

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462744

研究課題名(和文)敗血症超急性期モデル動物に対するTEMPO-RNPを用いた酸化ストレス療法

研究課題名(英文)TEMPO-RNP is a new therapeutic agent for acute septic models: the effect of anti-oxidants converted into the micelle

研究代表者

下條 信威 (SHIMOJO, Nobutake)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：20462210

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)：我々は、これまで敗血症モデルラットへの塩酸ランジオロールによる心保護効果および生存率の改善を報告してきた。その心肺腎肝についての効果についての論文報告を行うと共に、酸化ストレスに着目し、TEMPO-RNPと言う酸化ストレス剤をミセル化し病巣に運ぶドラッグ・デリバリー・システムにもその治療効果に期待した。しかし、思うような効果は得られず、可能性を示すに留まった。LPS投与ラットにおいて、対照群と比較し、酸化ストレスの指標であるd-ROM値は有意に上昇した。一方で、pNF-H(血中神経障害マーカー)を測定することにより、敗血症誘発性認知機能障害のメカニズムの解明、その予防法の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We implied that landiolol ameliorated septic-induced cardiomyopathy and the survival rate in septic rats induced by lipopolysaccharide(LPS). We also reported the beneficial effects of landiolol for multiple organs in some papers and paid attention to oxidative stress in sepsis. We expected that TENPO-RNP have the therapeutic roll for sepsis, which is the agent micellized antioxidant and delivered to the focus in patients. But, we could not obtain the results and only showed its possibility. In LPS-induced septic rats, d-ROM, the marker of oxidative stress in blood, increased compared to control rats. On the other hand, pNF-H, the marker of neural damage in blood, could elicit the mechanism and be presentative for sepsis-induced cognitive impairment.

研究分野：集中治療医学 救急医学 循環器学

キーワード：敗血症 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在の敗血症ショック(感染性ショック)の診断と治療

重症敗血症(細菌感染に起因する二次的な急性臓器不全)および敗血症ショック(fluid resuscitationによって回復しない低血圧を伴う重症敗血症)は、毎年世界中で数百万人が罹患しその3人に1人(あるいはそれ以上)が死亡する。いわゆる医療先進国においても未だ敗血症は集中治療領域での死因の第1位である。医学的および社会的にも重大な問題であり、その発生率は増加しつつある(Survival Sepsis Campaign Guidelines 2012)。

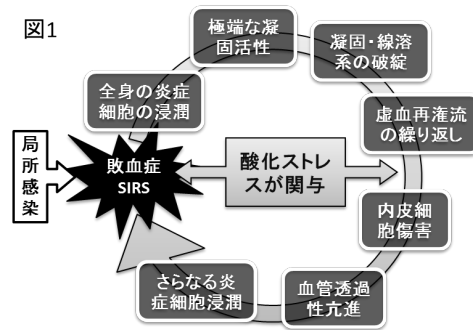
発症数時間以内にSIRS(全身性炎症反応症候群)が引き起こされ、その代償反応の程度と迅速な対応が予後を大きく左右すると考えられる(Early Goal-Directed Therapy)。現行の治療では、適切な抗菌剤を使用するとともに、各臓器の循環と酸素化を保つための十分な細胞外液の補液、それに加え、インスリンによる血糖コントロール、生理的な量のステロイド、血行動態維持のための昇圧剤があげられ、DIC合併例にはrecombinant thrombomodulinやアンチトロンビン製剤の有用性も報告されつつある。しかしながら、大規模検討において、いずれも議論の余地がある。この循環、炎症、凝固の3つのキーワードに密接に関連するのが酸化ストレスである(Salvemini D et al. Free Radic Biol Med, 2002)。超急性期にこの酸化ストレスをコントロールすることが、病態のコントロールに直結する。

(2) 酸化ストレスと炎症、循環、凝固・線溶

敗血症による循環不全から多臓器不全が引き起こされることは知られており、その病態生理学としての研究は各臓器の中大動脈レベルの循環から微小循環へと移ってきている。敗血症超急性期にはすでに各臓器の微小循環の破綻、組織の低酸素状態が見られる。そのことは、敗血症早期に乳酸値が上昇していることから示される。また、酸化ストレスはNF- κ Bを介した炎症メディエータでもあり、その微小循環障害のベースには炎症および凝固・線溶バランスの破綻に伴う血管内皮細胞障害・血管透過性亢進が存在する。それにより虚血再灌流を繰り返すことで、酸化ストレスおよび凝固・炎症が増大し、さらに血管内皮細胞障害が進行する(Gloire et al. Biochem Pharmacol, 2006)(図1)。このサイクルは敗血症発症初期より各臓器ですでに始まっていると考えられる。敗血症において、酸化ス

トレスは初期の炎症細胞浸潤、および再灌流障害をもたらすフリーラジカルの産生においても悪循環を引き起こしている。

図1



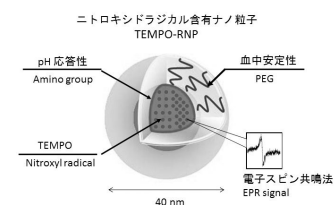
(3) TEMPO-RNPについて、これまでの成果と今後の予定

ニトロキシドラジカル(TEMPO)は、酸化還元反応により触媒のようにフリーラジカルを消去することができる薬剤である。しかし、TEMPOは生体内での半減期が短く、毒性、副作用が臨床応用への課題であった。これらの課題を克服し、病巣において効果的にフリーラジカルを消去させるために、我々は、**TEMPOをミセル化したニトロキシドラジカル含有ナノ粒子(TEMPO-RNP)**を開発した。特徴は以下の①～④の通りである。

- ① **粒径 40-60nm のミセル構造**：粒径の小さいTEMPO-RNPは、破綻した血管壁を透過して組織内へ移行する。
- ② **高い血中滞留性と半減期の延長**：TEMPO-RNPの半減期はTEMPO比べて60倍延長した。
- ③ **pH 応答性による酸性環境下でのTEMPO-RNPの崩壊**：酸性環境下(pH7.2以下)でRNPは崩壊し、TEMPOは効率よくフリーラジカルを消去する。
- ④ **電子スピン共鳴法(Electron paramagnetic resonance :EPR)による検出**：脳梗塞へ集積したTEMPOのフリーラジカル消去作用をEPRシグナルで検出、評価することができる。

我々は、脳及び腎虚血後再灌流障害において、TEMPO-RNPが両組織にニトロキシラジカルを運搬するDDS

としての機能を持ち、病巣で産生されるフリーラジカルを消去することにより組織保護効果を持つこと明らかにした(Marushima et al. Neurosurgery, 2011)。また近年の成果として、TEMPO-RNPの血液中における生体適合性の検査では、異物であるナノ粒子により活性化された血球が互いに接着し、血液の凝固を起こしうる危険性を、TEMPO-RNPが活性酸素種を除去して炎症



性サイトカインの産生を抑えることで抑え、高い血液適合性を持つことを明らかにした (Yoshitomi T et al. Acta Biomater, 2012)。そこで、今回我々は、高い血中滞留性と血液適合性をもつことが証明された TEMPO-RNP が、敗血症で惹起されるフリーラジカルを消去して、炎症性サイトカインの過剰発現を抑えることで、SIRS や DIC による組織障害を防ぐ組織保護効果を持つことを検証する。

2. 研究の目的

敗血症モデルラットを用いて、酸化ストレスを応用した治療法に着目して、新規治療法を検討する。

3. 研究の方法

(1) 敗血症モデル動物実験：

ラット (オス Wistar rat (8 ~ 12 週齢, 250 ~ 300 g)) マウス (オス C56BL/6, 8 ~ 12 週齢)、急性期モデル (time course 1h-72h) を以下の方法で作成する 1) Lipopolysaccharide (LPS) 腹腔内投与、例：15 mg/kg for rat, 20mg/kg for mouse; Escherichia coli serotype 0111:B4; Sigma, St. Louis, MO] 2) Cecal Ligation and Puncture (CLP). 採取検体：心、肺、肝、腎、脳、血液、尿、肺胞洗浄液。

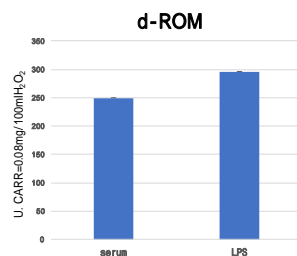
(2) メカニズム解明のための標的分子：

ROS 関連分子：8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, SOD, Caspase-1, d-ROM; 凝固系：Tissue factor, Tissue factor pathway inhibitor, Factor VII, Factor X, thrombin, soluble fibrin, D-dimer, FDP, vWF; Fibrinolytic system: PAI-1; Adhesion molecules: ICAM-1, VCAM-1, E-selectin, P-selectin; 炎症性サイトカイン・ケモカイン類：TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IFN; 低酸素誘導因子類：HIF-1, GLUT1, GLUT4; 血管新生因子類：VEGF, VEGF receptors, Akt, Nitric oxide, eNOS, Angiopoietins, Tie receptors; アポトーシス関連因子：Bax, Bcl-2, Caspases; Vasoactive-peptide: endothelin and its receptors

4. 研究成果

(1) 敗血症と酸化ストレス

LPS 投与ラットにおいて、酸化ストレスの指標である d-ROM 値について、ラットの血中濃度のフラフを示す (右図)。右が LPS 投与群、左が生食 ip 群 (対照群) となる。血中 d-ROM 値は、LPS 投与群 (295.9 \pm 12.8 U.CARR) で対照群 (249.4 \pm 12.6 U.CARR) と比較し有意 (p=0.023) に上昇していた。TEMPO においては、同大学長崎研究室との協力により十分な成果を得られたものを使用することが可能な状態であったが、



薬剤合成のタイミング、投与タイミングなど実際の実験では難しい条件があり、モデルの投与までは至らなかった。

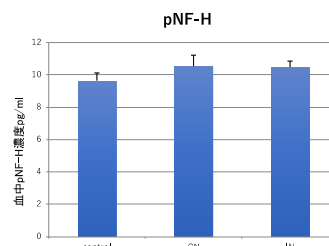
(2) 敗血症性誘発性認知機能障害と pNF-H

一方で我々は、敗血症モデルラットでも敗血症性脳炎を併発することを報告している (Sonobe A et al. J Vasc Med Surg, 2015)。このことから敗血症誘発性認知機能障害 (sepsis-induced cognitive impairment: SICI) でも大脳皮質白質の萎縮性変化が観察されることから神経軸索損傷マーカーであるリン酸化ニューロフィラメント重鎖 (pNF-H) による血清学的診断に着目してきた (Natori, Ogata, Sumitani, et al. Clin Cancer Res 2014)。pNF-H は神経軸索の構造蛋白質であり神経損傷時のみ血液中で検出可能となる。さらに、我々は、術後遷延性認知機能障害のリスク因子である術後せん妄 (早期認知機能障害) についても、pNF-H を用いた血清学的な評価を予備的に行い、ICU せん妄患者の約 70% で血清 pNF-H が陽性となり、ICU せん妄の臨床的重症度と pNF-H が相関することを明らかにした (Inoue, Sumitani, Ogata, Shimojo, et al. Neurosci Lett 2017)。

我々は、ICU を想定した間欠的騒音ストレス負荷によるせん妄モデル動物を開発し空間認知・記憶障害を定量化することに成功しており (下條, 住谷他. 日本集中治療医学会 2016)。対照群、持続騒音ストレス群、間欠的騒音ストレス群の三群間で間欠的騒音ストレス群で有意な血中コルチコステロンの上昇、8 方向迷路による長期記憶の低下を認め、さらに海馬における c-fos の増加を観察している。

このモデル

を用いて、血中 pNF-H 濃度を測定した。今のところ、対照群、持続騒音ストレス群、間欠



的騒音ストレス群を比較し、3 群間における有意な差は見られていないものの (上図)、これに敗血症モデルを加え、酸化ストレスマーカーとともに、pNF-H との関係調べ、そのメカニズムに迫る。

このように ICU 環境における敗血症を伴うせん妄を中心に敗血症誘発性認知機能障害のような精神神経疾患を、血清バイオマーカーを指標として定量的に評価する手法開発、その病態解明を契機として遷延性認知機能障害の病態解明と予防法開発にも繋げていく予定である。

(3) 塩酸ランジオロールを用いた敗血症研究

我々は、敗血症に対する塩酸ランジオロールの効果について、基礎実験を重ねてきた (Yoshino Y et al, Vasc Med Surg, 2015. Seki Y et

al. Life Sci, 2014. Seki Y et al. Vasc Med Surg, 2014. Ogura Y et al. Life Sci, 2014. Matsuishi Y et al. Life Sci, 2015)。臓器別に、心、肺、肝、腎と検討し、特に腎に対する効果が期待され、その成果をまとめて報告した(下條ら、第 44 回日本救急医学会学術集会, 2016.11)。報告するとともに、d-ROM を用いたそのメカニズムの解明を検討中である。特に腎へのランジオロールの効果は、注目するべきであり、酸化ストレスを含んだメカニズムの解明が急がれる。

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 4 件)

(1) Landiolol hydrochloride ameliorates acute lung injury in a rat model of early sepsis through the suppression of elevated levels of pulmonary endothelin-1. Matsuishi Y, Jesmin S, Kawano S, Hideaki S, Shimojo N, Mowa CN, Akhtar S, Zaedi S, Khatun T, Tsunoda Y, Kiwamoto T, Hizawa N, Inoue Y, Mizutani T. Life Science 166: 27-33, 2016. doi: 10.1016/j.lfs.2016.10.010.

(2) Concomitant Down-Regulation of Et1-Etb System and VEGF Angiogenic Signaling in the Frontal Cortex of Endotoxemic Mice: A Heightened Vulnerability to Cerebral Microcirculation in Sepsis. Sonobe A, Jesmin S, Shimojo N, Mowa CN, Islam MM, Khatun T, Oki M, Kawano S, Mizutani T. Vasc Med Surg 3:4, 2015. <http://dx.doi.org/10.4172/2329-6925.1000206>

(3) Landiolol Hydrochloride Ameliorates Liver Injury in a Rat Sepsis Model by Down Regulating Hepatic TNF- α . Yoshino Y, Jesmin S, Islam MM, Shimojo N, Sakuramoto H, Oki M, Khatun T, Suda M, Kawano S, Mizutani T. Vasc Med Surg 3:2, 2015. <http://dx.doi.org/10.4172/2329-6925.1000194>

(4) Landiolol Hydrochloride Normalizes Diminished Levels of Cardiac Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Signaling System Components in Lipopolysaccharide-Induced Sepsis Independent of Inflammatory Markers. Seki Y, Jesmin S, Islam MM, Ogura Y, Oki M, Shimojo N, Khatun T, Sakuramoto H, Kawano S, Mizutani T. Vasc Med Surg 3:2, 2015. <http://dx.doi.org/10.4172/2329-6925.1000193>

〔学会発表〕(計 4 件)

THREE HOURS TREATMENT OF LANDIOLOL HYDRO- CHLORIDE, AN ULTRA-SHORT-ACTING β -BLOCKER, IS NOT EFFECTIVE TO REVERSE ALTERED

PULMONARY ENDOTHELIN-1 SYSTEM IN ACUTE LUNG INJURY IN A RAT MODEL OF EARLY HOURS OF ENDOTOXEMIA. Matsuishi Y, Jesmin S, Sakuramoto H, Shimojo N, Akhtar S, Zaedi S, Khatun T, Kawano S, Mizutani T. , Savannah, Georgia, September 2-5, 2015

敗血症における離床可能予測因子の検討. 五味志津子、下條信威、井上貴昭、柳久子、第 44 回日本集中治療学会学術集会、ロイトン札幌、北海道、2017.3

エンドトキセミアモデルにおけるエンドセリンを介した塩酸ランジオロールの臓器別効果の検討。下條信威、ジェスミンサブリナ、河野了、榎本有希、小山泰明、榎本秀明、丸島愛樹、松本佑啓、井上貴昭、第 44 回日本救急医学会学術集会、プリンスホテル高輪、東京港区、2016.11

脳梗塞急性期の再開通療法における脳組織酸素飽和度と酸化ストレス度評価の有用性。丸島愛樹、小山泰明、榎本有希、下條信威、松村英明、鶴田和太郎、滝川知司、山本哲哉、井上貴昭、松村明、第 44 回日本救急医学会学術集会、プリンスホテル高輪、東京港区、2016.11

〔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

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/clinical-med/e-ccm/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

下條 信威 (SHIMOJO, Nobutake)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：20462210

(2)研究分担者

ジェスミン サブリナ (JESMIN, Subrina)

筑波大学・体育系・研究員

研究者番号：60374261

丸島 愛樹 (MARUSHIMA, Aiki)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：40722525

(3)連携研究者

長崎 幸夫 (NGASAKI Yukio)

筑波大学・数理物質系・教授

研究者番号：90198309