

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：25301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462450

研究課題名(和文)ビリベルジン/ビリルビン酸化還元系を応用した急性肺傷害に対する新しい治療法の開発

研究課題名(英文) Application of biliverdin/bilirubin redox cycle to the novel therapeutic strategy against acute lung injury

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：出血性ショック蘇生は肺の炎症を引き起こし急性肺傷害(ALI)をきたす。ヘム代謝産物であるビリベルジンは抗炎症作用、抗酸化作用を示す。われわれは、ラット出血性ショック蘇生モデルにおけるALIに対するビリベルジン静脈内投与の効果について検証した。出血性ショックによって、肺の組織傷害度スコア、細胞浸潤、肺重量、炎症性メディエータの発現、DNA酸化損傷マーカー発現のいずれも有意に増加していた。これに対して、ビリベルジン投与群では、上記いずれの値も全て改善が認められた。出血性ショック蘇生後肺傷害に対するビリベルジン投与は抗炎症・抗酸化作用を介して肺保護作用を示すと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Hemorrhagic shock and resuscitation (HSR) induces pulmonary inflammation that leads to acute lung injury. Biliverdin, a metabolite of heme catabolism, has been shown to have potent anti-inflammatory, and anti-oxidant effects. We administered biliverdin to a rat model of HSR and examined its effect on HSR-induced lung injury. We found that pre-treatment of HSR rats with biliverdin at a dose of 35 mg/kg markedly ameliorated HSR-induced pulmonary inflammation and oxidative tissue injury in the lung as judged by the histopathological improvement, and the decrease in inflammatory gene expression and DNA oxidative damage without abnormal increase in serum bilirubin levels. We also confirmed that biliverdin administration after HSR had protective effects on lung injury. Our findings suggest that biliverdin has a protective role, at least in part, against HSR-induced lung injury through anti-inflammatory and anti-oxidant mechanisms.

研究分野：麻酔・蘇生学

キーワード：急性肺傷害 出血性ショック ビリベルジン 炎症 酸化ストレス 酸化的DNA損傷 抗炎症作用 抗酸化ストレス作用

1. 研究開始当初の背景

1) 出血性ショック蘇生 (Hemorrhagic shock and resuscitation ; HSR) は全身性炎症を引き起こし、急性肺傷害 (Acute lung injury ; ALI) を惹起する。ALI では全身性炎症により肺に集積した活性化好中球から遊離した炎症性メディエーターと酸化ストレスの相互作用がその発症メカニズムに重要な役割を果たしている。

2) ビリルビンは高濃度では中枢神経系に害を及ぼす危険性があり有害であるとされている。しかし、1980年代にビリルビンは抗酸化物質であることが報告され、ビリベルジンリダクターゼ (BVR) を介するビリベルジン (BV)/ビリルビン・レドックスサイクルがその抗酸化作用を増強することが明らかとなっている。

3) 実際、BV は様々な酸化組織傷害モデルで血清ビリルビン値を異常上昇させることなく細胞保護作用を示し、特に BV 投与が LPS 投与後 ALI モデルで肺傷害を改善したことが報告されている。しかし BV 投与の細胞保護効果のメカニズムを解明するには他のモデルにおいてもその保護効果が検証されなければならない。

2. 研究の目的

本研究では、ラット HSR モデルに BV を投与し HSR 後 ALI への効果について検討した。この研究の目的は BV が炎症性メディエーター発現の抑制や酸化 DNA 損傷を減少させることによって HSR 後 ALI を改善するかを調べることにある。

3. 研究の方法

1) 動物: 体重 350-400g の雄性 Sprague-Dawley ラットを用いた。

2) 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 腹腔内投与による麻酔下で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。

3) BV 投与と血清ビリルビン値: BV 投与の血清ビリルビン値に対する効果について評価するため、0、15、35、70、100mg/kg の BV を尾静脈から投与した 1 時間後に血清ビリルビン値を ABL800FLEX を使用して計測した。

3) 実験デザイン

ラットは各群にランダムに振り分けた。Sham 手術 1 時間前に Vehicle (生食) を投与した Vehicle/Sham 群、Sham 手術 1 時間前に BV を投与した BV/Sham 群、HSR1 時間前に Vehicle を投与した Vehicle/HSR 群、HSR1 時間前に BV を投与した BV/HSR 群の 4 群とした。BV (35mg/kg)、Vehicle は HSR もしくは Sham 手術開始 1 時間前に尾静脈から投与した。サンプル採取は全群で蘇生後 3 時間、12

時間の時点にエーテル麻酔下で断頭犠死にて行った。

3) RNA 分離とノーザンブロット: Tri-Reagent[®]を用いて HSR3 時間後の肺から total RNA を分離抽出した。変性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。

4) 組織学的評価: HSR12 時間後の 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は Naphthol AS-D chloroacetate 染色を用いた。

5) 肺 Wet/dry 比: HSR12 時間後の肺葉を採取して重量を測定したのち、110°C のオーブン内に 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。

6) 肺 MPO 活性測定: HSR12 時間後の肺組織を用いて Bradley らの方法に若干の改良を加えた MPO 活性測定法を用いて肺 MPO 活性を評価した。

7) 肺 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) 測定: HSR3 時間後の肺組織からミトコンドリア DNA を抽出し、肺ミトコンドリア DNA 中の 8-OHdG 量を高感度 ELISA キットを用いて測定した。8-OHdG の発現部位を特定するため蛍光免疫染色を行った。肺組織の構造と比較するためにアクアポリン 5 との二重染色を行った。

8) BV の HSR 後投与の効果評価: BV の HSR 後投与の効果を検討するためにラットを HSR 後に Vehicle を投与した HSR/Vehicle 群と HSR 後に BV を投与した HSR/BV 群の 2 群に分けて評価した。BV (35mg/kg)、Vehicle は HSR 後に大腿静脈から投与した。評価項目は肺組織学的評価と肺 8-OHdG 量とした。

9) 統計学的分析: データは mean \pm SD で示し、解析には Student's *t* test と ANOVA with Tukey-Kramer honestly significant difference test を用いた。

4. 研究成果

1) 結果

①血清ビリルビン値に対する BV 投与効果: BV 投与 1 時間後、血清ビリルビン値は濃度依存性に上昇した。BV35mg/kg 投与後の血清ビリルビン値は上昇したが正常範囲内 (1mg/dl 未満) であり、この投与量で臓器移植モデル、エンドトキシン誘発肺傷害モデルにおいて保護効果を示していることから、この研究での BV 使用量は 35mg/kg に決定した。②HSR による肺の組織学的変化に対する BV 投与効果: HSR によって肺胞壁の肥厚や炎症細胞浸潤などの所見は悪化が認められたが、HSR 前の BV 投与によって細胞傷害像は軽減し、組織傷害スコアも改善を認めた。

③HSR による肺への好中球集積に対する BV 投与効果：HSR によって肺 MPO 活性は明らかに増加したが、BV 投与によって改善がみられた。MPO 活性と同様に好中球の肺への集積も HSR によって明らかに増加したが、BV 投与によって改善が見られた。

④HSR による肺浮腫に対する BV 投与効果：HSR による肺浮腫は、BV 投与によって有意に軽減された。

⑤HSR によって誘導される炎症性メディエーター (TNF- α , iNOS) 遺伝子発現に対する BV 投与効果：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、BV 投与はいずれの発現も抑制した。

⑥肺 8-OHdG 発現に対する BV 投与効果：肺ミトコンドリア DNA 中の 8-OHdG 量は HSR 群で Sham 群と比較して 1.5 倍に増加していたが、BV 投与群では Sham 群と同じレベルであった。免疫染色を行ったところ Sham 群で 8-OHdG 発現はほとんど観察されなかったが HSR 群で 8-OHdG 陽性細胞が肺間質内に多く認められた。BV 投与によって HSR 後の 8-OHdG 発現は軽減した。

⑦BV の HSR 後投与における効果：臨床使用につなげるために HSR 後の BV 投与の効果についても検討した。組織学的検討では HSR による肺傷害は BV 投与により改善したようにみえたが組織傷害スコアに有意差はなかった。しかし、肺ミトコンドリア DNA 中の 8-OHdG は BV の HSR 後投与によって低下した。

2) 考 察

①この研究では出血性ショック蘇生前の 35mg/kg の BV 静脈内投与が HSR 後の肺傷害 (組織像や好中球浸潤、肺浮腫など) を改善したことを示した。また BV 投与が炎症性メディエーターである TNF α や iNOS の遺伝子発現を明らかに低下させた。それに加えて BV 投与は酸化 DNA 損傷を減少させた。これらのことから BV は抗炎症効果と抗酸化効果によって HSR 後の肺傷害に対する肺保護効果を示した可能性が示唆された。

②本研究では HSR 前の BV 投与が肺組織像を改善した。我々は初めて BV 投与が HSR 後の肺傷害を改善することを示した。我々の結果と過去の研究から、BV が虚血再灌流傷害から肺を含む様々な臓器を保護すると考えられる。

③BV 投与の HSR 後の急性肺傷害に対する保護効果のメカニズムを調べるうえで我々は HSR 後に誘導される TNF α や iNOS などの炎症性メディエーターの遺伝子発現を抑制したことがわかった。BV は明らかに抗炎症効果を有しており、肺傷害に対する保護効果の重要なメカニズムとなっていると考えられる。

④この研究ではまた、BV が HSR の誘導した肺での酸化 DNA 損傷に対して抗酸化効果を示した。8-OHdG は DNA 中のデオキシグアノシンが活性酸素 (ROS) や脂質過酸化物 によ

る酸化損傷を受けた際に発生し、8-OHdG 測定が様々な組織の酸化損傷の指標として使用されている。過去の *in vitro* の研究では BV が強力な抗酸化力を持つことが示唆されているが、我々の研究でも BV は HSR 後の ALI に対する抗酸化効果を示した。

⑤本研究で BV が HSR 後の急性肺傷害に対して抗炎症効果と抗酸化効果を示したが、これらの効果についての詳細な分子的メカニズムは明らかにできていない。

⑥BV は水溶性で容易に排泄され毒性のないことからビリルビンよりも臨床応用しやすいと考えている。哺乳動物では BV は BVR によってビリルビンに変化するが、高ビリルビン血症は神経学的異常と関係している。35mg/kg の BV 投与は投与 1 時間後の血清ビリルビン値を上昇させたが異常高値ではなかった。さらに、BV 投与自体は組織学的変化や炎症性メディエーターの遺伝子発現に対して影響を与えなかった。

⑦我々はまた BV の HSR 後投与による急性肺傷害への保護効果について追加実験を行った。結果として、BV の HSR 後投与は抗酸化効果を示し、組織学的検討では BV の HSR 後投与によって HSR 後 ALI が改善する傾向にあった。しかし、臨床使用での治療効果を明らかにするためにはさらなる臨床研究が必要である。

3) 結 論

我々は HSR が明らかな組織の炎症、例えば炎症性メディエーターの遺伝子発現や好中球の遊走、肺浮腫を増加させることを報告した。HSR 前の BV 投与が明らかに HSR の引き起こした酸化 DNA 損傷を軽減し HSR が誘導する ALI を改善した。このことから BV は少なくとも部分的に抗炎症と抗酸化のメカニズムにより HSR 後 ALI を改善することを示唆した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Taira J, Nakashima Y, Yoshihara S, Koga S, Sueda S, Komatsu H, Higashimoto Y, Takahashi T, Tanioka N, Shimizu H, Morimatsu H, Sakamoto H. Improvement of heme oxygenase-1-based heme sensor for quantifying free heme in biological samples, *Analytical Biochemistry*, Vol. 489, pp.50-52, 2015. doi: 10.1016/j.ab.2015.08.004. (査読有)
- ② 高橋 徹. 一酸化炭素(CO)産生酵素：ヘムオキシゲナーゼ-1 が急性臓器障害において果たす役割. *安定同位体と生体ガス*, Vol. 7, pp. 42-48, 2015. (査読無)
- ③ Tanioka N, Shimizu H, Takahashi T, Omori E, Kuroda K, Shibata M, Yamaoka M, Toda Y, Matsusaki T, Morimatsu H. Induction of hepatic Bach1 mRNA expression by carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *Biomed Rep*, Vol. 2, 359-363, 2014.

- doi: 10.3892/br.2014.235 (査読有)
- ④ Kosaka J, Morimatsu H, Takahashi T, Shimizu H, Kawanishi S, Omori E, Endo Y, Tamaki N, Morita M, Morita K. Effects of Biliverdin Administration on Acute Lung Injury Induced by Hemorrhagic Shock and Resuscitation in Rats, PLOS ONE, 8: e63606, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0063606. (査読有)
- ⑤ 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, Vol. 7, pp.3-10, 2013. doi: 10.3892/mmr. (査読有)
- ⑥ Kawamura T, Wakabayashi N, Shigemura N, Huang CS, Masutani K, Tanaka Y, Noda K, Peng X, Takahashi T, Billiar TR, Okumura M, Toyoda Y, Kensler TW, Nakao A. Hydrogen gas reduces hyperoxic lung injury via the Nrf2 pathway in vivo, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, Vol. 304, pp. L646-L656, 2013. doi: 10.1152/ajplung.00164. (査読有)
- ⑦ 高橋 徹, 森松博史. 生体ガスと臓器保護 呼吸 CO ガスは酸化ストレスの指標か? Medical Gases, Vol, 15, pp. 17-19, 2013 (査読無)
- [学会発表] (計 4 件)
- ① 高橋 徹. 活性酸素の関与とその制御—抗酸化ストレス蛋白 HO-1 システムの臨床応用への可能性. シンポジウム: 肺傷害発症と重症化のメカニズム—臨床応用への可能性—. 日本麻酔科学会・第 62 回学術集会, 2015 年 5 月 29 日 (招請講演)
- ② Takahashi T. Protective role of ulinastatin on lung injury and inflammation induced by hemorrhagic shock. The 18th International Symposium on Molecular Medicine at Athens, Greece. *Int J Mol Med*, Vol. 36. Suppl. 1, S19, October 9, 2015. (海外招待講演)
- ③ 高橋 徹. 特別講演: 一酸化炭素(CO)産生酵素: Heme Oxygenase-1 が急性臓器障害に果たす役割. 第 6 回日本安定同位体・生体ガス医学応用学会大会. 東邦大学医療センター, 東京, 2014 年 11 月 1 日 (招請講演)
- ④ Takahashi T, Shimizu H, Morimatsu H. Protective role of heme oxygenase-1/CO system in hemorrhagic shock-induced acute lung injury. The 16th International Symposium on Molecular Medicine at Crete, Greece. *Int J Mol Med*, Vol. 32. Suppl. 1, S29, October 10, 2013. (海外招待講演) (The Award for an Outstanding Achievement)

[図書] (計 3 件)

- ① 高橋 徹: 四塩化炭素誘発急性肝障害ラットモデルにおける Bach1 mRNA の発現とその意義. 長岡 功, 谷 徹, 横地高志編集, エンドトキシシン・自然免疫研究 18, ー自然免疫における生体防御ペプチドの多様性ー, (株) 医学図書出版, 東京, 2015, pp. 55-58 (分担執筆)
- ② 高橋 徹. ビリルビン/ビリベルジン酸化還元サイクルを利用した急性臓器傷害に対する薬物療法の可能性. 「エンドトキシシン・自然免疫研究 17, エンドトキシシン・自然免疫の展開: 新しい機序, 診断, 応用」. 谷 徹, 横地高志編. 医学図書出版株式会社, 東京, pp. 94-97, 2014 (分担執筆)
- ③ 高橋 徹. 急性臓器不全と酸化ストレス, 「酸化ストレスの医学」, 第 2 章 臨床編 14. 内藤裕二, 豊国伸哉編, 診断と治療社, 東京, pp. 354-361, 2014 (分担執筆)

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

森松 博史 (MORIMATSU, Hiroshi)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 30379797

(3) 研究分担者

荻野哲也 (OGINO, Tetsuya)
岡山県立大学・保健福祉学部・教授
研究者番号: 90252949

(4) 研究分担者

清水裕子 (SHIMIZU, Hiroko)
岡山大学・医学部・客員研究員
研究者番号: 80423284