目した。

本研究課題は、全身性炎症反応で引き起こされる心筋障害の病態生理における硫化水素の関与に焦点をしばって研究を進めることとした。

2. 研究の目的

過度の生体侵襲に対して惹起される全身性炎症反応によって心筋障害が発症する。硫化水素は細胞内で恒常的に産生されるガス状シグナル伝達物質であり、生理的あるいは病的状態においてさまざまな役割を担っていることが明らかになってきた。しかし、炎症における硫化水素の役割については未だ不明な点も多い。そこで本研究では、**エンドトキシン(LPS)誘発性全身性炎症によって生じる心筋障害に対して硫化水素が保護効果を発揮するのか、その作用メカニズムを生体及び分子レベルで解明することを目標とする。**

3. 研究の方法

マウスを用いたLPS誘発性全身性炎症モデルでの心筋障害の発症に対してH₂Sが保護効果を発揮する、という仮説に基づきその作用メカニズムを生体及び分子レベルで解明することを目的とする。以下の三項目を明らかにする。

(1)全身性炎症反応が内因性硫化水素レベルに及ぼす影響を明らかにする。

実験1:野生型マウスに対してLPSを投与して全身性炎症モデルを作成し、試料を採取し、コントロール群と以下の比較を行う。H₂Sの定量(MBB法、海外共同研究者が担当)。

(2)生体内硫化水素レベルの変化が全身性炎症反応によって生じる心機能障害に与える影響を評価する。

実験2:野生型マウスに対して適切なLPS投与量、つまりLPS投与によって心機能障害を生じる投与量をまず決定する。次に、全身性炎症によって生じる心筋障害・心機能障害が、生体内H₂Sレベルの違いに影響されるかということを以下の項目で評価する。心機能(海外共同研究者が担当):心エコー

(3)全身性炎症反応によって生じる心機能障害に対して外因性硫化水素が保護効果をもたらす分子機序を明らかにする。

敗血症やLPS投与に伴って生じる心機能障害の機序として、心筋細胞カルシウム動態の変化、心筋細胞における自然免疫系シグナル経路(Toll-like receptor (TLR)-NFκB)の関与、酸化ストレス、ミトコンドリア障害、アポトーシスの関与などが報告されている⁴⁾。心筋障害を生じるこれらのメカニズムのうちどこを外因性H₂Sが修飾することによって保護効果を発揮するのか、単離心筋細胞および培養心筋細胞を用いて検証する。

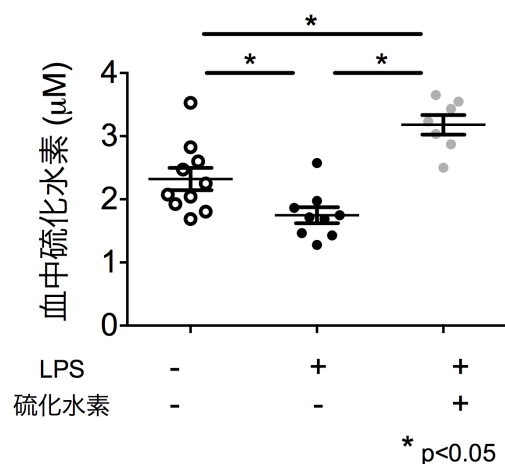
実験 3-1：野生型マウスに対して、LPS 投与および LPS+H₂S 吸入を行い全身性炎症を誘導した後に心筋細胞を単離する。

実験 3-2:ラット心筋由来 H9c2 細胞を用い、LPS、GYY-4137 で処置する。また、上記の機序に対応した阻害薬の使用も考慮する。

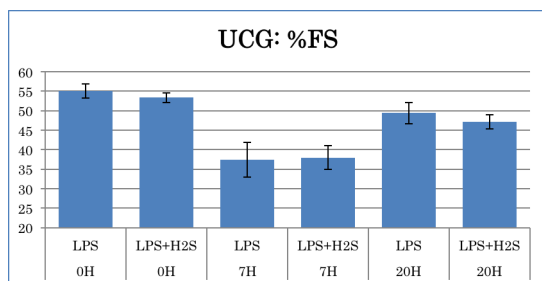
4 . 研究成果

(海外研究協力者担当分を含む)

- (1) LPS によって誘発される全身性炎症において血中硫化水素濃度は低下したが、LPS 負荷後に硫化水素を投与することにより血中硫化水素濃度はコントロール群よりも増加した。(図 1)
- (2) 心臓超音波検査で測定したマウス心収縮能検査では、LPS によって誘発される全身性炎症において 7 時間後の心収縮能は有意に抑制されたが、20 時間後には改善傾向を示した。LPS によって全身性炎症を誘発した状態で硫化水素を投与しても、7 時間後および 20 時間後の心収縮能は LPS 単独群と比較して有意な違いは生じなかった。(図 2)
- (3) 培養細胞における全身性炎症反応の誘導条件を、各種硫化水素供与対化合物を含めて検討したが、一定した結果を得ることができなかった。



(図 1)



(図 2)

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

徳田賢太郎、市瀬史、毒ガス?いいえ治療薬です：硫化水素（仮題）、臨床麻酔 (Japanese Journal of Clinical Anesthesia)、2015 (in press)

Shirozu K、Tokuda K、et al.、Cystathionine -Lyase Deficiency Protects Mice from Galactosamine/Lipopolysaccharide-Induced Acute Liver Failure、Antioxid Redox Signal、査読有、Vol. 20、No. 2、2014、pp204-216、doi: 10.1089/ars.2013.5354.

徳田賢太郎、硫化水素の臨床への応用、LiSA、Vol. 19、No. 12、2012、pp1290-1293、<http://medicalfinder.jp/doi/abs/10.11477/mf.3101101699>

Tokuda K、Kida K、他、Inhaled hydrogen sulfide prevents endotoxin-induced systemic inflammation and improves survival by altering sulfide metabolism in mice、Antioxid Redox Signal、査読有、Vol. 17、No. 1、2012、pp11-21、doi: 10.1089/ars.2011.4363.

[学会発表](計 2 件)

徳田賢太郎、市瀬史、全身性炎症反応に対する、硫化水素の抗炎症反応、第 13 回麻酔科学ウインターセミナー、2013 年 2 月 9-11 日、北海道

Tokuda K、Ichinose F、Inhaled hydrogen sulfide prevents endotoxin-induced systemic inflammation and improves survival by altering sulfide metabolism in mice、International Anesthesia Research Society 2012、2,012 年 5 月 18-19 日、Boston、MA、USA

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神田橋 忠 (KANDABASHI Tadashi)

九州大学病院・メディカルインフォメーションセンター・助教

研究者番号：10335961

(2) 研究分担者

徳田 賢太郎 (TOKUDA Kentaro)

九州大学病院・集中治療部・助教

研究者番号：10419567