

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461657

研究課題名(和文)炎症収束性脂質メディエーターは新生仔ラットCLDの進展を阻止し重症度を緩和する

研究課題名(英文) A pro-resolving lipid mediator effectively restores bleomycin-induced alveolar maturation arrest in neonatal rats

研究代表者

萩原 享(Ogihara, Tohru)

大阪医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00211128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：現在、BPDに対する治療で有効性が証明されているのはステロイドのみであるが、副作用の面で大きな問題となっている。本研究では、新たな治療法の一つとして、炎症収束性メディエーターの効果を検証した。BPDの発症や重症化には炎症の遷延化が関係しているため、炎症反応の収束過程を促進させれば改善しうると考え、Bleomycin誘発BPD modelに対して炎症収束性脂質メディエーターであるResolvinを投与したところ、bleomycinによる肺胞発達停止が解除され、一定の効果が得られた。

研究成果の概要(英文)：It has long been thought that the resolution of inflammation is a passive process associated with a shift in leukocyte population, neutrophils to macrophages, and a clearance of proinflammatory cytokines. Recently, it has been gradually revealed that the resolution of inflammation is an active process governed by several pro-resolving mediators such as fatty acid derivatives including lipoxine, resolvin, and protectin. The precise pathogenesis of BPD is not clearly understood, however, prolonged, non-resolving inflammation may be deeply correlated to the onset and severity of BPD. We hypothesized that the administration of pro-resolving lipid mediators may induce early termination of inflammation and mitigate the severity of BPD. In this study, we used a model of bleomycin-induced BPD in neonatal rats and confirmed that resolvin, one of the pro-resolving lipid mediators, effectively prevented alveolar maturation arrest.

研究分野：新生児呼吸障害

キーワード：BPD resolvin bleomycin

1. 研究開始当初の背景

(1) 早産児特有の気管支肺異形成 (BPD) は多因子起源であり、炎症による気道・肺損傷とそれに伴う異常な修復過程による肺線維化や、肺の成長発達の停止や遅延を来し、慢性呼吸障害を呈する疾患である。現在、有効性が証明されている治療法はステロイドのみであるが、副作用を考慮すると長期間の使用は避けなければいけない。従来の治療法は、全ての炎症を網羅的に押さえ込むという観点から考えられてきたが、そもそも、炎症反応は押さえ込むべきものなのか、新たな視点で考えてみる必要がある。

(2) 本来、炎症反応とは生体に必須の防御機構であり、体内の異物を排除する「初期過程」と組織を修復へと導く「収束過程」からなる。従来の考え方では、炎症反応の収束は、好中球の減少と同時にマクロファージが優勢となり、それと共に炎症性サイトカインなどの炎症促進物質も減少し、自然に消退していく受動的な現象とされてきたが、近年、この炎症収束は、炎症を収束させるための様々な物質が積極的に作られることによって成立する能動的な機構であることが明らかとなってきた。そのため、炎症反応を押さえ込むのではなく、収束過程を促進させれば、自然の炎症反応を阻害することなく、炎症反応を収束させ得ると考えられる。BPD の発症や重症化には炎症の遷延化が関係しているとの報告がある。炎症収束の過程での障害が慢性炎症につながり、気道炎症の遷延化を引き起こす。その結果、正常な肺の修復過程を阻害し、いつまでも収束しない炎症とそれに呼応する異常修復機転を来している。この観点から、炎症収束促進が BPD に効果的ではないかと考えられる。

(3) 脂肪酸代謝酵素であるシクロオキシゲナーゼやリポオキシゲナーゼの活性を阻害すると、炎症の収束または創傷治癒の遅延が認められることから、収束期に産生される何らかの脂質メディエーターが、炎症の収束に何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。アラキドン酸から生じる lipoxin や、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸の酸化物である resolvin、protectin などの炎症収束性脂質メディエーターは、浸潤好中球の clearance と、マクロファージによる細胞破砕物の貪食を促進し、炎症を強力に消滅させる作用を持ち、またその他には、活性酸素産生系の抑制、血管透過性の正常化、炎症性サイトカインの抑制、神経保護作用などの生理活性も持つと言われている。近年の文献によると、高容量 DHA 補充は早産児において BPD の発症率を減少させるとの報告があり、おそらく、DHA から産生される Resolvin や Protectin による炎症収束性メディエーターが関与していることが推察される。

(4) この治療法は、慢性期の遷延化を対象としたもので、障害因子の排除あるいは弱体化を目標とする従来の治療とは、根本的に発

想が異なる。炎症収束性メディエーターは、元々炎症を終わらせるために存在しており、自然の炎症反応を阻害する可能性は低く、特に、天然の脂質メディエーターは、タンパクに比べて抗原性も低いいため、新生児に使用する場合も抵抗が少ない。さらに、一般的な「抑える」という考えではなく「補充する」という方法なので、より自然であり、抑え込むよりも副作用が少ないと予想される。

2. 研究の目的

新生児ラットで Bleomycin 誘発 BPD model を作成し、炎症収束性メディエーターである Resolvin D1 が BPD の重症化を防ぐのではないかと仮説の証明と、遺伝子解析や酸化ストレスマーカーの変化を通じて作用機序の解明を試みる。

3. 研究の方法

Bleomycin を日齢 0 から日齢 9 まで連日 10 日間投与し、BPD model を作成する。Resolvin D1 を日齢 0 から日齢 13 まで連日投与する。日齢 14 に屠殺し、肺組織、血液、気管支肺洗浄液を採取する。肺組織を用いて HE 染色を行い、Radial Alveolar Count (肺胞数) と Mean Liner Intersept (肺胞 2 点間距離) を測定することによって、Resolvin D1 の効果があるかどうかを判定する。また、肺組織より RNA を抽出し、RT-PCR による遺伝子解析を行う。さらに、気管支洗浄液中の酸化型グルタチオンと還元型グルタチオンの比率を測定する。

4. 研究成果

1 回目の実験では、Bleomycin (0.1mg/kg) を日齢 0 から日齢 13 まで連日 14 日間投与した。新生児ラットにおける Resolvin D1 投与実験の報告がなかったため、成人ラットの Resolvin 投与実験の報告から Resolvin の投与量を推察し、Resolvin D1 の投与量を 50ng (0.01mg/kg) とし、日齢 0 のみ投与したが、効果が見られなかった。そこで、2 回目の実験では Bleomycin の投与量をそのままとし、日齢 0 の Resolvin D1 の投与量を 10 倍 (500ng=0.1mg/kg) としたが、効果は見られなかった。Resolvin D1 の投与が前投与のみでは効果を発揮しないと考え、3 回目の実験では Bleomycin の投与量をそのままとし、Resolvin D1 の投与量を増量した。1 回投与量を 1 回目の実験の量 (50ng=0.01mg/kg) で連日 14 日間としたが、それでも効果は見られなかった。Bleomycin の投与量が多く、Resolvin D1 の量がまだ足りないと判断し、Bleomycin の投与量を既報にある、連日 10 日間とし、Resolvin D1 の投与量は、1 回投与量を 3 回目の実験の 10 倍量 (500ng=0.1mg/kg) とし、連日 14 日間とした。その結果、有意差をもって効果を得られた。

結果(MLI)

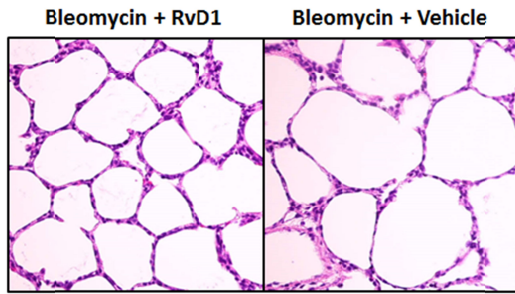


図 1

結果(MLI)

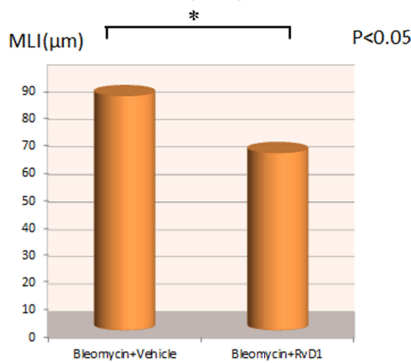


図 2

結果(RAC)

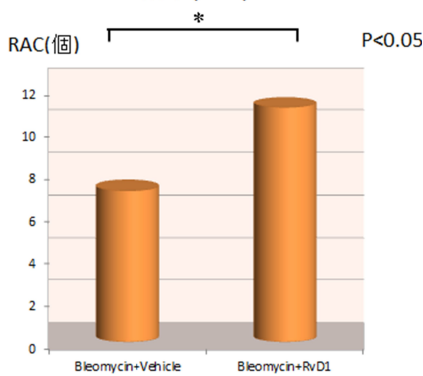


図 3

図に示すように、Resolvin D1 は、Mean Linear Intersept (MLI)の拡大を阻止するとともに(図 1,2)、Radial Alveolar Count (RAC)の減少を抑える(図 1,3)ことによって、bleomycin による肺胞構造の単純化、肺胞発達の停止を解除することが明らかとなった。以上より、Bleomycin 誘発 BPD モデルに対し、抗炎症性脂質メディエーターである Resolvin D1 の効果が示され、BPD の急性期の炎症を抑えるとともに、慢性期の炎症を収束させる効果があることも示唆される。背景に示すように、抗炎症性脂質メディエーターは元々存在するものであり、自然の炎症反応を阻害する可能性は低いため、この治療法が確立すれば、新生児にとって生理的な反

応で、副作用なく BPD の治療を行える可能性がある。

また、肺胞の発育に何らかの関係があることも示唆され、肺胞発育に関与する遺伝子と肺障害に関与する遺伝子を比較し、一致する項目を見つけて評価すれば、作用機序の解明の一助になりうると考えた。

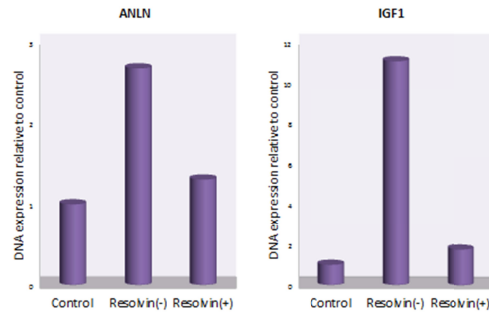


図 4

肺組織から RNA を抽出し、既報の各論文より一致する遺伝子を検索したところ、ANLN, IGF1, Tnc, Eln, Pla2g2a が候補に挙がり、RT-PCR を行った。その結果、ANLN, IGF1 で差を認めた(図 4)。ANLN に関しては、肺に関する具体的な報告は散見されないが、IGF1 に関しては、肺発達と関連する報告を散見する。特に、Bleomycin 誘発肺損傷モデルにおいて、Bleomycin 投与によって IGF1 が増加し、IGF 受容体を阻害することで線維化が改善するという報告がある。Resolvin D1 を投与することで ANLN や IGF1 の発現が抑制され、組織上の改善を認めることから、Resolvin がこれらの経路を阻害することによって BPD の発症を抑制もしくは重症化を改善させたという可能性が示唆され、BPD の新たな治療法として有用である可能性が示唆される。。さらに、免疫染色も行い、作用機序の解明を進める予定である。

現在、気管支肺洗浄液を用いて酸化ストレスの指標である還元型・酸化型グルタチオンの比率を測定中である。

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 1 件)

第 61 回日本新生児成育医学会・学術集会
2016 年 12 月 2 日
BPD 発症ラットモデルにおける炎症収束性脂質メディエーターの効果について
篠原 潤、荻原 享

大阪市
〔図書〕(計 0 件)

〔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

大阪医科大学周産期センター

<http://www.osaka-med.ac.jp/deps/nicu/s>

[hinseiji/aim/index.html](http://www.osaka-med.ac.jp/deps/nicu/s/hinseiji/aim/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荻原 享 (Ogihara Tohru)

大阪医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00211128

(2) 研究分担者

長谷川 昌史 (Hasegawa Masashi)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：80388264

山岡 繁夫 (Yamaoka Shigeo)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：90434779