氏 名 おう きょう
王 強 (Qiang Wang)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 記 番 号 富医薬博甲第 158 号

学位授与年月日 平成 27 年 3 月 24 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教 育 部 名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
東西統合医学専攻

学 位 論 文 題 目 Anti-inflammatory profile of levosimendan in cecal
ligation-induced septic mice and in
lipopolysaccharide-stimulated macrophages
(Ca 感受性増強薬レボシメンダンの敗血症病態における有用性とそ
の作用機構に関する研究；盲腸結紮・穿孔誘発性敗血症マウス及び
リポ多糖体毒素処置マクロファージでの検討)

論文審査委員

(主査)	教 授	西田 尚樹
(副査)	教 授	白木 公康
(副査)	教 授	木村 友厚
(副査)	教 授	芳村 直樹
(指導教員)	教 授	服部 裕一

論文内容の要旨

〔目的〕

レボシメンタンは、これまで最もよく研究されているCa感受性増強薬であり、陽性変力作用に比べ心筋酸素消費量が少なく不整脈発生が少ないとの期待から、欧米においては、非代償性心不全治療に積極的に用いられている。そうしたなか、レボシメンタンが敗血症性心機能障害とその血行動態の改善を示唆する報告、加えて抗炎症作用を示唆する報告が集まるにつれ、敗血症性ショック患者に対するレボシメンタンの効果が期待されはじめ、今日ではその臨床試験が積極的に実施される状況に至っている。しかしながら、その分子レベルでの作用機構・有効性については、未だその多くが明らかにされていない。この研究において、私は、レボシメンタンが、臨床的に有用なモデルとされる盲腸結紮・穿孔 (CLP) 誘発性敗血症マウスにおいて、実質的に有益な作用をもつかを検討し、さらにマウスマクロファージ cell line, RAW264.7 を用いて、レボシメンタンが敗血症を軽減する機構について検証した。

〔方法並びに成績〕

CLP誘発性敗血症マウスにおいて、心エコー解析で駆出率 (EF) や短縮率 (%FS) 低下を伴う心機能不全、かつ有意な血圧低下が認められたが、浸透圧ポンプを用いたレボシメンタン持続投与は、心機能低下と低血圧を有意に改善した。さらに、レボシメンタン投与は、CLP 敗血症マウスで観察される敗血症性急性肺傷害の組織所見を改善、および TNF- α や IL-1 β をはじめとした炎症性・走化性サイトカインの肺組織での産生増加および血中濃度上昇を抑制した。一方、RAW264.7 細胞に大腸菌リポ多糖体毒素 (LPS) 処置した解析では、I κ B α のdegradation, NF- κ Bの核内移行に加え、ERK1/2, JNK, p38といったMAPKsの活性化, Aktの活性化が認められたが、これらの変化にはレボシメンタン投与は影響を与えなかった。しかしながら、非ヒストン核蛋白の主要成分として知られ、新たな起炎症因子である HMGB1 (high mobility group box 1) の LPS 刺激による核内から細胞外への移行に関して、レボシメンタン投与は強く抑制した。

〔結果〕

レボシメンタンは、**HMGB1**の核内から細胞外への移行を抑制する機構により、抗炎症作用を発揮していた。このレボシメンタンが有する抗炎症効果と強心作用という薬理学的特性は、敗血症患者に認められる心機能不全を改善する上で臨床的に大きく貢献するであろうことが結論された。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

【目的】

重症敗血症の予後は未だ不良であり，感染コントロールに加えて敗血症に併発する心機能障害の改善をも念頭においた有効な治療プロトコルの確立が待たれている。Ca 感受性増強薬であるレボシメンタンは他薬に比して少ない心筋酸素消費量で高い陽性変力作用が得られ，かつ不整脈発生が少ないという知見により，従来から非代償性心不全の治療に汎用されてきた。それに加えて，近年レボシメンタンには敗血症性心機能障害の抑制効果とそれに伴う血行動態の改善や抗炎症作用の存在を示唆する報告があり，現在臨床試験の実施に至っているが，その一方で敗血症性心機能障害に対するレボシメンタンの分子レベルでの作用機構や有効性に関しては未解明の部分が多い。そこで，王 強君は，盲腸結紮後穿孔誘発性敗血症マウスに対するレボシメンタンの有用性を検討し，加えてマウスマクロファージ cell line である RAW264.7 を用いて，レボシメンタンが敗血症を軽減する機構について検証した。

【方法ならびに成績】

- 1) 8 週から 10 週齢の BALB/C マウスで盲腸結紮後穿孔誘発性敗血症マウスを作製し，腹腔内にレボシメンタン 0.5 $\mu\text{g/kg/min}$ を持続投与する群 (CLP+Levo) と生理的食塩水を持続投与する群 (CLP) を作製した。また Sham 手術群も作製した。
- 2) Kaplan-Meier 生存曲線を作製すると，マウス作成後 5 日目において CLP+Levo で CLP に比し有意に生存率が高かった。。
- 3) CLP では，M-mode 心エコーにより左室駆出率，短縮率低下を認め，血圧低下も認められたが，CLP+Levo では有意な改善を認めた。。
- 4) ELISA 法にて，血中の炎症性・走化性サイトカインの測定を行ったところ，CLP では，TNF- α ，IL-1 β ，IL-6，MCP-1 が上昇したが，CLP+Levo では有意に低下した。また RT-PCR による検索で，これらサイトカインの肺組織中 mRNA 量は CLP+Levo で CLP に比し有意に低下していた。
- 5) 病理組織学的に CLP+Levo で，CLP に比し敗血症性急性肺傷害の程度が軽微であった。また CLP では主に血管内皮細胞に TUNEL 陽性の apoptotic cell が多数認められたが，CLP+Levo では CLP に比し，その数が有意に減少していた。

- 6) RAW264.7 cell に 1 $\mu\text{g/ml}$ の lipopolysaccharide (LPS) を処置したところ、炎症性・走化性サイトカインの mRNA 量が上昇した。またレボシメンダン、他の Ca 感受性増強薬であるピモベンダンにより濃度依存性に抑制された。
- 7) 炎症性・走化性サイトカインに対するレボシメンダンの抑制作用が、炎症反応の調節に重要な役割を果たしていると考えられる NF- κ B シグナル経路を介しているかを検討する目的で、RAW264.7 cell に LPS 処置した後、NF- κ B シグナル経路を調節する Ik-B α のタンパク量を Western blot で評価した。その結果 Ik-B α タンパク量は減少しており、そのピークは LPS 処置後 15 分から 30 分の間で発生していた。この現象はレボシメンダン投与により影響を受けなかった。また LPS 処置後には Ik-B α から遊離した NF- κ B の核内移行も認められたが、この現象にもレボシメンダン投与は影響を及ぼさなかった。NF- κ B luciferase assay にて LPS 処置後 6 時間で NF- κ B プロモーター活性の上昇が認められた。またレボシメンダン投与にて抑制傾向があったが有意ではなかった。
- 8) Mitogen-activated protein kinase cascade (MAPK) は LPS 処置後のシグナル伝達に対する重要な下流経路である。MAPK family の major subgroup である ERK1/2, JNK, p38 の活性化に対するレボシメンダンの作用を検討する目的で RAW264.7 cell を LPS 処置し、Western blot によるリン酸化タンパクレベルにて MAPKs の活性を評価した。その結果 3 種の MAPKs 全てが高度に活性化されていたが、レボシメンダン投与にて抑制されなかった。また、LPS 誘導性炎症に負の調節機能を有する Akt も LPS 処置で高度に活性化されたが、レボシメンダン投与にて抑制されなかった。
- 9) High morbidity group box 1 (HMGB1) は、転写活性を増強する核因子であり、先天性免疫応答のメディエーターとしても知られている。HMGB1 mRNA の発現は LPS 処置した RAW264.7 cell で強く抑制された。またレボシメンダン、ピモベンダン処置を LPS 処置の 30 分前に行うと LPS 処置単独よりも HMGB1 mRNA 発現量が増加した。また Western blot にて核内 HMGB1 タンパク量の減少、ELISA 法にて培養 medium 内でのタンパク量増加が認められた。レボシメンダン、ピモベンダン前処置により LPS 処置単独より核内 HMGB1 量の増加、培養 medium 内 HMGB1 量の減少が認められた。
- 10) CLP で血清 HMGB1 の上昇が認められ、レボシメンダン、ピモベンダン投与にて有意に抑制された。

【総括】

本研究にて王 強君は敗血症におけるレボシメンダンの投与効果を *in vivo*, *in vitro* モデルにてそれぞれ検証した。レボシメンダン投与は *in vivo* モデルである盲腸結紮後穿孔誘発性敗血症マウスの予後を改善させ、所見として敗血症で低下した左室機能、血圧の改善、炎症性・走化性サイトカインの抑制、サイトカインの抑制によったと考えられる敗血症性急性肺傷害の改善像を示した。RAW264.7 cell を用いた *in vitro* モデルでは、レボシメンダンが、LPS 刺激によって生じる HMGB1 の核内から細胞外への移行を抑制することを示した。

レボシメンダン投与による盲腸結紮後穿孔誘発性敗血症マウスの心機能、予後の改善や従来から知られている陽性変力作用に加えて抗炎症作用が明らかとなったという結果は、ヒトへの臨床応用を行うにあたって重要な知見を提供すると考えられ、高い臨床的発展性が認められた。またレボシメンダンの抗炎症作用の分子機構の解明は、重症敗血症の病態解明にもつながる重要な知見となり得ることから高い学術的発展性があるものと考えられた。従って、本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分価すると判断した。