

Title	低酸素応答の活性化を介した新たな敗血症性心筋症治療戦略の検討
Sub Title	Inhibition of prolyl hydroxylase improves myocardial dysfunction following endotoxin shock via activation of kynurenic acid production
Author	伊原, 奈帆(Ihara, Naho) 南嶋, しづか(Minamishima, Shizuka)
Publisher	
Publication year	2019
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2018. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>プロリン水酸化酵素 (PHD) 阻害剤がLPS誘発性敗血症モデルの生存率を改善するのは、敗血症性心筋症の軽減効果であると予測し検討した。まずPHD阻害剤を投与することで生存率が改善し、左室機能不全が軽減されることを確認した。炎症性サイトカインの変化はみられなかったため、そのほかのメカニズムを考えキヌレン酸に注目した。血漿中キヌレン酸濃度を測定したところ、PHD阻害剤を投与した群で有意に増加していることが確認された。次に、LPS誘発性敗血症マウスにキヌレン酸を投与し、左室機能の変化を測定したところ左室機能が劇的に改善した。最後に、キヌレン酸投与による生存率を観察したところ投与群で著しく改善した。</p> <p>Inhibition of prolyl hydroxylase (PHD) has been reported to improve the survival rate of mice with endotoxin shock by reduction of the blood lactate level, or and ameliorate cardiac ischemia reperfusion injury, which led us examine the effect of PHD inhibition on Sepsis-induced cardiomyopathy. Adult male mice were intraperitoneally injected with 35 mg/kg of lipopolysaccharide (LPS) and treated with either PHD inhibitor FG-4592 (25 mg/kg) or vehicle by oral gavage. Administration of FG-4592 markedly improved survival rate 7 days after LPS injection, and ameliorated left ventricular dysfunction due to LPS-induced endotoxin shock at 24 hours after LPS injection. Serum level of KYNA was increased upon FG-4592 treatment in mice whereas circulating cytokines levels were not affected. Administration of KYNA promptly improved cardiac dysfunction due to LPS-induced endotoxin shock. Moreover, KYNA administration immediately after LPS reduced mortality on mice with endotoxin shock.</p>
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2016～2018 課題番号：16K20400 研究分野：麻酔学
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K20400seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K20400seika</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

令和元年6月19日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20400

研究課題名(和文) 低酸素応答の活性化を介した新たな敗血症性心筋症治療戦略の検討

研究課題名(英文) Inhibition of Prolyl Hydroxylase Improves Myocardial Dysfunction Following Endotoxin Shock via Activation of Kynurenic Acid Production

研究代表者

伊原 奈帆 (Ihara, Naho)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：70573260

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)：プロリン水酸化酵素(PHD)阻害剤がLPS誘発性敗血症モデルの生存率を改善するのは、敗血症性心筋症の軽減効果であると予測し検討した。まずPHD阻害剤を投与することで生存率が改善し、左室機能不全が軽減されることを確認した。炎症性サイトカインの変化はみられなかったため、そのほかのメカニズムを考えキヌレン酸に注目した。血漿中キヌレン酸濃度を測定したところ、PHD阻害剤を投与した群で有意に増加していることが確認された。次に、LPS誘発性敗血症マウスにキヌレン酸を投与し、左室機能の変化を測定したところ左室機能が劇的に改善した。最後に、キヌレン酸投与による生存率を観察したところ投与群で著しく改善した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PHD阻害剤(FG-4592)はエンドトキシンショック後の心機能不全を軽減し、生存率を改善した。PHD阻害剤の心筋保護作用には抗炎症効果だけではなく、血中キヌレン酸の増加が関与していることが示唆された。キヌレン酸はエンドトキシンショック後の心機能不全を軽減し、生存率を改善した。PHD阻害剤やキヌレン酸は敗血症性心筋症の新たな治療戦略の一つになりうるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Inhibition of prolyl hydroxylase (PHD) has been reported to improve the survival rate of mice with endotoxin shock by reduction of the blood lactate level, or and ameliorate cardiac ischemia reperfusion injury, which led us to examine the effect of PHD inhibition on sepsis-induced cardiomyopathy. Adult male mice were intraperitoneally injected with 35 mg/kg of lipopolysaccharide (LPS) and treated with either PHD inhibitor FG-4592 (25 mg/kg) or vehicle by oral gavage. Administration of FG-4592 markedly improved survival rate 7 days after LPS injection, and ameliorated left ventricular dysfunction due to LPS-induced endotoxin shock at 24 hours after LPS injection. Serum level of KYNA was increased upon FG-4592 treatment in mice whereas circulating cytokines levels were not affected. Administration of KYNA promptly improved cardiac dysfunction due to LPS-induced endotoxin shock. Moreover, KYNA administration immediately after LPS reduced mortality on mice with endotoxin shock.

研究分野：麻酔学

キーワード：低酸素応答 敗血症性ショック 敗血症性心筋症 プロリン水酸化酵素阻害剤 キヌレン酸

1. 研究開始当初の背景

重症敗血症の発症数は、世界で年間 2000 万例と推定されている。敗血症性心筋症は敗血症における心筋障害で、左・右両心室の拡張・収縮不全を呈し、生命予後に多大な影響を及ぼす。敗血症性心筋症の発生機序として、サイトカイン・一酸化窒素・ミトコンドリアの機能障害など虚血再灌流障害に類似した原因が報告されているものの、有効な治療法は未だない。

近年、炎症に対する生体反応と HIF (Hypoxia-inducible factor) 依存的低酸素応答との関係が明らかになりつつある。炎症部位は、微小循環の破綻や浸潤した免疫系細胞による酸素需要の増大のため、低酸素に陥る。するとプロリン水酸化酵素 (PHD: prolyl hydroxylase) は酵素活性を失い、低酸素応答を司る転写因子 HIF が活性化される。PHD 阻害剤は組織の酸素濃度に関わらず低酸素応答を惹起し、LPS 誘発性敗血症モデルの生存率を改善すること、さらに、このメカニズムに TNF $\alpha$  の抑制や IL-10 の増加が関与していると報告されている。

2. 研究の目的

我々は PHD 阻害剤が敗血症性心筋症に及ぼす影響について検討した。

3. 研究の方法

すべての実験において、8~12 週齢の野生型雄マウスを用い、LPS 35 mg/kg を腹腔内注射しエンドトキシンショックモデルを作製した。

はじめに、PHD 阻害剤の有効性を確認するため、PHD 阻害剤 FG-4592 を LPS 投与 4 時間前と投与直後に、25 mg/kg ずつ、gavage 法を用いて経口投与し、生存率を観察した。LPS 投与 7 日後の生存率は vehicle 群 (n=15) で 27% であったのに対し、FG 群 (n=18) では 72% と著明に改善した。

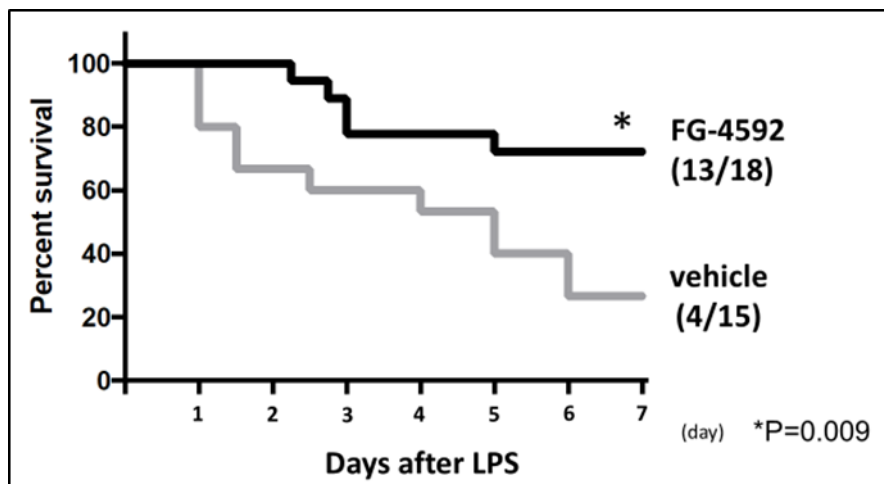


図 1: FG-4592 投与群、vehicle 群の生存率

続いて、LPS 投与 24 時間後に左室機能を測定した。LPS 投与によって左室機能は収縮能、拡張能ともに著しく障害されたが、PHD 阻害剤 FG4592 を投与すると左室機能不全が軽減された。

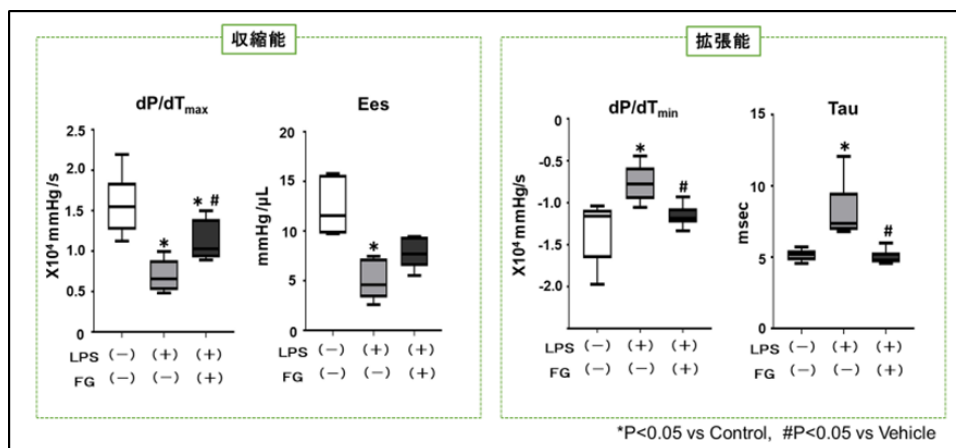


図 2: LPS 投与 24 時間後の左室機能

次に、PHD 阻害剤による心筋保護効果のメカニズムを明らかにするため、転写因子 HIF が標的

臓器で活性化されていることを RT-PCR で確認した。LPS 投与 2 時間後に PHD 阻害剤で活性化される転写因子 HIF の標的遺伝子を心筋・肝臓・腎臓や血液を採取し、RT-PCR, ELISA による解析を行った。

心筋・肝・腎で転写因子 HIF の標的遺伝子が有意に増加していたことから、FG4592 は低酸素応答を全身に惹起していることが確認された。(図 3)

IL-10、IL-6、TNF $\alpha$  いずれにおいても有意差はなかった。(図 4)

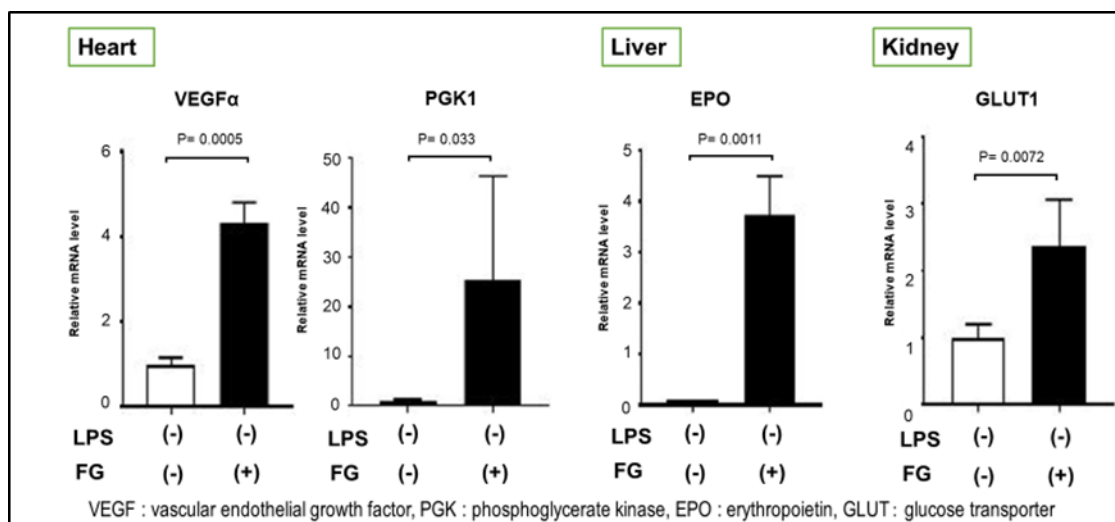


図 3: FG-4592 投与群、vehicle 群の RT-PCR 結果

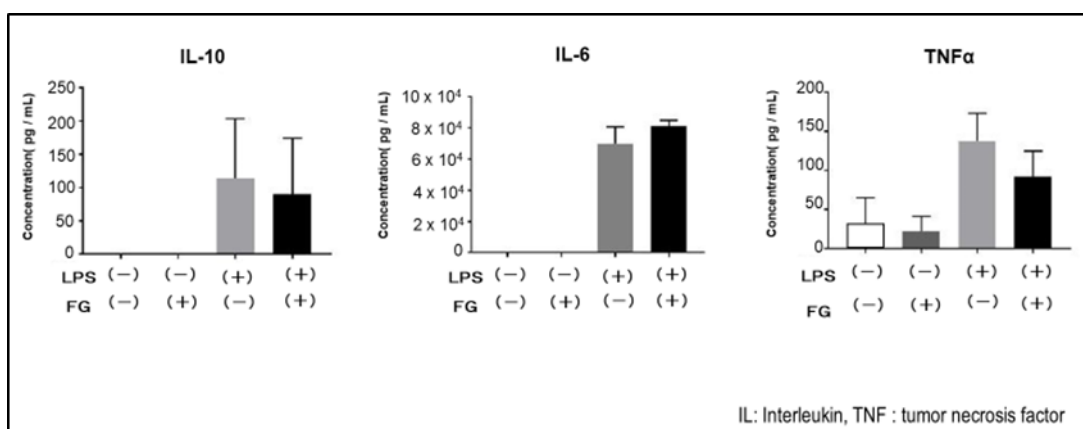


図 4: ELISA 結果

これらのことから、PHD 阻害剤による敗血症性心筋障害に対する心筋保護作用のメカニズムは、炎症性サイトカインの抑制や抗炎症性サイトカインの増加以外にあるのではないかと考えた。近年、PHD 阻害剤の虚血再灌流障害に対する心筋保護作用のメカニズムが Olenchock<sup>1)</sup>らによって明らかにされた。それによると、骨格筋で PHD2 を阻害すると、PHD の補助基質である  $\alpha$ -ケトグルタル酸が蓄積する。トリプトファン代謝のキヌレニン経路において、最終代謝産物の一つであるキヌレン酸産生が活性化される。キヌレン酸は血流に放出され、心臓に到達し、心筋保護作用を示すということである。

このメカニズムが本研究のエンドトキシンショックによる心筋保護効果のメカニズムと言えるかどうかを確認するため、LPS 投与 2 時間後の血漿中キヌレン酸濃度を ELISA で測定した。すると、FG を投与した群で有意にキヌレン酸が増加していることが確認された。

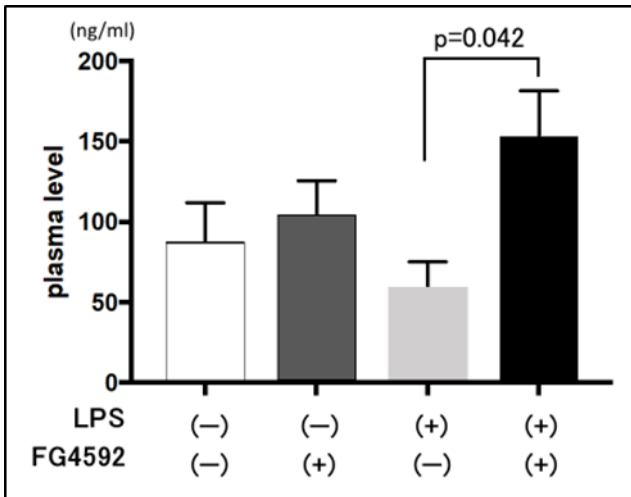


図 5: 血漿中キヌレン酸濃度

キヌレン酸がエンドトキシンショックによる左室機能不全に及ぼす影響を調べるため、LPS35mg/kg を腹腔内投与 24 時間後に総頸動脈から左心室にコンダクタンスカテーテルを挿入して、キヌレン酸 2 mg または生理食塩水を左外頸静脈から投与し、左室機能の変化を連続的に測定した。キヌレン酸または Vehicle 投与後、HR, dp/dtmax, dp/dtmin, Tau それぞれの 5 分毎の測定値を baseline と比較し、その変化率を測定した。エンドトキシンショックによる左室機能不全に対し、キヌレン酸は陽性変時作用、陽性変力作用を示し、左室機能を劇的に改善した。

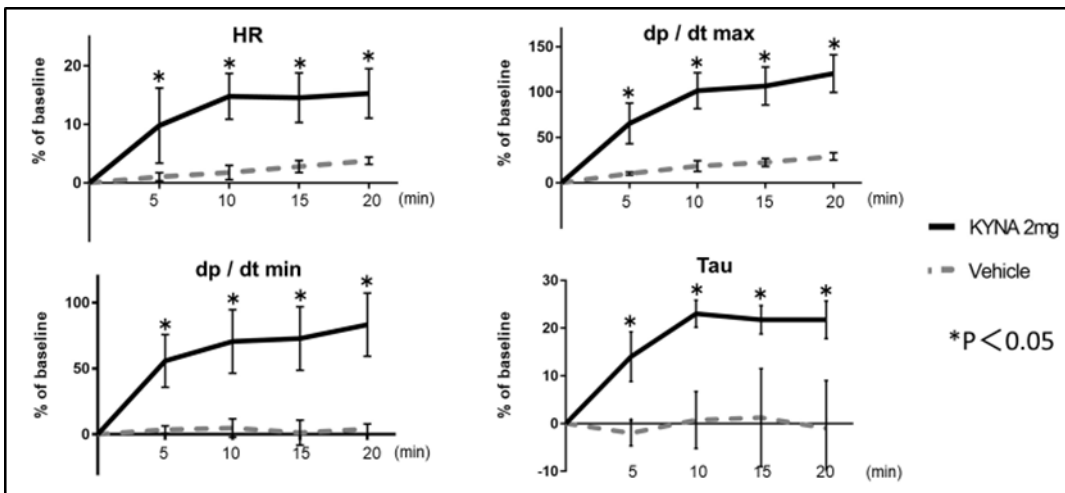


図 6: キヌレン酸投与による左室機能変化率

最後に、キヌレン酸のエンドトキシンショックの生命予後への影響を確認するため、LPS35mg/kg を投与した直後に KYN 20mg を項部皮下投与し生存率を観察した。すると、LPS 投与 7 日後の生存率は vehicle 群 (n=15) で 33%であったのに対し、FG 群 (n=15) では 67%と著しく改善した。

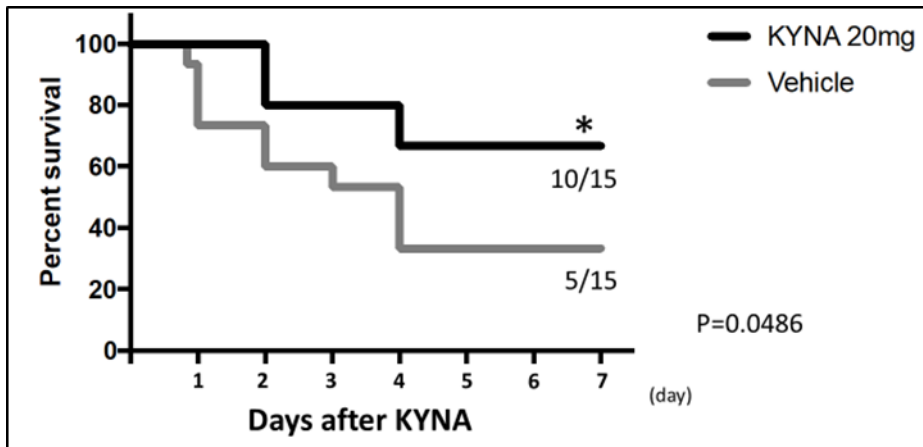


図 7: キヌレン酸投与群、vehicle 群の生存率

#### 4. 研究成果

トリプトファン代謝経路の一つであるキヌレニン経路は、炎症によって様々な影響を受ける。キヌレニンは重症外傷における血中キヌレニン濃度増加は敗血症発症の指標となるとされていて、敗血症における血管拡張物質の一つとして容量依存性に血圧を低下させる。その一方、キヌレン酸は心臓や脳、腎臓の虚血再灌流障害を軽減することが報告されている。また、キヌレン酸はフリーラジカルスカベンジャーとして作用することも報告されている。キヌレン酸投与による明らかな副作用の報告はない。

本研究ではキヌレン酸がエンドトキシンショックによる心機能障害を改善し、生存率を改善することを明らかにした。キヌレン酸は敗血症性心筋症の新たな治療戦略の一つになりうるかもしれない。

#### 結論

- ・PHD 阻害剤 (FG-4592) はエンドトキシンショック後の心機能不全を軽減し、生存率を改善した。
- ・PHD 阻害剤の心筋保護作用には抗炎症効果だけではなく、血中キヌレン酸の増加が関与していることが示唆された。
- ・キヌレン酸はエンドトキシンショック後の心機能不全を軽減し、生存率を改善した。
- ・PHD 阻害剤やキヌレン酸は敗血症性心筋症の新たな治療戦略の一つになりうるかもしれない。

#### <引用文献>

1) Olenchok, B. A., et al. (2016). "EGLN1 Inhibition and Rerouting of alpha-Ketoglutarate Suffice for Remote Ischemic Protection." *Cell* 164(5): 884-895.

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 2 件)

①伊原奈帆 (代表)、南嶋しづか、井上 敬、五十嵐 達、鈴木 武志、森崎 浩: プロリン水酸化酵素 (PHD) 阻害剤はキヌレニン経路の活性化を介してエンドトキシンショックを軽減する. 第 65 回日本麻酔科学会学術集会 2018. 5. 17 (優秀演題選出)

②伊原奈帆 (代表)、南嶋しづか、井上 敬、五十嵐 達、森崎 浩: プロリン水酸化酵素阻害剤はマウスの LPS 誘発性敗血症性心筋症を軽減する. 第 63 回日本麻酔科学会学術集会 2016. 5. 27 (優秀演題選出)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：南嶋 しづか  
ローマ字氏名：MINAMISHIMA, Shizuka

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。