

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10508

研究課題名(和文)下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチドによる細菌性腹膜炎の制御と、臨床応用

研究課題名(英文)Effects of PACAP on septic peritonitis

研究代表者

河野 寛 (KONO, Hiroshi)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：40322127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド(PACAP)の細菌性腹膜炎における効果を検討した。PACAP投与各群において、非投与群と比較しARDSと致死率が有意に改善した。血清炎症性サイトカイン発現は低下し、IL-10発現は増加した。肺ではIL-6発現が低下した。肺でのケモカイン発現が低下した。PACAP存在下での肺胞マクロファージのIL-6産生は抑制され、肝MfsのIL-10産生は増加した。PACAPにより肝MfsのNF- $\kappa$ B活性が有意に低下した。CorとACTHはPACAP投与群において優位に高値であった。PACAPは細菌性腹膜炎発症後のARDSと致死率を著明に改善した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腹部救急の領域において大腸穿孔に代表される細菌性腹膜炎は治療に難渋することが多く、多臓器不全を発症し、致死率の非常に高い病態である。局所の炎症の制御は、手術的なドレナージが最も有効であるが、予後に強く寄与する肺や肝臓などの遠隔臓器での多臓器障害を制御する目的での薬物投与による有効な治療方法は未だ確立されていない。PACAP投与の抗炎症作用の有効性に関する視点から検討はこれまで無く、今回の検討成果は細菌性腹膜炎に伴う、多臓器障害改善に対する新しい治療の開発に発展する可能性を持つ。今後、炎症・感染における生体侵襲を科学的に解明し、その制御を目指すという視点からの研究につながると考える。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in sepsis. Mice were given PACAP before or after cecal ligation and puncture (CLP), and organ injury and mortality were investigated. Serum inflammatory and anti-inflammatory cytokine levels were assessed. Isolated tissue macrophages (Mfs) were incubated with or without PACAP, and production of cytokines was measured. PACAP treatment significantly prevented mortality after CLP. Increased serum TNF- $\alpha$  and HMGB1 levels in animals treated with vehicle were significantly blunted in PACAP-treated animals after CLP. Serum IL-10 levels were significantly greater in the PACAP-treated group compared with the vehicle group. Production of HMGB1 and TNF- $\alpha$  by isolated hepatic Mfs was significantly inhibited in the presence of PACAP, while production of IL-10 by isolated KCs and interstitial lung Mfs was significantly increased. PACAP prevents mortality due to septic peritonitis.

研究分野：肝臓免疫機構

キーワード：細菌性腹膜炎 下垂体ポリペプチド 肺障害 マクロファージ

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

消化器外科の領域において、治療法や診断技術の進歩が著しい現在の医療においても、消化管穿孔による細菌性腹膜炎は依然として致死率の高い重篤な疾患である (South Med J 2007;100: 594-600)。これまでの報告を要約すると、細菌性腹膜炎によるには大きく分けて二つの病態が関与している。一つは消化管外に漏出した細菌群に対する局所での感染防御機構である。もう一つは、細菌やエンドトキシンにより活性化された免疫担当細胞から産生される過剰なサイトカインやケモカインが感染局所から離れた部位での炎症反応、凝固反応を惹起しすることに伴う遠隔臓器障害であり、重症化すると多臓器不全より致死に至る (Shock 1998; 10: 79-89)。その中でも、肺は早期に障害を受ける標的臓器である。腹膜炎の治療として、局所の炎症の制御は手術的なドレナージが最も有効であるが、予後に強く寄与する肺や肝臓などの遠隔臓器の障害を制御する有効な薬物治療方法は未だ確立されていない。

PACAP は羊の視床下部抽出物より 1989 年に発見された神経ペプチドである。PACAP には 27 または 38 アミノ酸残基からなる PACAP27 と PACAP38 が存在し、ほぼ同等の作用を示す。PACAP は血管作動性腸管ペプチド (vasoactiveintestinal polypeptide ; VIP) /セクレチン/グルカゴンファミリーに属しており、特に VIP は PACAP27 と約 70% の高い相同性を示す。免疫系の恒常性制御機能を有する事実は既に報告されていたが、最近の報告で、エンドトキシン血症において、PACAP が 活性化マクロファージによる炎症性メディエーター生産抑制、さらに抗炎症性サイトカイン IL-10 産生を亢進することで強力な抗炎症作用を有する事实在報告されている (J. Biol. Chem. 1998; 273:31427-31436)。

## 2. 研究の目的

PACAP 投与により、M1 タイプマクロファージ由来の炎症性サイトカインが抑制され、かつ、M2 タイプ由来の抗炎症性サイトカインが増加することで、細菌性腹膜炎における致死的病態である ARDS の発症を抑制かつ改善し、致死率を低下させるという仮説を立てた。本研究は、この仮説を検証する目的で、マウスに細菌性腹膜炎 (Cecal Ligation and Puncture) モデルを作製し、PACAP の細菌性腹膜炎における投与効果を明らかとする。投与効果が認められた場合は、その作用機序を、申請者のこれまで行ってきた検討結果を基に、肝臓と肺の炎症性マクロファージ活性化抑制効果ならびに、抗炎症性マクロファージの活性化に関し、肺と肝臓におけるマクロファージの subtype である M1 と M2 マクロファ

ジの分布、炎症性・抗炎症性サイトカイン産生への効果を明らかとする目的で検討した。

### 3. 研究の方法

**方法:**盲腸結紮穿孔刺(CLP)モデルを作製し、PACAP を CLP 作成 1 時間前、直後、1 時間後に投与(i.v.)し、ARDS 発症と致死率を検討した。また、血清 IL-10 と致死性的サイトカイン HMGB1 値を測定した。さらに、肺、肝臓で炎症性サイトカインの TNF- $\alpha$ ならびに IL-6、抗炎症性サイトカインの IL-10 の発現、ケモカイン発現を検討した。PACAP 存在下での臓器(肺、肝、腹腔)マクロファージ(Mfs)のサイトカイン産生を検討した。また、臓器マクロファージの nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)活性を EMSA で測定した。CLP 後における血中 Corticosterone (Cor) と ACTH 値を測定した。

### 4. 研究成果

PACAP 投与各群において、非投与群と比較し ARDS と致死率が有意に改善した(図 1)。CLP 後においても投与効果を認めた。

血清 HMGB1 は低下し、IL-10 は有意に高値となった。肝臓における TNF- $\alpha$ 発現は低下し、IL-10 発現は増加した。肺では IL-6 発現が低下した(図 2)。

PACAP 存在下での肺胞マクロファージの IL-6 産生は抑制され、肝 Mfs の IL-10 産生は増加した。PACAP により肝 Mfs の NF- $\kappa$ B 活性が有意に低下した(図 3)。

Cor と ACTH は PACAP 投与群において優位に高値であった。

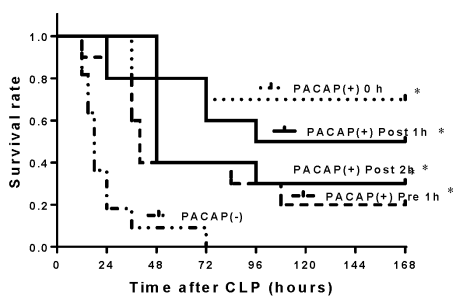


図 1 : PACAP の細菌性腹膜炎における致死率改善

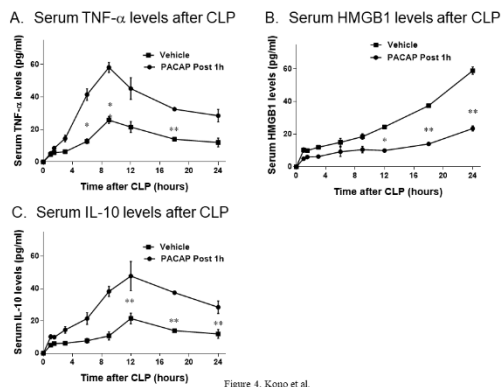


Figure 4. Kono et al.

図 2 : CLP 後の炎症性・抗炎症性メディエーター発現

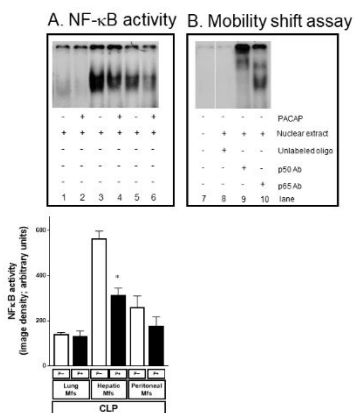


図 3 : PACAP による NF-κB 活性化抑制

【考察】。腹膜炎の治療として、局所の炎症の制御は手術的なドレナージが最も有効であるが、予後に強く寄与する肺や肝臓などの遠隔臓器の障害を制御する有効な薬物治療方法は未だ確立されていない。

本研究の成果は、PACA による細菌性腹膜炎治療の新たな治療手段の開発に繋がる臨床的に非常に重要な研究と考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 河野 寛
2. 発表標題 下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチドによる穿孔性腹膜炎における病態の制御
3. 学会等名 日本消化器病学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河野 寛
2. 発表標題 下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチドによる穿孔性腹膜炎における病態の制御
3. 学会等名 肝細胞研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河野 寛
2. 発表標題 Effects of pituitary adenylyate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on the hepatic macrophages in septic peritonitis in mice
3. 学会等名 アメリカ肝臓学会（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	雨宮 秀武  (AMEMIYA Hidetake)  (70377547)	山梨大学・大学院総合研究部・助教    (13501)	