

氏名 さかい まり
酒井 麻里

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 228 号

学位授与年月日 平成 29 年 3 月 23 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
生命・臨床医学専攻

学位論文題目 Diminished responsiveness to dobutamine as an inotrope
in mice with cecal ligation and puncture-induced sepsis
: Attribution to phosphodiesterase 4 upregulation
(盲腸結紮穿孔誘発性敗血症マウスにおけるドブタミンに対する
反応性の低下はPDE4のアップレギュレーションに起因する)

論文審査委員

(主査)	教授	山崎 光章
(副査)	教授	白木 公康
(副査)	教授	西田 尚樹
(副査)	教授	足立 雄一
(指導教員)	教授	芳村 直樹

論文内容の要旨

〔目的〕

集中治療の著しい発展にも関わらず、敗血症の死亡率は30～50%と依然として高い。敗血症患者において発症早期より心機能障害を認めることは以前より知られており、この程度が敗血症の予後を左右する因子の1つであると考えられている。心機能障害を伴う敗血症患者に対しアドレナリン β_1 受容体(β_1 AR)選択的アゴニストであるドブタミンは広く使用されており、Survival Sepsis Campaignにより唯一推奨されている強心薬はドブタミンであるが、これを推奨する十分な科学的根拠は乏しい。

本研究の目的は、敗血症患者の特徴の多くを有する動物モデルである盲腸結紮穿孔 (cecal ligation and puncture; CLP) で誘発した敗血症マウスを用いて陽性変力作用を持つドブタミンとホスホジエステラーゼ (PDE) III阻害薬であるミルリノンに対する反応性を評価し、その反応性の違いについての詳細な検討により、敗血症における心機能障害の発生機序を明らかにすることである。

〔方法並びに成績〕

本研究ではBALB/C雄性マウスを用い、CLPによりマウスに敗血症を誘発した。CLP施行18時間後に心臓、血液サンプルを採取した。まず、心筋の炎症性サイトカイン、ケモカインであるTNF- α 、IL-1 β 、IL-6、MCP-1のmRNA発現量を定量的PCR法で解析したところ、開腹のみ行ったSham群と比較しCLP群で有意に上昇しており、心筋組織切片を用いた免疫組織染色では好中球浸潤の指標となるミエロペルオキシダーゼ陽性細胞がCLP群で有意に増加していた。加えて、心筋傷害の指標である血中トロポニンI濃度と血中ノルアドレナリン濃度はSham群と比較しCLP群で有意な上昇を認めた。一方で、心筋細胞のサイズや心重量/脛骨長比は両群間で差はなかった。

次に小動物用超音波イメージング装置を用い、in vivo で非侵襲的にCLP施行18時間後のマウスにおける心機能を評価した。生理食塩水の皮下投与による十分な補液下においては、Sham群との比較においてCLP群で左室内径短縮率 (FS)、左室駆出率 (EF) に変化はなかった。心拍数 (HR) はCLP群において上昇する傾向にあった。ドブタミンに対する反応性に関しては、ドブタミンの低用量 (0.01 mg/kg) の静脈内投与ではSham群においてFS、EFが上昇したのに対し、CLP群においては有意な上昇を認めなかった。HRはSham群では変化はなかったが、CLP群で有意に上昇した。より高容量のドブタミン投与 (0.05 mg/kg) ではCLP群においてもFS、EFの軽度の上昇を認めたものの、Sham群と比較しその反応性は低下していた。HRは両群ともに有意に上昇した。一方、ミルリノン投与においては両群ともにHR、FS、EFはいずれも上昇した。

β_1 AR-Gs-アデニル酸シクラーゼ-cAMP経路の検討では、心臓において β_1 AR、Gs、G $_{i2}$ 、G $_q$ の α サブユニットのmRNA、タンパク質発現のいずれも2群間で差を認めなかった。加えて、心臓におけるGタンパク質共役受容体シグナルにおいて β_1 ARを含む受容体の脱感作

やダウンレギュレーションに重要な役割を果たすGRK2、 β arrestin-1、 β arrestin-2のタンパク質発現も2群間で変化を認めなかった。血漿cAMP濃度はミルリノン投与によって両群で有意に上昇したのに対し、ドブタミンを投与した場合はSham群のみ上昇を認め、CLP群では変化を認めなかった。

また、心臓においてcAMPを加水分解する重要な酵素であるPDEのアイソフォームであるPDE3A、PDE4DのmRNA、タンパク質発現につき検討したところ、PDE3AのmRNA、タンパク質発現は2群間で変化を認めなかったが、PDE4DのmRNA、タンパク質発現はCLP群においてともに有意に上昇していた。

〔総括〕

敗血症における心機能障害の発生機序として、心臓における β_1 ARのダウンレギュレーションやミトコンドリア機能不全、心筋細胞のアポトーシスなど様々な報告がされているが、未だ不明な点は多い。

本研究により、敗血症において左心機能の低下や心形態に変化を認めなくとも、炎症反応は誘導されており、ドブタミンに対する反応性の低下を惹起することが示された。また、このドブタミンに対する反応性の低下には心臓におけるPDE4Dの関与が示唆された。

今後、強心薬のサポートを必要とする心機能障害を伴う敗血症患者の治療において、PDE4Dが新たな治療のターゲットとして期待できる。

学位論文審査の要旨

集中治療医学の発展にも関わらず、敗血症の死亡率は 30 ~ 50 % と依然として高い。敗血症患者において発症早期より心機能障害を認めるが、この重症度が予後を左右する因子の1つであると考えられている。また、心機能障害を伴う敗血症患者に対して、Survival Sepsis Campaign では唯一ドブタミンが推奨されているが、これを推奨する十分な科学的根拠は乏しい。そこで酒井麻里さんは、盲腸結紮穿孔 (cecal ligation and puncture; CLP) で誘発した敗血症マウスを用いて、アドレナリン β_1 受容体 (β_1 AR) 選択的アゴニストであるドブタミンとホスホジエステラーゼ (PDE) 3 及び PDE4 阻害薬であるミルリノンに対する反応性を詳細に検討し、敗血症における心機能障害発生機序を明らかにしようと試みた。

【方法ならびに成績】

雄性BALB/cマウスにCLPを施し、敗血症マウスを作成した (CRP群)。CLP施行18時間後に心臓、血液サンプルを採取した。心筋のTNF- α 、IL-1 β 、IL-6、MCP-1のmRNA発現量を定量的PCR法で解析したところ、開腹のみ行ったsham群と比較しCRP群で有意に上昇し、免疫組織染色では好中球浸潤の指標となるミエロペルオキシダーゼ陽性細胞がCLP群で有意に増加した。また血中トロポニン I 濃度とノルアドレナリン濃度はCLP群で有意な上昇を認めた。一方、心筋細胞のサイズや心重量/脛骨長比はSham 群およびCLP群の両群間で差はなかった。

次に小動物用超音波イメージング装置を用い、in vivoで非侵襲的に18時間後のCLP群のマウスの心機能を評価した。生理食塩水の皮下投与による十分な補液のもと、Sham群との比較において、左室内径短縮率 (FS)、左室駆出率 (EF) に変化は無かったが、心拍数 (HR) はCLP群において上昇する傾向にあった。ドブタミン低用量 (0.01mg/kg) の静脈内投与では、Sham 群ではFS、EFが上昇したが、CLP群では変化を認めなかった。HRはSham群では変化しなかったが、CLP群では上昇した。ドブタミン高用量 (0.05mg/kg) の静脈内投与では、CLP群ではFS、EFの軽度上昇を認めたが、Sham群よりその反応性は低下していた。HRは両群とも有意に上昇した。一方、ミルリノン投与 (0.01mg/kg) の静脈内投与では、両群ともFS、EF、HRはいずれも上昇した。

また、 β_1 AR-Gs-アデニル酸シクラーゼ-cAMP経路の検討では、心臓において β_1 AR、Gs、Gi-2、Gqの α サブユニットのmRNA、タンパク質発現のいずれも両群間で差を認めなかった。さらに、Gタンパク質共役受容体シグナルにおいて β_1 ARの脱感作やダウンレギュレーションに重要な役割を果たすGRK2、 β -アレクチン-1、 β -アレクチン-2のタンパク質発現も両群間で変化を認めなかった。血漿cAMP濃度は、ミルリノン投与によって両群で有意に上昇したが、ドブタミン投与によってはSham群のみ上昇を認め、CLP群では変化を認めなかった。

加えて、cAMPを加水分解する重要な酵素であるPDEのアイソフォームであるPDE3A、PDE4DのmRNA、タンパク質発現について検討した。PDE3AのmRNA、タンパク質発現は両群間で差異を認めなかったが、PDE4DのmRNA、タンパク質発現はCLP群において共に有意な上昇を認めた。

【総括】

酒井麻里さんは、マウス敗血症性急性心機能障害において、左心機能の低下や心形態に変化を認めなくても炎症反応が誘導されること、ドブタミンに対する左心機能の反応性は低下するがミルリノンに対する反応性は良好であることを示した。そして、このドブタミンに対する反応性低下のメカニズムとしてPDE4Dのアップレギュレーションが関係することを明らかにした。本研究成果によって、敗血症性急性心機能障害に対してミルリノンが PDE4Dを介して有効であることを示したことは新規性が高く、重篤で致死性の高い敗血症の心機能障害発生に関する病態を明らかにしたことは学術的に重要である。またPDEに関連した治療薬開発の可能性を示したことは今後の臨床的発展性を期待させる。以上より、本審査委員会は本研究を博士（医学）の学位に十分値すると結論した。