

Title	敗血症における(プロ)レニン受容体ブロッカーの有効性に関する基礎的検討
Sub Title	(Pro)renin receptor blocker improves survival of rats with sepsis
Author	平野, 佑樹(Hirano, Yuki)
Publisher	
Publication year	2012
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2011.)
JaLC DOI	
Abstract	ラット敗血症(盲腸結紮穿孔)モデルで(プロ)レニン受容体ブロッカー((Pro)rennin Receptor Blocker: PRRB)の投与実験を施行し, その有用性を検討した. PRRB群はcontrol群と比較して, 有意にその生存率を改善し, 血清サイトカインとHMGB1の上昇を抑制した. 免疫染色では, PRRB群で盲腸の漿膜面に浸潤している泡沫細胞の活性化プロレニン陽性率とマクロファージのHMGB1陽性率の数が有意に抑制された. これらの事象から, PRRBは敗血症の新たな治療薬としての可能性が示唆された.
Notes	研究種目: 若手研究(B) 研究期間: 2010~2011 課題番号: 22791754 研究分野: 医歯薬学 科研費の分科・細目: 外科系臨床医学・救急医学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_22791754seika

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（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791754

研究課題名（和文） 敗血症における（プロ）レニン受容体ブロッカーの有効性に関する基礎的検討

研究課題名（英文） (Pro)renin Receptor Blocker Improves Survival of Rats with Sepsis

研究代表者

平野 佑樹（HIRANO YUKI）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80445387

研究成果の概要（和文）：ラット敗血症（盲腸結紮穿刺）モデルで（プロ）レニン受容体ブロッカー（(Pro)rennin Receptor Blocker：PRRB）の投与実験を施行し、その有用性を検討した。PRRB 群は control 群と比較して、有意にその生存率を改善し、血清サイトカインと HMGB1 の上昇を抑制した。免疫染色では、PRRB 群で盲腸の漿膜面に浸潤している泡沫細胞の活性化プロレニン陽性率とマクロファージの HMGB1 陽性率の数が有意に抑制された。これらの事象から、PRRB は敗血症の新たな治療薬としての可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We sought to investigate the effect of the (pro)renin receptor blocker (PRRB) on sepsis in a rat cecal ligation and puncture model. PRRB significantly improved survival rate of rats with clinically relevant sepsis, possibly by attenuating sepsis-induced systemic inflammatory response. We propose that the activation of prorenin in macrophage foam cells may be a significant mechanism of sepsis, and PRRB may decrease inflammatory response in inflammatory cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：敗血症，サイトカイン，HMGB1，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

(1) レニンアンジオテンシン系は血圧や水・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が、近年高血圧や糖尿病における臓器障害、さらには敗血症との関与が明らかとなり、レニンアンジオテンシン系抑制薬がその治療薬として注目されている。

(2) 2002 年に発見された（プロ）レニン受容体は、従来不活性と考えられていたプロレニ

ンと結合し、レニン活性を発揮することが判明し、新たな治療のターゲットとして注目されている。すでに糖尿病による腎障害、高血圧による臓器線維化において、（プロ）レニン受容体ブロッカー（(Pro)rennin Receptor Blocker：PRRB）の有用性が報告されている。

(3) 敗血症などの急性の重症病態における（プロ）レニン受容体，プロレニン，PRRB に関連した報告はない。

2. 研究の目的

ラット敗血症モデルとして、最も臨床に近いとされる盲腸結紮穿孔刺; Cecal Ligation and Puncture; CLP モデルを用いて、PRRB の投与実験を施行し、その有用性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

Sprague-Dawley Rat (7 週齢, 雄, 270-300g)

(2) PRRB 投与

浸透圧ミニポンプにて PRRB (NH₂-RILLKKMPSV-COOH) を 1 mg/kg/day で 2 週間持続皮下注する。Control として scramble peptide(NH₂-PLMKRLSIK-COOH)を用いる。

(3) 敗血症モデルの作成

ミニポンプを埋没して 1 週間後に、PRRB 群か Control 群が分からないブラインドの状態 CLP を施行する。ketamine(40mg/kg)筋注にて麻酔し、仰臥位にて 20mm の腹部正中切開を行う。盲腸を露出し、回盲弁直下で腸管への血流および腸内容の通過経路を温存しながら 3-0silk にて結紮する。盲腸先端に 6mm の切開を加え、盲腸を腹腔内の元の位置に戻し、3-0silk にて連続縫合で閉創する。術後 0.9% NaCl(5.0mg/kg)を 1ml 皮下注する。以後の観察、組織採取もブラインドの状態のまま行う。

(4) 生存分析

PRRB 群, control 群を前記のごとく各 n=19 で作製し、CLP 後 1 週間、ラットを赤外線ビデオカメラで常に監視して生存確認を行う。

(5) 血清のサイトカイン/HMGB1

PRRB 群, control 群を各 n=12 で作製し、経時的(CLP 直前, 3 時間後, 6 時間後の 3 時点)に血清を採取し、tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6 を Multiplex にて、high-mobility group chromosomal protein 1 (HMGB1)を ELISA にて測定する。

(6) 腹膜炎の評価 (病理組織)

PRRB 群, control 群を各 n=6 で作製し、CLP 6 時間後に盲腸を採取して、HE 染色で漿膜面の炎症を評価し、抗 GRP 抗体の免疫染色で活性化プロレニンの発現を評価する。

(7) 血漿 Angiotensin II

PRRB 群, control 群を各 n=7 で作製し、CLP 6 時間後の血漿 Angiotensin II を RIA にて測定する。Sham 群 n=6 でも同様に測定する。

4. 研究成果

(1) 結果

生存分析

PRRB 群は control 群と比較して、有意に CLP 後 1 週間の生存率を改善した(P=0.023)。

Figure 1

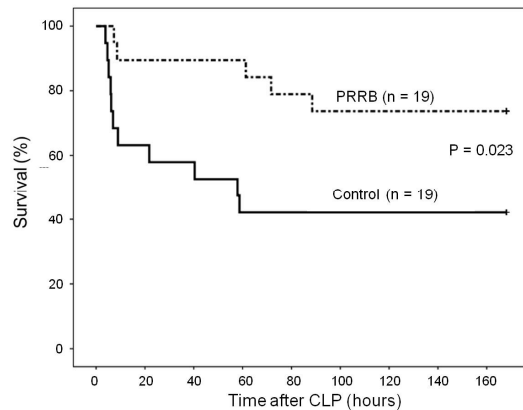


Figure 1. Effects of PRRB on survival in CLP rats. Rats were treated with vehicle peptide (control group) or PRRB (PRRB group). Data are shown as percentage of animals surviving (n = 19 in each group). The whole period of follow-up is compared with a Kaplan-Meier analysis and log-rank test (P < 0.05); solid line, controls; broken line, PRRB group

血清のサイトカイン/HMGB1

PRRB 群は control 群と比較して、CLP 6 時間後の血清サイトカイン (TNF- α , IL-1 β) と HMGB-1 の上昇を有意に抑制した。

Figure 2

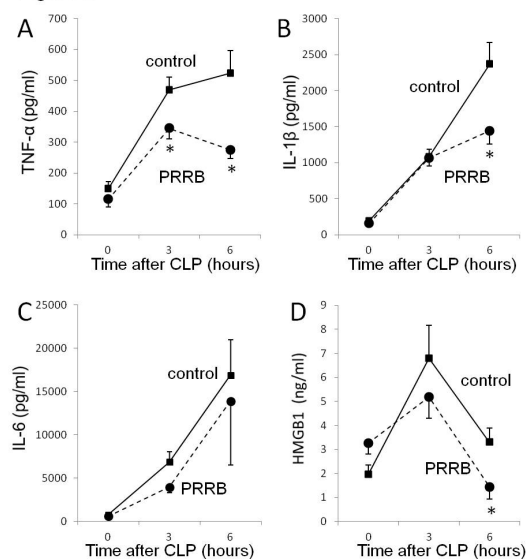


Figure 2. TNF- α , IL-1 β , IL-6, and HMGB1 serum concentration after CLP surgery. Concentrations of the proinflammatory factors were determined in serum taken from animals in the control and PRRB groups (n = 11 for each group) at the time points indicated. Squares represent the values measured for the control group; circles represent the values for the PRRB group. All data are expressed as mean value \pm SE. *Denotes a significant difference compared with the control group (P < 0.05). (A) TNF- α ; (B) IL-1 β ; (C) IL-6; and (D) HMGB1.

腹膜炎の評価 (病理組織)

HE 染色:

PRRB 群, control 群ともに盲腸の漿膜面に炎症細胞 (主にマクロファージ様細胞, 泡沫細胞) の浸潤を認めた.

免疫染色:

control 群で盲腸の漿膜面に浸潤している泡沫細胞が活性化プロレニン陽性となっており, 泡沫細胞周囲のマクロファージの細胞質では HMGB1 が高発現していた. 一方で PRRB 群では, 泡沫細胞の活性化プロレニン陽性率, マクロファージ様細胞の HMGB1 陽性率がともに有意に抑制された (活性化プロレニン, PRRB 群 versus control 群, $18 \pm 12\%$ vs. $100 \pm 0\%$, P = 0.032; HMGB1, PRRB 群 versus control 群, $1.6 \pm 1.0\%$ vs. $22 \pm 16\%$, P = 0.042). 泡沫細胞数は 2 群間で有意差は認めなかった (PRRB 群 versus control 群, 22 ± 19 cells/high power field vs. 16 ± 25 cells/high power field, P = 0.19).

Figure 3

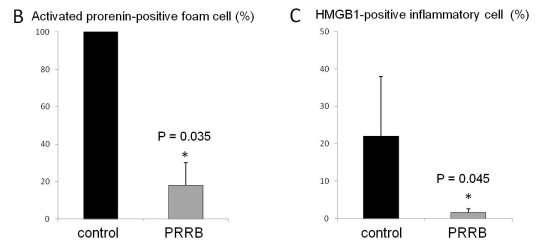
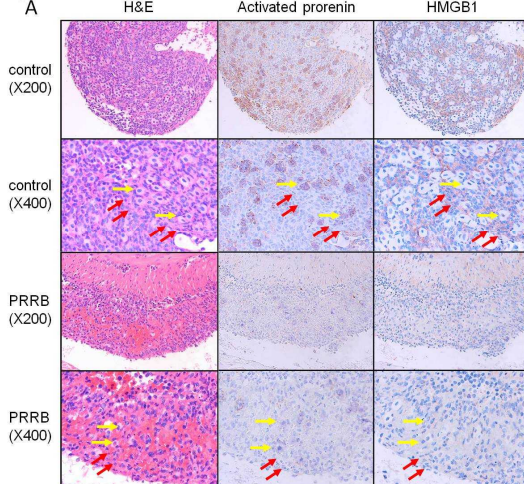


Figure 3. Histological and immunohistochemical findings of the inflammatory cells infiltrated into the cecum subserosa at 6h after CLP in the control and PRRB groups. (A) Hematoxylin and eosin, and immunohistochemistry of nonproteolytically activated prorenin and HMGB1, respectively; red arrow, macrophage-like cell; yellow arrow, foam cell. (B) Quantitative analysis of activated prorenin-positive foam cell. (C) Quantitative analysis of HMGB1-positive inflammatory cell. *Denotes a significant difference compared with the control group (P < 0.05).

血漿 Angiotensin II

CLP 群 (PRRB 群, control 群) では sham 群と比較して, 血漿中の Angiotensin II の上昇を認めた (Sham vs control P=0.001, Sham vs PRRB P=0.008). PRRB は CLP 群において血漿 Angiotensin II に影響を与えなかった (control vs PRRB P=0.259).

Figure 4

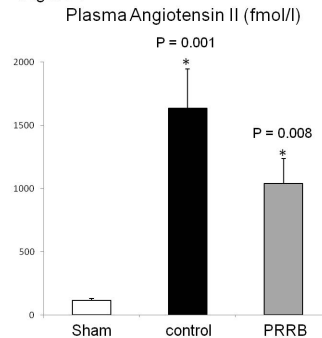


Figure 4. Plasma Ang II concentration. The graph shows a increased plasma Ang II concentration in the CLP rats. PRRB did not affect the plasma Ang II concentration in CLP rats. *Denotes a significant difference compared with the sham group (P < 0.05).

(2) 考察

ラット敗血症モデルに PRRB を投与し、全身性の炎症性サイトカイン、HMGB1 の過剰産生が抑制され、有意に生存率が改善したと推測された。

免疫染色において、泡沫細胞に（プロ）レニン受容体が存在し、腹膜炎の病態においてプロレニンが結合し、プロレニンが活性化された。またこの泡沫細胞周囲のマクロファージ様細胞の細胞質で HMGB1 が高発現していることが確認できた。PRRB が泡沫細胞でのプロレニンの活性化を抑制し、周囲のマクロファージからのサイトカイン、HMGB1 の過剰な産生を抑制していることから、PRRB は腹腔内のレニンアンジオテンシン系、および炎症を抑制することにより、敗血症の病態を改善している可能性が示唆された。

過去の報告と同様に敗血症の病態において、血漿 Angiotensin II の上昇を認め、PRRB は影響を与えなかった。このことは高血圧、糖尿病ラットにおいて PRRB が血漿 Angiotensin II に影響を与えなかった点と一致しており、PRRB は組織レニンアンジオテンシン系に作用し、直接循環レニンアンジオテンシン系には関与しないことが示唆された。

本実験は敗血症における PRRB に関連した世界で初めての実験であり、PRRB の敗血症の新たな治療薬としての可能性が示唆された。

今後の展望として、他の敗血症モデルでの PRRB の有用性を検討するとともに、臨床応用にむけて PRRB の投与方法も検討していく予定である。

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)

[学会発表](計2件)

平野 佑樹、ラット敗血症モデルにおける(プロ)レニン受容体ブロッカーの有効性、第27回日本 Shock 学会総会、2012年5月12日、東京

平野 佑樹、敗血症における(プロ)レニン受容体ブロッカーの有効性、第18回外科侵襲とサイトカイン研究会、2011年12月10日、金沢

6. 研究組織

(1)研究代表者

平野 佑樹 (HIRANO YUKI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：80445387