

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31日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590271

研究課題名（和文） 敗血症におけるインスリンシグナル調節機構の解明

研究課題名（英文） Clarifying the regulatory mechanism of insulin signal in septicemia.

研究代表者

横尾 宏毅（YOKOO HIROKI）

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）・准教授

研究者番号：30332894

研究成果の概要（和文）：敗血症時のインスリンシグナルについて、モデルマウス脳および肺組織で解析した。敗血症時には、受傷からある一定期間までは何らかの自己防衛的機序によりシグナルが増大するが、その後減弱に転じ組織傷害も増大させると考えられた。一方、シグナルを持続的に増加させる活性化薬は組織傷害を軽減させた。生体内には酸化・ニトロ化ストレスを軽減させるため、インスリンシグナルを介した組織損傷保護機構があり、それをうまく利用できれば、症状軽減に役立つと期待された。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the insulin signal in septicemia, using the brain and lung tissue in septic model mice. Until the certain period, insulin signal was increased by some defensive mechanisms. However, the signal was reduced gradually, and the degree of tissue damage was increased. Meanwhile, treatment the drugs which maintain the signal reduced the tissue damage. It was expected that the damage in septicemia would be reduced, if we use the protective system via insulin signal, which reduce the oxidative and nitrative stress.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：炎症・免疫

1. 研究開始当初の背景

(1) 敗血症病態とインスリン抵抗性

敗血症をはじめとする全身性炎症反応疾患においては、ストレスホルモン、サイトカイン産生等による代謝変動の結果として、高血糖症、インスリン作用不全の状態が存在す

る。このインスリン抵抗性は、糖尿病の既往がなくとも高い死亡率を助長するため、早急な改善治療が必要となってくる。ほとんどの全身性炎症反応疾患において、インスリン注入療法は、必須の処置項目とされており、肺胞上皮細胞、血管内皮細胞等においては、炎

症による組織損傷を改善させることが期待されていた。ところが、敗血症病態の各種臓器において、インスリンシグナル経路に異常をきたしていることは十分に推測されていたが、その障害に至る機序、および生体の反応機構についての解析は、不十分であった。

(2) 抗炎症に働くインスリンシグナル

インスリンを含む **growth factor** は、生物の発生期・成長期に必須なシグナルであり、それぞれの特異性により、各種臓器組織が形成されていく。一方、これらは、代謝・成長の側面からだけではなく、細胞の形態・機能を維持するために必須なシグナルでもある。炎症等により細胞が損傷を受け、細胞の形態・機能に異変が生じると、その修復のためにシグナル経路の活性化が必要とされるのはもとより、防御の面からも重要視されている。**Growth factor** シグナル経路の中でも、特に **PI3K-Akt** シグナル経路の活性化は、炎症に関する遺伝子 (**tumor necrosis factor- α** (**TNF- α**) 等) の蛋白質発現を抑制するなど、抗炎症反応経路として注目されていた。このシグナル経路は、チロシンキナーゼ内蔵型である **growth factor receptor** 以外からもシグナルを受けることが知られている。しかしながら、炎症が生じている際に、**PI3K-Akt** を含むインスリンシグナルを減少させるシグナル活性について、あるいはインスリンシグナルがどのような記所を介して組織損傷の進行を防ぐのか、等に関しては、研究開始当初は不明な点が多かった。

2. 研究の目的

敗血症におけるインスリンシグナル経路やそのシグナル伝達分子活性化度の減弱を明らかにしていくことは、治療のための新たな標的分子を探索し、薬物あるいは遺伝子導入によりその分子を活性化あるいは不活性化することができれば、多くの命を救う可能性があると考えられる。

私達は、臨床的に有用性の高い敗血症マウスモデルによる *in vivo* 解析の実験系を用いて、インスリンシグナル活性化レベルと顕微鏡観察による組織損傷程度とを比較しながら、細胞死 (アポトーシス含む) 経路を促進する分子群、あるいはその阻止に大きく関わる分子群について、それら蛋白質の発現量、リン酸化レベル、かつそのシグナル経路について、分子生物学的手法、形態学的手法、化学反応を用いたアッセイ系など、多方面から解析し、敗血症時のインスリンをはじめとしたシグナルクロストーク解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 敗血症モデルマウス作成

セボフルレン吸入麻酔下に、マウス腹部を小切開にて開腹、盲腸部を確認後、その先端部より約 5 mm の部位を結紮、その盲腸先端部に 21 ゲージ注射針を用いて穿刺、2ヶ所穿孔部位を形成後、腹腔内に戻す (CLP 術)。以上のように、人為的に腸内細菌による腹腔内感染症を生じさせることで、腹膜炎からの敗血症となるモデルマウスを作成して解析を進めていく。また、敗血症進行防御に効果があるとされる試薬を、随時経静脈もしくは腹腔内による投与を行い、モデルマウスとの比較検討を行う。

(2) 解析組織サンプル採取

CLP 施術後の経過時間ごとに、セボフルレン吸入麻酔下に、血液サンプルを回収後、ヘパリン入り PBS 緩衝液を用いて組織灌流を十分に行ったあと組織を摘出、顕微鏡による形態学的観察を行うものはホルマリン固定へ、分子生物学的手法による解析を行うものについては、液体窒素で保存後、破砕装置を用いてホモジェナイズ、遠心分離により目的のサンプル画分を採取する。

(3) 血液サンプル解析

血液サンプルについては、CLP 施術後の経過時間ごとに、眼窩静脈よりもしくはセボフルレン吸入麻酔下に開腹後、臓器摘出のための灌流前に下大静脈より、血液ガスについては大動脈より採取する。血液中のインスリン、また、**TNF- α** 、**IL-1 β** 、**IL-6** 等のサイトカインについては、**ELISA** 法による解析を行う。

(4) 顕微鏡下の形態学的解析

敗血症モデルマウスおよび治療マウス臓器組織における組織損傷度、炎症細胞浸潤等の形態変化について、**HE** 染色を用いて解析する。また **TUNEL** 染色を加えることで、組織のアポトーシス進行度を比較検討する。さらに、重要なシグナル分子等について組織免疫染色法を行い、蛍光顕微鏡もしくは共焦点レーザー顕微鏡により観察、記録する。

(5) 分子生物学的解析

インスリンシグナル分子、サイトカイン分子について、リアルタイム **PCR** 法により **mRNA** 量を、ウェスタンブロット法により蛋白質発現量およびリン酸化量を測定する。炎症に関与する **NF- κ B** 等転写因子については、**Electro mobility sift assay** により解析する。

(6) 化学反応アッセイ法等

組織損傷に伴う血管透過性についての評価は、エチジウムブロマイド、sodium fluorescein 等の色素を経尾静脈投与後サンプルを調整し、免疫プレートリーダーを用いて、それぞれ吸光度、蛍光について測定する。また、酸化ストレスの指標として、活性酸素発生に関与する NADPH oxidase 活性について、NADPH を基質としたルシゲニンの化学発光をルミノメーターにより測定解析する。

4. 研究成果

脳および肺組織を中心に解析を進めた。

(1) 脳組織における組織損傷とインスリンシグナルについて

①脳組織の顕微鏡解析

CLP 術より 24 時間経過した脳組織においては、HE 染色において、萎縮、変形、濃染色像を呈する神経細胞が観察された (図 1)。この変性神経細胞は、大脳皮質および海馬の部位で顕著であった。

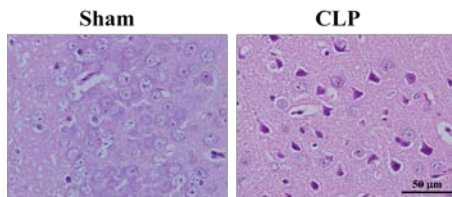


図 1

②脳血管透過性亢進

血液脳関門に及ぼす影響を検討するため、エチジウムブロマイド、sodium fluorescein を使用して、血管機能について解析した。敗血症マウス脳において、貯留色素濃度の増加がみられた (図 2)

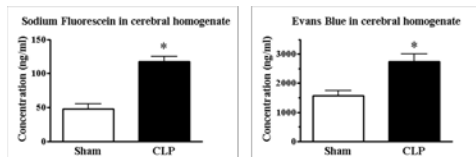


図 2

③脳組織の酸化・ニトロ化ストレス

活性酸素を産生する酵素 NADPH oxidase の活性をルシゲニン化学発光により定量すると、敗血症マウス脳において増加していた (図 3)。さらに、Nitrotyrosine 抗体を用いた組織免疫染色の解析では、敗血症脳で陽性像が観察された (図 4)。一方、ラジカルスカベンジャー、エダラボン投与は、組織傷害を軽減させた。

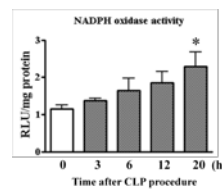


図 3

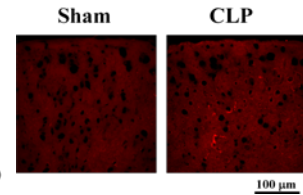


図 4

④脳組織におけるインスリンシグナル

インスリンシグナル分子の Akt および GSK-3β について解析すると、時間経過に伴いリン酸化の増加が認められた (図 5)。これは当初の予想と異なるものであったが、後述の肺組織における検討から考察すると、傷害脳においては、自己防衛的にインスリンシグナルが増大しているものと考えた。

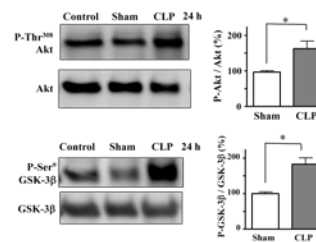


図 5

(2) 肺組織における組織損傷とインスリンシグナルについて

①肺組織の顕微鏡解析

敗血症肺組織においても、組織の損傷が観察されるとともに、アポトーシス増加も観察された。一方、敗血症諸症状を緩和すると報告されていたスタチンあるいは cAMP 活性化薬等の処置により、この組織傷害は軽減した (図 6)。

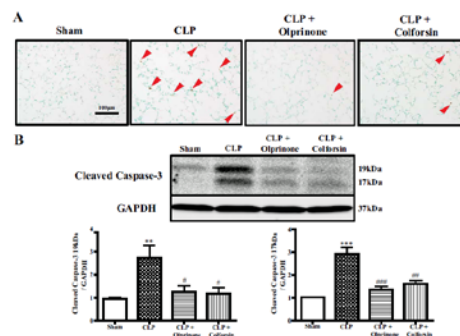


図 6

②肺組織におけるインスリンシグナル

敗血症マウス肺組織におけるシグナル分子の一つ Akt リン酸化は、CLP 術後 3 時間をピークとして一度増加するものの、その後減弱していた。しかし、上記緩和薬を処置しておくこと、Akt リン酸化については、持続していることが認められた (図 7)

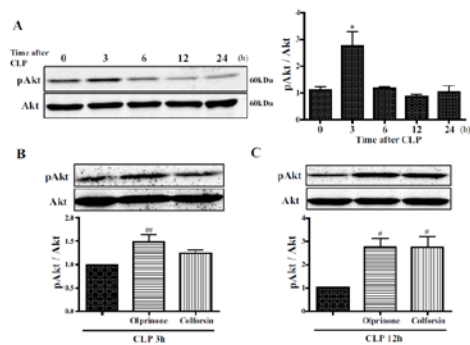


図 7

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)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Oishi H., Takano K., Tomita K., Takebe M., Yokoo H., Yamazaki M., and Hattori Y.: Olprinone and colforsin daropate alleviate septic lung inflammation and apoptosis through CREB-independent activation of the Akt pathway. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* Articles in press, 2012. 査読有.
DOI: [10.1152/ajplung.00363.2011](https://doi.org/10.1152/ajplung.00363.2011)
- ② Tomita K., Takano K., Yokoo H., and Hattori Y.: Novel insights into beneficial consequences of statins in sepsis: anti-inflammatory and anti-apoptotic mechanisms. *Mol. Cell. Pharmacol.*, 3: 67-74, 2011. 査読有.
DOI: [10.4255/mcpharmacol.11.10](https://doi.org/10.4255/mcpharmacol.11.10)
- ③ Kageyama S., Yokoo H., Tomita K., Kageyama-Yahara N., Uchimido R., Matsuda N., Yamamoto S., and Hattori Y.: High glucose-induced apoptosis in human coronary artery endothelial cells involves up-regulation of death receptors. *Cardiovasc. Diabetol.*, 10: 73, 2011. 査読有.
DOI: [10.1186/1475-2840-10-73](https://doi.org/10.1186/1475-2840-10-73)
- ④ Takano K., Yamamoto S., Tomita K., Takashina M., Yokoo H., Matsuda N., Takano Y., and Hattori Y.: Successful treatment of acute lung injury with pitavastatin in septic mice: potential role of glucocorticoid receptor expression in alveolar macrophages. *J.*

Pharmacol. Exp. Ther., 336: 381-390, 2011. 査読有.

DOI: [10.1124/jpet.110.171462](https://doi.org/10.1124/jpet.110.171462).

- ⑤ Jesmin S., Mowa CN., Sultana SN., Mia S., Islam R., Zaedi S., Sakuma I., Hattori Y., Hiroe M., and Yamaguchi N.: Estrogen receptor alpha and beta are both involved in the cerebral VEGF/Akt/NO pathway and cerebral angiogenesis in female mice. *Biomed. Res.*, 31: 337-346, 2010. 査読有.
DOI: [10.2220/biomedress.31.337](https://doi.org/10.2220/biomedress.31.337)
- ⑥ Hattori Y., Takano K., Teramae H., Yamamoto S., Yokoo H., and Matsuda N.: Insights into sepsis therapeutic design based on the apoptotic death pathway. *J. Pharmacol. Sci.*, 114: 354-365, 2010. 査読有.
DOI: [10.1254/jphs.10R04CR](https://doi.org/10.1254/jphs.10R04CR)
- ⑦ Matsuda N. Teramae H. Futatsugi M., Takano K., Yamamoto S., Tomita K., Suzuki T. Yokoo H., Koike K., and Hattori Y.: Up-regulation of histamine H₄ receptors contributes to splenic apoptosis in septic mice: counteraction of the antiapoptotic action of nuclear factor-κB. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 332: 730-737, 2010. 査読有.
DOI: [10.1124/jpet.109.163543](https://doi.org/10.1124/jpet.109.163543).
- ⑧ Zhang XH., Yokoo H., Nishioka H., Fujii H., Matsuda N., Hayashi T., and Hattori Y.: Beneficial effect of the oligomerized polyphenol oligonol on high glucose-induced changes in eNOS phosphorylation and dephosphorylation in endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.*, 159: 928-938, 2010. 査読有.
DOI: [10.1111/j.1476-5381.2009.00594.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00594.x)
- ⑨ Matsuda N., Yamamoto S., Yokoo H., Tobe K., and Hattori Y.: Nuclear factor-kappaB decoy oligodeoxynucleotides ameliorate impaired glucose tolerance and insulin resistance in mice with cecal ligation and puncture-induced sepsis. *Crit. Care Med.* 37, 2791-2799, 2009. 査読有.
DOI: [10.1097/CCM.0b013e3181ab844d](https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181ab844d)

[学会発表] (計 20 件)

- ① 富田賢吾, 高野健一, 高階道徳, 横尾宏毅, 服部裕一: エンドトキシン局所投与による急性肺炎症に対する NF- κ B おとり核酸経鼻投与の効果. 第 85 回日本薬理学会年会, 2012, 3, 14-16, 京都.
- ② 横尾宏毅, 山本誠士, 服部裕一: 敗血症マウス脳組織における NADPH オキシダーゼ活性増加と組織病理学的変化との関係. 第 85 回日本薬理学会年会, 2012, 3, 14-16, 京都.
- ③ 高階道徳, 富田賢吾, 横尾宏毅, 服部裕一: レスベラトロールは敗血症マウス肺組織において SIRT-1 を賦活化し肺炎症・アポトーシスを緩和する. 第 85 回日本薬理学会年会, 2012, 3, 14-16, 京都.
- ④ 横尾宏毅, 山本誠士, 富田賢吾, 影山俊一郎, 服部裕一: II 型糖尿病マウスにおける冠血管内皮にみられた Death 受容体の発現. 第 62 回日本薬理学会北部会, 2011, 9, 29-30, 仙台.
- ⑤ 富田賢吾, 高野健一, 高階道徳, 山本誠士, 横尾宏毅, 服部裕一: 敗血症マウスでの肺炎症およびアポトーシスに対する NF- κ B デコイ核酸気管内投与の効果. 第 62 回日本薬理学会北部会, 2011, 9, 29-30, 仙台.
- ⑥ 大石博史, 高野健一, 富田賢吾, 武部真理子, 横尾宏毅, 山崎光章, 服部裕一: マウス敗血症性急性肺傷害における olprinone と colforsin の治療効果には Akt 活性が関与する. 第 62 回日本薬理学会北部会, 2011, 9, 29-30, 仙台.
- ⑦ 大石博史, 高野健一, 横尾宏毅, 武部真理子, 服部裕一, 山崎光章: マウス敗血症性急性肺傷害におけるオルプリノンの効果. 日本麻酔科学会第 58 回学術集会, 2011, 5, 19-21, 神戸.
- ⑧ Yokoo H., and Hattori Y.: Histopathological changes in septic mouse brain: effect of the free-radical scavenger edaravone. *Experimental Biology* 2011, 2011, 4, 9-13, Washington DC.
- ⑨ 横尾宏毅, 山本誠士, 千葉政一, 相良洋, 富田賢吾, 高野健一, 高階道徳, 松田直之, 服部裕一: 敗血症マウス脳におけるニトロ化ストレス増加と神経細胞変性. 第 84 回日本薬理学会年会, 2011, 3, 誌上.
- ⑩ 富田賢吾, 高野健一, 高階道徳, 横尾宏毅, 服部裕一: 臨床診断に使用される敗血症バイオマーカーの盲腸結紮穿孔誘発性敗血症マウスでの血中濃度の変化. 第 84 回日本薬理学会年会, 2011, 3, 誌上.
- ⑪ 高野健一, 富田賢吾, 横尾宏毅, 服部裕一: クロモグリク酸ナトリウム気管内投与による敗血症マウス肺組織の炎症関連サイトカイン遺伝子に対する効果. 第 84 回日本薬理学会年会, 2011, 3, 誌上.
- ⑫ 横尾宏毅, 根本隆行, 柳田俊彦, 山本誠士, 富田賢吾, 高野健一, 服部裕一: 脳神経細胞におけるインスリンシグナル: 恒常性維持のためのシグナル変動. 第 38 回薬物活性シンポジウム, シンポジウム「中枢神経系とストレス応答」, 2010, 11, 11-12, 札幌.
- ⑬ 富田賢吾, 高野健一, 山本誠士, 横尾宏毅, 松田直之, 服部裕一: 敗血症マウスにおける心臓及び肺でのリモデリング関連分子の遺伝子発現の検討. 第 61 回日本薬理学会北部会, 2010, 9, 10, 札幌.
- ⑭ 横尾宏毅, 山本誠士, 高野健一, 富田賢吾, 千葉政一, 山崎弘美, 高階道徳, 松田直之, 服部裕一: 敗血症マウスモデル脳組織における脳血液関門透過性亢進に伴う神経細胞変性. 第 61 回日本薬理学会北部会, 2010, 9, 10, 札幌.
- ⑮ Takano K., Yamamoto S., Tomita K., Yamazaki H., Yokoo H., Takano Y., and Hattori Y.: Pitavastatin improves lung inflammation and survival in septic mice: prevention of reduced lung glucocorticoid receptors. *WorldPharma 2010 16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology*, 2010, 7, 17-23, Copenhagen.
- ⑯ 富田賢吾, 高野健一, 山本誠士, 内御堂亮, 横尾宏毅, 松田直之, 畠山登, 山崎光章, 服部裕一: 敗血症マウスにおける心リモデリングに寄与する分子群の発現変化に対するピタバスタチンの効果. 第 83 回日本薬理学会年会, 2010, 3, 16-18, 大阪.
- ⑰ 横尾宏毅, 山本誠士, 千葉政一, 富田賢吾, 高野健一, 島田達生, 松田直之, 服部裕一: 多菌性敗血症マウスモデルにおける脳組織の形態学的解析. 第 83 回日本薬理学会年会, 2010, 3, 16-18, 大阪.
- ⑱ 高野健一, 山本誠士, 富田賢吾, 山崎弘

美, 横尾宏毅, 高野康雄, 服部裕一: ピタバスタチンによるマウスの敗血症性肺損傷軽減にはグルコシルチコイド受容体減少の阻止が関与する. 第83回日本薬理学会年会, 2010, 3, 16-18, 大阪.

①9 富田賢吾, 高野健一, 山本誠士, 横尾宏毅, 松田直之, 畠山登, 山崎光章, 服部裕一: 多菌性敗血症モデルでの心筋リモデリング関連分子の変化に対する pitavastatin の治療効果. 第19回日本循環薬理学会, 2009, 11, 27, 京都.

②0 高野健一, 富田賢吾, 山本誠士, 山崎弘美, 横尾宏毅, 高野康雄, 服部裕一: マウス敗血症性急性肺損傷におけるピタバスタチンの抗炎症作用とそのメカニズム. 第60回日本薬理学会北部会, 2009, 9, 26, 富山.

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/pharma/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横尾 宏毅 (YOKOO HIROKI)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・
准教授

研究者番号 : 30332894

(2) 研究分担者

服部 裕一 (HATTORI YUICHI)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・
教授

研究者番号 : 50156361

山本 誠士 (YAMAMOTO SEIJI)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・
助教

研究者番号 : 10456361