



早産児敗血症においてヘムオキシゲナーゼー1が果たす役割の解明(助成研究報告)

藤岡, 一路

(Citation)

神戸大学医学部神緑会学術誌, 33:61-64

(Issue Date)

2017-08

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.24546/81009979>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/81009979>



早産児敗血症において ヘムオキシゲナーゼ-1が果たす役割の解明

神戸大学大学院医学研究科内科系学講座 小児科学分野

藤岡 一 路 (平成16年卒)

要 旨

背景 早産児敗血症は致死率が高く、有効な治療法もない。本研究では、早産児マウス敗血症モデルを作成し、ストレス応答蛋白であるヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) の保護効果を検討した。

方法 成獣マウスの虫垂内容物から Cecal Slurry (CS) を作成し、免疫学的にヒト早産相当の4日齢マウスに投与し、早産児敗血症モデルを作成した。次に、40%致死量の CS 2.0mg/g 投与 (CS) 群と対照群で、敗血症重症度を比較した。最後に、3日齢マウスに HO-1 誘導薬 (Heme) を投与し、24時間後に敗血症を作成し (H-CS 群)、保護効果を検討した。

結果 CS 群では、全身臓器の細菌定着、血液学的異常、体重増加不良に加え、肝臓免疫関連遺伝子発現の増加を認めた。一方、H-CS 群では死亡率の改善 (6%) に加え、敗血症により誘導される遺伝子発現の抑制を認めた。

結論 HO-1誘導は免疫制御を介して、早産児敗血症防御に寄与する。

Key Words

早産児
敗血症
新生児敗血症
モデルマウス
敗血症モデル
Cecal Slurry
ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1)

緒 言

新生児敗血症は、全身性の細菌感染と続発する多臓器不全を本態とする致死性の疾患である。とりわけ、宿主防御機構が正期産児と比して未熟な早産児においては、高い致命率を認め、また生存し得たとしても脳機

能に重篤な障害を残すことが多い。早産児敗血症の病因は、感染侵襲に対する免疫応答の破綻に由来する全身性炎症反応に加え、酸化ストレス、アポトーシスなどの複数の侵襲因子の関与が示唆されている。しかし、近年まで至適な動物モデルの作成が困難であったことから、その病態生理は十分解明されていない¹⁾。また、成人領域においては血液浄化療法などの新たな敗血症治療が導入されつつあるが、早産児においては未だ抗菌薬を中心とした支持療法が主体であり、この難治性疾患の病態解明と新規治療法開発は喫緊の課題である。

以前より、敗血症研究においては盲腸結紮穿孔 (Cecal ligation puncture, CLP) モデルが標準モデルとして用いられてきた。しかし、手術を要し高侵襲のため新生仔マウスへの応用は困難であった。一方、2007年に Wynn らにより成獣マウスから摘出した虫垂内容物から糞便懸濁液 (Cecal slurry, CS) を作成し、対象マウスに腹腔内投与することで腹膜炎性敗血症を誘導する CS モデルが開発され、新生仔マウス (1 週齢: ヒト正期産相当) を用いた新生児敗血症モデルの作成が可能となった²⁾。更に、2014年に Starr らにより新たな CS 保存法が報告され、長期間 (-6 か月) の冷凍保存が可能となったため、全ての実験において同一起源の CS を使用することが可能となり、術者間誤差が問題となる CLP と比して高い精度の実験再現性が達成可能となった³⁾。

ヘムオキシゲナーゼ (Heme Oxygenase, HO) は、ビリルビン代謝の律速段階酵素である一方で、その誘導型アイソフォームである HO-1 はストレス応答蛋白であり、ストレス環境下においてビリベルジン (抗酸化作用)、CO (抗アポトーシス・抗炎症作用) 産生を介して、多様な組織保護作用を発揮する⁴⁾。また、生体内での HO-1 発現は胎児・新生児期に組織特異的に大きく変動することがわかっており、HO-1 は新生児

疾患発症における重要な制御因子と目されており、現在までに新生児慢性肺疾患、新生児壊死性腸炎などの動物モデルにおいてその保護作用が報告されている⁵⁾。

しかし、現在まで新生児および早産児敗血症におけるHO-1の働きに関する報告はない。一方、小児敗血症患者において、HO-1誘導性のHO-1遺伝子多型が防御的に作用するとの報告がある⁶⁾。そこで我々は、CS法を用いて早産児マウス敗血症モデルを作成し、早産児敗血症におけるHO-1誘導の防御効果を明らかにすることを試みた⁷⁾。

対象・方法

本研究課題はスタンフォード大学 (Protocol#30910) および神戸大学 (P160608) の動物実験委員会の承認のもと行われた。

CS 保存液の作成

既報³⁾に基づき、成獣マウスから虫垂を摘出し、その内容物を15%glycerol-PBSに溶解してCS (100mg/mL)を作成し、1 mL毎に分注し-80℃で保存した。

早産児マウス敗血症モデルの作成

異なる用量のCS保存液 (1.0-4.0mg/g body weight, BW) を免疫学的にヒト早産相当である4日齢のFVB/nマウスに腹腔内投与し、投与後7日間の死亡率を検討し、ヒト早産児敗血症の致死率が約40%⁸⁾であることから、40%致死量を決定した。

早産児マウス敗血症モデルにおける敗血症重症度の検討

敗血症重症度を評価する目的で、CS 2.0mg/g BW投与 (CS) 群と Vehicle (Veh) 群において、体重増加、組織細菌数、血液学的異常、血液生化学異常、組織学的異常、免疫関連遺伝子発現を比較検討した (図1)。

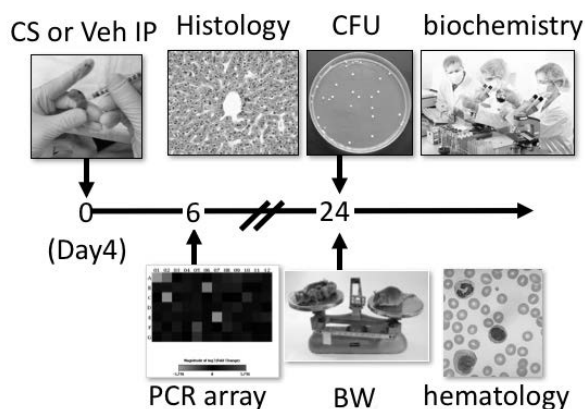


図1 早産児マウス敗血症モデルの実験プロトコール

Hemeを用いた薬物的HO-1誘導モデルマウスの作成

次に、確立されたHO-1誘導薬であるHeme (30 μ mol/kg)⁹⁾ または Vehicle (Veh) を、3日齢の野生型マウスに皮下投与し、24時間後 (4日齢) に、肝臓HO活性を測定した。

早産児敗血症における薬物的HO-1誘導の保護効果の検討

ついで、早産児敗血症におけるHO-1誘導効果を検討する目的で、Heme投与後24時間 (4日齢) にCS (2.0mg/g BW) を腹腔内投与し敗血症を誘導し (H-CS群)、敗血症重症度をCS群と比較検討した (図2)。

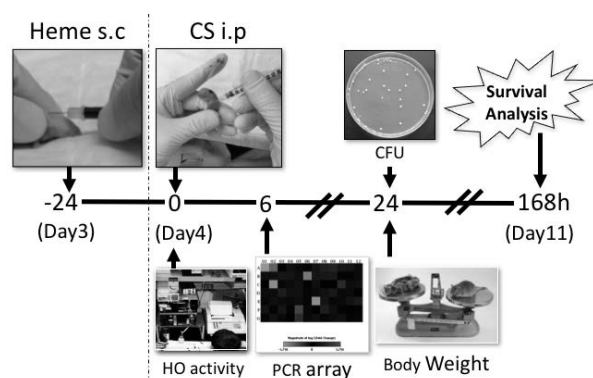


図2 早産児マウス敗血症モデルにおける薬物的HO-1誘導の実験プロトコール

結果

死亡率: CS群では用量依存性の死亡率増加 (1.0mg/g 0%, 1.5mg/g 8%, 2.0mg/g 41%, 3.0mg/g 75%, 4.0mg/g 100%) を認め、40%致死量 (LD40) は2.0mg/g BWであった。

体重変化率: CS投与24時間後の体重変化を比較すると、CS群はVeh群と比して、有意な体重増加の停滞を認めた (-2.1 ± 6.2 , vs. 21.5 ± 8.2 , $n > 20$, $P < 0.01$)。

組織細菌量: CS投与24時間後に肝臓、肺、脾臓を採取し、ホモジネートを作成し、Brain Heart Infusion培地を用いて37度で24時間培養し組織細菌量を測定した。その結果、肝・肺・脾臓の全臓器において、全例で細菌定着を認めた。

全血算所見: CS投与24時間後に血液を採取し、全血算を測定した。その結果、CS群においてVeh群と比して、有意な白血球 (2821 ± 931 vs. 6298 ± 1806 per μ L, $P < 0.01$)、血小板 ($204 \pm 82 \times 10^3$ vs. $613 \pm 118 \times 10^3$ per μ L, $P < 0.01$)、好中球 (751 ± 511 vs. 2891 ± 910 per μ L, $P < 0.01$)、リンパ球減少 (1854 ± 849 vs. 2937 ± 1232 per μ L, $P < 0.05$) を認めた。

血液生化学所見: CS投与24時間後に血液を採取し、

血清分離後に、AST, BUN を測定した。その結果、CS 群と Veh 群の二群間で、AST (229 ± 95 vs. 71 ± 52 U/L, $P = 0.12$) および BUN (65.5 ± 26.8 vs. 52.0 ± 5.4 mg/dL, $P = 0.56$) に有意差を認めなかった。

組織所見：CS 投与24時間後に、敗血症における主要障害臓器である肝臓、肺を採取し、HE 染色で組織学的に検討した。肝障害の指標として肝細胞空胞化を、肺障害の指標として肺泡隔壁の菲薄化を比較検討したが、CS 群と Veh 群の二群間で、組織学的肝障害および肺障害に有意差を認めなかった。

免疫関連遺伝子発現：CS 投与6時間後に安楽死し、肝臓を採取し RNA を抽出した。抽出した RNA を用いて PCR アレイ (RT² ProfilerTM PCR アレイ (PAMM-052ZA-12) を行い、網羅的に Innate/Adaptive Immune Responses 関連遺伝子発現を解析し、CS 群と Veh 群で比較検討した。結果として、CS 群の肝臓では Veh 群と比較して、サイトカイン (Ccl5, Cxcl10, IL-1a, IL-1b, Tnf, Ifng), パターン認識受容体 (Cd14, Nod2, Tlr2, Nlrp3), 免疫調節遺伝子 (Cd40, Icam1, Mx1, Myd88, Nfkb1a) 発現の有意な増加を認めた。

薬物的 HO-1 誘導モデル：Heme による HO-1 誘導効果を確認する目的で、ガスクロマトグラフィーにより肝臓 HO 活性を測定した。結果として、Heme 投与24時間後の肝臓 HO 活性 (496 ± 85 , $n = 10$) は Veh 群 (302 ± 41 , $n = 23$, $P < 0.001$) と比して64%増加していた。

薬物的 HO-1 誘導の敗血症死亡率への影響：

H-CS 群では、CS 群と比較して有意な死亡率の改善 ($41 \rightarrow 6\%$, $p < 0.005$) を認めた。

薬物的 HO-1 誘導の組織細菌数への影響：

H-CS 群では、CS 群と比較して肝臓・肺の組織細菌数には差を認めなかったが、脾臓においては H-CS 群で有意な細菌数の減少を認めた。

薬物的 HO-1 誘導の体重増加への影響：

H-CS 群では、CS 群と比較して有意な体重増加の改善を認めた (7.0 ± 10.0 , vs. -2.1 ± 6.2 , $n > 20$, $P < 0.001$)。

薬物的 HO-1 誘導の免疫関連遺伝子発現への影響：

H-CS 群では、CS 群と比較して肝臓における炎症性サイトカイン遺伝子 (Ccl5, Cxcl10, IL-1b, Ifng) および免疫調節遺伝子 (Mx1, Nod2) 発現の有意な減少を認めた。

考 察

我々の作成した早産児マウス敗血症モデルでは、CS 用量依存性の死亡率増加、体重減少、白血球・血

小板減少、肝臓における炎症性サイトカイン遺伝子の発現増加を認め、ヒト早産児敗血症の病態をよく反映しており、その病態解析に有用であると考えられた。

Heme による薬物的 HO-1 誘導は、敗血症死亡率を改善させ、末梢血好中球を増加し、体重増加を改善し、脾臓細菌数を減少させた。

また、薬物的に HO-1 を誘導することで、敗血症により誘導される炎症性サイトカインおよび免疫関連遺伝子発現を抑制することができた。

結 語

早産児マウス敗血症モデルは、ヒト早産児敗血症の病態をよく反映した。HO-1 誘導は敗血症重症度の改善に加え、炎症性サイトカイン発現を抑制した。

なお、本研究の成果は米国の科学雑誌「Shock」に掲載された⁷⁾。

謝 辞

本研究に助成いただきました神緑会に深謝いたします。

文 献

1. Wynn JL, Wong HR. Pathophysiology and treatment of septic shock in neonates. Clinics in perinatology. 2010;37(2):439-79.
2. Wynn JL, Scumpia PO, Delano MJ, et al. Increased mortality and altered immunity in neonatal sepsis produced by generalized peritonitis. Shock. 2007;28(6):675-83.
3. Starr ME, Steele AM, Saito M, et al. A new cecal slurry preparation protocol with improved long-term reproducibility for animal models of sepsis. PLoS One. 2014;9(12):e115705.
4. Maines MD. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 1988;2(10):2557-68.
5. Schulz S, Wong RJ, Jang KY, et al. Heme oxygenase-1 deficiency promotes the development of necrotizing enterocolitis-like intestinal injury in a newborn mouse model. American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology. 2013;304(11):G991-G1001.

6. Vazquez-Armenta G, Gonzalez-Leal N, M JV-dIT, et al. Short (GT)n microsatellite repeats in the heme oxygenase-1 gene promoter are associated with antioxidant and anti-inflammatory status in Mexican pediatric patients with sepsis. The Tohoku journal of experimental medicine. 2013;231(3):201-9.
7. Fujioka K, Kalish F, Zhao H, et al. Induction of Heme Oxygenase-1 Attenuates the Severity of Sepsis in a Non-Surgical Preterm Mouse Model. Shock. 2017;47(2):242-50.
8. Stoll BJ, Hansen NI, Sanchez PJ, et al. Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and E. coli disease continues. Pediatrics. 2011;127(5):817-26.
9. Fujioka K, Kalish F, Wong RJ, et al. Inhibition of heme oxygenase activity using a microparticle formulation of zinc protoporphyrin in an acute hemolytic newborn mouse model. Pediatr Res. 2016;79(2):251-7.

あゆみ製薬は、
リウマチ・整形外科領域の
スペシャリティファーマに。



〔効能・効果〕、〔用法・用量〕、
〔警告、禁忌、原則禁忌を含む使用上の注意〕等
については、添付文書をご参照ください。

〔資料請求先〕  あゆみ製薬株式会社
東京都中央区銀座四丁目12番15号

MPA4@M-17CNK02

あゆみ製薬のおもな製品

抗リウマチ剤 薬価基準収載
日本薬局方 ブシラミン錠
劇薬、処方箋医薬品（注意－医師等の処方箋により使用すること）

リマチル[®]錠 50mg・100mg

製造販売元 あゆみ製薬株式会社

抗リウマチ剤 薬価基準収載
処方箋医薬品（注意－医師等の処方箋により使用すること）

アザルフィジブ[®]EN錠 250mg・500mg

サラソスルファピリジン腸溶錠 発売 あゆみ製薬株式会社 製造販売元 ファイザー株式会社

抗リウマチ剤 薬価基準収載
劇薬、処方箋医薬品（注意－医師等の処方箋により使用すること）

メトレート[®]錠 2mg

メトトレキサート錠 製造販売元 あゆみ製薬株式会社

免疫抑制剤 薬価基準収載
劇薬、処方箋医薬品（注意－医師等の処方箋により使用すること）

**タクロリムス錠 0.5mg・1mg・1.5mg
3mg・5mg「あゆみ」**

タクロリムス錠 製造販売元 あゆみ製薬株式会社

解熱鎮痛剤 薬価基準収載

劇薬（錠500のみ）

カロナール[®]錠 200・300・500

アセトアミノフェン製剤 製造販売元 あゆみ製薬株式会社

関節機能改善剤 薬価基準収載
日本薬局方 精製ヒアルロン酸ナトリウム注射液
処方箋医薬品（注意－医師等の処方箋により使用すること）

ヒアロス[®]関節注 25mg

製造販売元 あゆみ製薬株式会社