

Title	敗血症モデルラットにおける(プロ)レニン受容体阻害薬の有効性に関する検討
Sub Title	The effect of the prorenin receptor blocker on sepsis in lipopolysaccharide induced rat model
Author	岡村, 明彦(Okamura, Akihiko) 北川, 雄光(Kitagawa, Yuko) 竹内, 裕也(Takeuchi, Hiroya) 福田, 和正(Fukuda, Kazumasa)
Publisher	
Publication year	2016
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2015. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>近年, 組織特異的に発現調節されている組織レニン・アンジオテンシン系(RAS系)の存在が明らかとなっている。リポポリサッカライド投与によるラット敗血症モデルを作成し, (プロ)レニン受容体ブロッカー(PRRB)の投与実験を行い, PRRB投与群とcontrol群とを比較し, その有効性を検討した。尾静注および腹腔内投与によるラット敗血症モデルのいずれにおいても, PRRB投与による有意な生存率の改善は認められなかった。重篤な敗血症モデルにおいてはPRRB投与単独では循環中のRAS系を十分に抑制できない可能性があることや, PRRBの効果の発揮にはターゲットとなる臓器が必要である可能性が示唆された。</p> <p>The renin-angiotensin system (RAS) affects inflammatory responses during sepsis. Nonproteolytic activation of prorenin by the prorenin receptor has recently been shown to stimulate the tissue RAS. We investigated the effect of the prorenin receptor blocker (PRRB) on sepsis in lipopolysaccharide (LPS) induced rat model of systemic inflammation. PRRB did not improve survival after LPS injection both intravenously and intraperitoneally. In the severe septic model, PRRB might not have enough power to inhibit circulating RAS. To attenuate inflammation by PRRB, target organ/tissue might be needed.</p>
Notes	研究種目: 若手研究(B) 研究期間: 2014 ~ 2015 課題番号: 26861532 研究分野: 医歯薬学
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_26861532seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_26861532seika</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861532

研究課題名(和文)敗血症モデルラットにおける(プロ)レニン受容体阻害薬の有効性に関する検討

研究課題名(英文)The effect of the prorenin receptor blocker on sepsis in lipopolysaccharoid induced rat model

研究代表者

岡村 明彦(Akihiko, Okamura)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20645783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、組織特異的に発現調節されている組織レニン・アンジオテンシン系(RAS系)の存在が明らかとなっている。リポポリサッカライド投与によるラット敗血症モデルを作成し、(プロ)レニン受容体ブロッカー(PRRB)の投与実験を行い、PRRB投与群とcontrol群とを比較し、その有効性を検討した。尾静注および腹腔内投与によるラット敗血症モデルのいずれにおいても、PRRB投与による有意な生存率の改善は認められなかった。重篤な敗血症モデルにおいてはPRRB投与単独では循環中のRAS系を十分に抑制できない可能性があることや、PRRBの効果の発揮にはターゲットとなる臓器が必要である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The renin-angiotensin system (RAS) affects inflammatory responses during sepsis. Nonproteolytic activation of prorenin by the prorenin receptor has recently been shown to stimulate the tissue RAS. We investigated the effect of the prorenin receptor blocker (PRRB) on sepsis in lipopolysaccharoid (LPS) induced rat model of systemic inflammation. PRRB did not improve survival after LPS injection both intravenously and intraperitoneally. In the severe septic model, PRRB might not have enough power to inhibit circulating RAS. To attenuate inflammation by PRRB, target organ/tissue might be needed.

研究分野：医歯薬学

キーワード：敗血症 レニンアンジオテンシン プロレニン (プロ)レニン受容体

### 1. 研究開始当初の背景

循環血液中のレニン・アンジオテンシン系 (Renin-Angiotensin System : RAS)系は血圧や水・電解質の恒常性維持における中心的役割を果たしていることが古くから知られている。近年、組織特異的に発現調節されている組織RAS系の存在が明らかとなり、臓器保護効果の観点から注目されている。

2002年に発見された1回膜貫通型受容体である(プロ)レニン受容体は、重要臓器に広く分布し、レニンの前駆体で従来不活性と考えられていたプロレニンの立体構造を変化させてレニン同等のレニン活性を発揮させる。(プロ)レニン受容体は血漿中には存在せず組織内のみ存在するため、組織RAS系が亢進した病態の病態形成に重要な役割を持っていると考えられている。これまでに(プロ)レニン受容体結合に対する競合的阻害薬である(プロ)レニン受容体プロックア (Prorennin Receptor Blocker : PRRB)、およびヒト(プロ)レニン受容体遺伝子トランスジェニックラットが開発され、糖尿病や本態性高血圧等の慢性病態において、(プロ)レニン受容体依存性に組織RAS調節が亢進し、その治療にPRRBが有効であることを報告されている。また、(プロ)レニン受容体は組織RAS系の活性化だけでなく、アンジオテンシン非依存性MAPK経路を活性化させることによっても、臓器障害の発症に関与していることを示されている。

当教室では、ラット盲腸結紮穿孔 (Cecal Ligation and Puncture : CLP)腹膜炎モデルにおいてPRRBの投与実験を施行し、その有用性を報告した。この研究では、PRRB投与により生存率の改善、CLP 6時間後の血清サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ )およびHMGB1上昇の抑制、また腹腔内マクロファージの(プロ)レニン活性の抑制が確認された。また経気管的散布な Lipopolysaccharoid(LPS)散布による急性肺

障害モデルラットを作成し、肺障害におけるPRRBの投与の有用性を報告した。この研究では、PRRB投与により気管支肺胞洗浄液中の細胞数・好中球数・サイトカイン値が有意に減少し、また病理組織学的にも肺組織の炎症・浮腫の所見が有意に減少した。これらの事項からPRRBにより、腹膜炎や肺障害などの急性炎症病態を改善している可能性が示唆された。

### 2. 研究の目的

本研究はこれらの研究成果をさらに発展させ、代表的な敗血症モデルである、LPS静注によるエンドトキシン血症モデルを作成し、PRRB投与により組織RAS系を抑制し、敗血症性臓器不全の典型である急性肺損傷の病態を改善できることを示すことを目的とした。有効性が示されれば、(プロ)レニン受容体が敗血症および敗血症性臓器不全(特に急性肺障害)治療のターゲットとなり、新たな治療戦略・治療薬開発につながることを期待される。

### 3. 研究の方法

LPS誘発敗血症モデルラットにPRRBを投与して、control群と比較して、その有効性を検討した。

(1) 実験動物：Sprague-Dawleyラット(7-9週齢，雄，270-300g)を使用した。

(2) PRBB投与：PRRB(NH<sub>2</sub>-RILLKKMPSV-COOH)はペプチドであるため生体内で分解されやすく半減期が短いため、LPS静注1週間前にketamine(20mg/kg)筋注にて麻酔し、浸透圧ミニポンプ(Alzet, model 2002)を肩甲骨間に埋没し、PRRBを1mg/kg/day1週間持続皮下注した。投与量については、PRRBが(プロ)レニン受容体を競合的に阻害することから十分な抑制効果発揮のためにリガンドであるプロレニンの濃度を十分に超える濃度を生体内で達し得る量を投与する必要があったため、前述のCLPラット中の血漿プロレニン活性値を基

にして1 mg/kg/day とした。Controlとして、PRRB のアミノ酸配列をランダム化した scramble peptide (NH<sub>2</sub>- PLMKRRLSIK -COOH) を用いた。PRRB およびscramble peptide は5%酢酸に溶解した。

(3) LPS 尾静注による敗血症モデルの作成：上記ラットに大腸菌由来のLPS(Sigma, St. Louis, MO) , 7.5mg/kgを尾静脈より静注して、敗血症モデルを作成した。静注量による生存率の違いを確認するため、10mg/kgを尾静注するモデルも作成し下記の検討を行った。

(4) 生存分析：PRRB 群, control 群を各n=12程度で作製し、LPS 静注後の生存分析を行った。観察期間は1週間とし、24時間ビデオで監視して生存確認を行った。

(5) モデルの変更：上述の尾静注モデルでは、重症な敗血症モデルの作成には至っていたが、急激な循環不全により早期に死亡する個体が多かったため、モデルの変更が妥当と考えられた。上述の当教室における先行研究から、PRRB投与により局所の炎症所見の改善が得られたことから、尾静注モデルから腹腔内投与モデルに変更した。

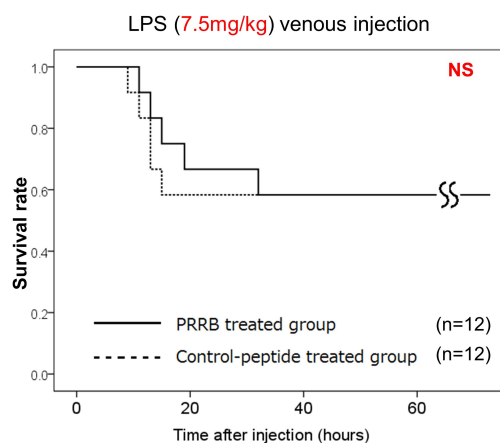
(6) LPS 腹腔内投与による敗血症モデルの作成：上記PRRB投与ラットに大腸菌由来のLPS(Sigma, St. Louis, MO) , 10mg/kgを腹腔内投与して敗血症モデルを作成し、同様に生存分析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 尾静注モデルにおける生存分析

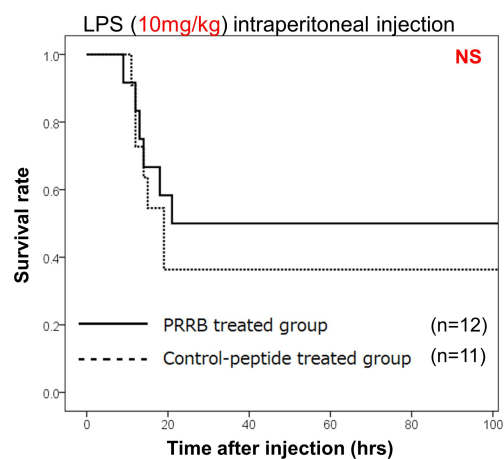
7.5mg/kg 尾静注モデルにおいては、PRRB 群(n=11)の生存期間平均値は113時間、Control群(n=12)は103時間で、両群間に明らかな有意差は認めなかった(p=0.68)。10mg/kg 尾静注モデルにおいても、PRRB 群(n=8)の生存期

間平均値は59時間、Control群(n=8)は50時間であり、両群間に有意差は認めなかった。同モデル作成後1週間後の生存率は28%であり、重症な敗血症モデルの作成には至っていたが、急激な循環不全により早期に死亡する個体が多かった。



##### (2) 腹腔内投与モデルにおける生存分析

10mg/kg 腹腔内投与においては、PRRB 群(n=12)の生存期間平均値は91時間、Control群(n=11)は71時間とPRRB群での生存率の改善傾向をみたが、両群間に統計学的な有意差は認められなかった。同モデル作成後1週間後の生存率は43%であり、10mg/kg 尾静注モデルよりやや軽症なモデルであった。PRRBによる一定の効果はあるものと考えられたが、明らかな有用性は認められなかった。



##### (3) 考察

今回の実験では組織 RAS 系を抑制する PRRB

投与での敗血症に対する有用性は認められなかった。その原因として、組織 RAS 系を抑制する PRRB では、重篤な敗血症モデルにおける循環中の RAS 系を十分に抑制することができない可能性があることや、今回使用したモデルが敗血症を引き起こす原因となる感染巣(臓器や組織)がないことが挙げられた。PRRB の効果の発揮にはターゲットとなる臓器が必要である可能性が示唆され、今後さらに標的臓器における PRRB の有用性と作用機序の解明を続けていく。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

なし

〔学会発表〕(計 0 件)

なし

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

岡村 明彦 (Akihiko Okamura)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号: 20645783

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

北川 雄光 (Yuko Kitagawa)

竹内 裕也 (Hiroya Takeuchi)

福田 和正 (Kazumasa Fukuda)