

# 主論文

## Therapeutic effect of carbon monoxide-releasing molecule-3 on acute lung injury after hemorrhagic shock and resuscitation

### (出血性ショック蘇生後肺傷害における CORM-3 の治療効果)

#### [緒言]

出血性ショック蘇生後 (Hemorrhagic shock and resuscitation; HSR) に炎症反応が惹起されて肺傷害を起こすことが知られているが、急性肺傷害に対する有効な薬物療法は未だない。一酸化炭素(CO)は、生体内で遊離ヘムの分解産物としてシグナル伝達に働いており、侵襲時には細胞保護的に働く。以前、我々はラット HSR 後肺傷害モデルで CO 吸入の抗炎症、抗アポトーシス作用を報告したが、COHb が上昇することが問題であった。Carbon monoxide-releasing molecule-3 (CORM-3: tricarbonylchloro-glycinate ruthenium(II))は、投与後に組織で CO を遊離して COHb を上昇させずに細胞保護効果を示すことが報告されている。本研究では、ラット HSR 後肺傷害における CORM-3 の効果、および酸素化や血行動態に与える影響を検討した。

#### [材料(対象)と方法]

##### 動物実験

体重 370-430g の雄性 Sprague-Dawley ラットを用い、大腿静脈から脱血して平均血圧を 30mmHg に 45 分維持した後返血して、HSR モデルを作成した。蘇生 5 分後に生食 (HSR 群)、CORM-3 (HSR/CORM-3 群)、または inactive CORM-3 (HSR/iCORM-3 群)を投与した。Sham 群は血管確保のみとした。HSR 3, 6, 12 時間後に臓器を摘出し、4 群を比較した。

##### バイタルサインと動脈血液ガス分析

血圧・脈拍を HSR 中 5 分毎に記録し、血液ガス分析をショック開始から 0、60、80、120 分に行った。

##### 組織学的評価

HSR12 時間後の肺に HE 染色をして、うっ血、浮腫、細胞浸潤、出血を各々 4 段階で評価し肺傷害スコアを算出した。また、Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-fluorescein isothiocyanate (FITC) nick-end labeling (TUNEL)染色を行い、アポトーシスの評価を行った。

##### 気管支肺胞洗淨(BAL)と肺 wet/dry 比

HSR6 時間後の肺で BAL を行い、BAL 中蛋白濃度を測定した。また、HSR12 時間後の左肺重量と、110°C、24 時間で乾燥させた左肺重量を測定し、肺 wet/dry 比を算出した。

##### ノーザンブロットとリアルタイム RT-PCR

HSR3 時間後の肺から mRNA を抽出し、ノーザンブロットおよび RT-PCR を行い、TNF- $\alpha$ 、iNOS、IL-1 $\beta$ 、IL-10 の遺伝子発現を調べた。

##### ウェスタンブロットと ELISA

HSR12 時間後の肺から蛋白を抽出し、ELISA およびウェスタンブロットを行い、IL-1 $\beta$ 、MIP-2、Caspase-3 の蛋白発現を調べた。

## 統計

データは mean ± SEM で示し、解析には Tukey-Kramer test を用いた。

## [結果]

### 肺組織傷害に対する CORM-3 の効果

HSR によって肺に炎症細胞浸潤や浮腫が生じ、肺傷害スコアは有意に増加したが、CORM-3 投与で改善した。iCORM-3 投与は効果を認めなかった。

### 肺 wet/dry 比と BAL 中蛋白濃度に対する CORM-3 の効果

HSR によって肺 wet/dry 比と BAL 中蛋白濃度は有意に増加したが、COMR-3 投与で改善した。iCORM-3 投与は効果を認めなかった。

### 肺の炎症性サイトカイン発現に対する CORM-3 の効果

HSR によって肺 TNF- $\alpha$ 、iNOS、IL-1 $\beta$  mRNA の発現が増強したが、CORM-3 はこれらの発現を抑制し、また CORM-3 は IL-10 mRNA の発現を増強させた。CORM-3 は HSR12 時間後の肺 IL-1 $\beta$ 、MIP-2 蛋白発現も抑制した。

### アポトーシスに対する CORM-3 の効果。

HSR によって肺の TUNEL 染色陽性細胞数とカスパーゼ-3 蛋白の発現が増加したが、CORM-3 投与でいずれも軽減した。

### CORM-3 は HSR 中の血行動態や酸素化に悪影響を及ぼさない

CORM-3 は血管拡張作用を持つとされるが、本研究では CORM-3 投与による血圧の低下は認めなかった。また、薬剤投与に伴う血中 COHb の上昇や酸素化低下も認めず、HSR 施行 3 群で血液ガス分析に有意差を認めなかった。

## [考察]

我々は、HSR 後肺傷害に対して CORM-3 が肺組織学的所見を改善させ、肺 wet/dry 比、BAL 中蛋白濃度を低下させることを示した。CORM-3 は TNF- $\alpha$ 、iNOS、IL-1 $\beta$ 、MIP-2 など炎症性サイトカインを低下させ、IL-10 の発現を増加させるとともに、TUNEL 染色陽性細胞数とカスパーゼ-3 蛋白も減少させた。薬剤投与に伴う血液ガス分析や血行動態への悪影響はなかった。ラット HSR 後肺傷害において、CORM-3 は急性期に安全に投与でき、抗炎症、抗アポトーシス作用を介して肺傷害を改善させると考えられた。

HSR は酸化ストレスを惹起し、多量のヘム蛋白を遊離させて組織を傷害するが、その際、誘導されたヘムオキシゲナーゼ-1 はヘムを分解して細胞保護的に働く。ヘム分解産物である CO も p38MAPK やインフラマソーム、NF- $\kappa$ B など種々の経路を介して細胞保護的に働くことが知られており、近年では CORMs を用いた同様の報告が多数上がっている。我々は以前に HSR 後肺傷害において CO 吸入が PPAR- $\gamma$  の活性化や NF- $\kappa$ B の抑制などを介して、抗炎症、抗アポトーシス作用を示すことを報告しており、今回の研究でも CORM-3 がこれらのシグナル伝達を介して肺傷害を減弱させた可能性がある。これまでに、HSR 後に CORM-3 を投与して肺傷害を調べた研究は殆どなく、本研究は HSR 後肺傷害に対する CORM-3 の治療効果を示したことに意義がある。

我々の以前の研究では HSR 後肺傷害に対する CO 250 ppm の吸入で、血中 COHb が約 20%まで上昇することが問題であった。CORM-3 は CO を遷移元素に配位結合させた水溶性化合物であり、体内投与後急速に CO を放出して、COHb を上昇させずに細胞保護効果を示すとされており、本研究でも投与後に COHb の有意な上昇は認めなかった。

また、CORMs は可溶性グアニル酸シクラーゼや K チャンネル活性化を介する血管拡張作用を有し、正常ラットにおいては CORM-3 20-30  $\mu$ mol/kg の投与で平均血圧が約 10mmHg 低下すると報告されているが、本研究では CORM-3 投与後に血圧の低下を認めなかった。その原因としては、投与量が 4mg/kg

(13.58  $\mu\text{mol/kg}$ )と比較的少なかったことや、iNOS の発現を抑制したことで、虚血再灌流後の主要血管拡張因子である NO が減少し、CORMs による血管拡張作用が相殺された可能性が考えられた。いずれにしろ、今回の結果で、虚血再灌流早期においても CORM-3 を安全に投与できることが示唆された。

本研究における limitation であるが、まず、我々は肺組織の CO 濃度を測定していない。しかし、先行研究では複数臓器で CO 濃度を測定して、CORM-3 投与が濃度依存性に組織 CO 濃度を上昇させることを確認している。また、今回 iCORM-3 投与は何ら肺傷害を改善しなかったことも、今回 CORM-3 からの遊離 CO が肺傷害を軽減させたことを支持する。次に、我々は CORM-3 が他臓器に与える影響を考慮していない。しかし、以前の研究で当 HSR モデルでは主に肺に傷害が生じ、肝臓や腎臓など多臓器に与える傷害は軽微であることが確認されており、今回観察された CORM-3 の肺傷害治療効果が他臓器の改善に伴う間接効果とは考えにくい。最後に、今回 CORM-3 投与における各種臓器を含めた長期的な副作用がないかは検討しておらず、これに関しては今後さらなる研究が必要である。

#### **[結論]**

我々はラット出血性ショック蘇生後肺傷害モデルにおいて、蘇生後早期の CORM-3 投与が抗炎症作用、抗アポトーシス作用を介して肺傷害を軽減することを示した。また、出血性ショック急性期の CORM-3 投与は、血液ガス分析や血行動態に悪影響を及ぼさず、安全に投与できた。