

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2013

課題番号：23790304

研究課題名（和文）敗血症病態におけるアドレナリン β 3 受容体機能の解明研究課題名（英文）The role of β 3 adrenoceptor in sepsis symptom

研究代表者

沓掛 真彦（KUTSUKAKE MASAHIKO）

東京薬科大学・薬学部・医療衛生薬学科・助教

研究者番号：50459723

研究成果の概要（和文）：

本研究は敗血症病態におけるアドレナリン β 3 受容体の機能を解明し、敗血症による死亡率を減少することを目的として行われた。その結果、マウス脂肪に発現するアドレナリン β 3 受容体は敗血症発症後、発現が減少すること、脂肪細胞に対するアドレナリン β 3 受容体刺激薬の処置は敗血症動物腹腔液により誘導される炎症性サイトカインの発現を抑制する事などを見出した。これはこの受容体が敗血症時、炎症を抑制する役割を持つ可能性を示す。また、PPAR γ 活性化薬の前投与が敗血症動物の死亡率を減少させる原因の一部を見出すことができた。

研究成果の概要（英文）：

In this study we tried to demonstrate the role of β 3 adrenoceptor in sepsis. The expression of β 3 adrenoceptor in adipose tissue was decreased in sepsis-induced mice. The expression of septic peritoneal fluids induced inflammatory cytokine in cultured adipocyte was suppressed by β 3 adrenoceptor stimulator pretreatment. These results suggested that the β 3 adrenoceptor has a possibility of anti-inflammatory role in inflammatory condition. Addition, in this study, we found the one of the reasons that the effect of PPAR γ activator pretreatment in sepsis models.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
交付決定額	3400000	1020000	4420000

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：敗血症、アドレナリン β 3 受容体

1. 研究開始当初の背景

侵襲の大きな外科手術では術後に感染症が起きる可能性がある。この時、敗血症状態に症状が移行すると、その死亡率は高いことが知られている。近年においても集中治療領域における術後感染症発症が原因となる敗血症患者の死亡率は約 25%と高く、この症状の予防、緩和法の開発は患者救命の観点からも課題の一つとなっている。

これまでに動物実験により数種の薬剤、も

しくは遺伝子改変によって敗血症を緩和、もしくは進行を抑制できることが報告されている。この中に HMG-CoA 還元酵素阻害薬の投与や、PPAR γ 活性化薬の投与により敗血症症状が改善されるという報告がある。これら薬剤の敗血症症状改善効果の原因は完全には明らかとなっていない。我々はこの原因の一端にアドレナリン β 3 受容体が関与するのではないかと考えた。

アドレナリン β 3受容体は脂肪組織、膀胱、心筋などに発現している Gs タンパク共役型

の受容体である。この受容体はこれまで脂肪組織において脂肪代謝に関わる受容体として認識されていた。脂肪組織は交感神経支配臓器であり、交感神経興奮時にはアドレナリンβ3 受容体活性化を介して細胞内の脂肪分解系が活性化、遊離脂肪酸等が分泌されることが知られている。近年になって、このアドレナリンβ3 受容体シグナルが脂肪細胞における脂肪分解のみならず、炎症性サイトカインの産生に関わることが報告された。

我々は、脂肪組織が敗血症発症、または病態に関与していると推察し検討を行ってきた。脂肪組織は近年、免疫調節器官、及び内分泌組織として注目されている。脂肪組織は遊離脂肪酸のみならず、抗炎症性サイトカインや炎症性サイトカインの両者を分泌しており、全身炎症に関わると考えることができる。特に全身炎症の敗血症症状を改善する作用を持つ PPARγ活性化薬が培養脂肪細胞のアドレナリンβ3 受容体発現を低下させるという報告もあり、PPARγ活性化薬の敗血症症状改善効果との関連を予想させる。しかしながら、これまでに敗血症症状におけるアドレナリンβ3 受容体の関与については報告が無く、詳細は不明なであった。本研究では、このアドレナリンβ3 受容体の生理的機能が敗血症病態への関与について検討を行った。

2. 研究の目的

本研究は敗血症病態におけるアドレナリンβ3 受容体の機能を解明する事により、外科手術などの後に起こりうる細菌感染による敗血症の患者救命率の上昇を目指す。アドレナリンβ3 受容体は脂肪細胞に多く存在しており、通常時は脂肪の分解を行い、エネルギー産生、熱産生に関り、他のアドレナリン受容体とは異なる生理作用を持つ。そのため、敗血症病態におけるアドレナリンβ3 受容体の機能を解明する事は、他のアドレナリン受容体の機能による心血管機能強化を目的とした敗血症時の対処にプラスする効果を得る可能性につながると考えている。

3. 研究の方法

本研究では敗血症病態におけるアドレナリンβ3 受容体機能の調査を行った。また、敗血症モデルの生存率についてアドレナリンβ3 受容体機能を調節する薬物による調節の可能性についても検討を行った。計画した研究項目は以下のとおりである。

- (1) 敗血症モデル動物の組織におけるアドレナリンβ3 受容体発現の検討

7週齢雄性 C57B/6 マウスに盲腸穿刺結紮術

を行い敗血症マウスの作成後、3 ～ 24 時間の間で経時的に脂肪組織を採取した。採取した脂肪組織から mRNA を抽出し、リアルタイム PCR 解析法によりアドレナリンβ受容体 3 種の発現量を解析した。また、脂肪組織採取時に採血を行い、敗血症発症後の血清中アドレナリン濃度、遊離脂肪酸濃度を測定した。

- (2) 敗血症モデル動物の組織液がヒト脂肪細胞に与える影響に対するアドレナリンβ3 受容体機能の解明

盲腸穿刺結紮術にて敗血症モデルマウスを作成 24 時間後にマウスより腹腔液の回収を行った。回収した腹腔液はマウス 3T3L-1 細胞を分化させた培養脂肪細胞に処置を行った。この時、培養脂肪細胞にはアドレナリンβ3 刺激薬である CL316243、もしくはアドレナリンβ3 受容体遮断薬である SR59230A を腹腔液処置 30 分前に処置している。腹腔液処置 1 時間の時点で培養脂肪細胞の回収を行い、mRNA を抽出の後、リアルタイム PCR 法にて炎症性サイトカインの発現量を解析した。

- (3) 敗血症モデル動物の生存率に対するアドレナリンβ3 受容体作動薬、遮断薬の効果の検討

盲腸穿刺結紮術により作成した敗血症モデルマウスにアドレナリンβ3 受容体刺激薬、及び受容体遮断薬を投与し、敗血症動物の生存率を上昇させる条件を探索する。本検討ではアドレナリンβ3 受容体刺激薬、遮断薬を敗血症誘導 3 日前から腹腔内投与を行い、その効果を敗血症誘導後の死亡率を観察する事で評価した。

また、予定通り検討が進まない事を考え以下の検討も並行して進めた。

- (4) PPARγ活性化薬による敗血症モデル動物の救命効果と脂肪組織構成細胞との関連

PPARγ 活性化薬であるピオグリタゾンを用いて 1 日当たり 10 mg/kg を 7 日間腹腔内投与した。投与後、盲腸穿刺結紮術にて敗血症マウスを作成した。術後 24 時間の時点で、肺、脂肪組織を採取し、リアルタイム PCR 法によるマクロファージマーカーの mRNA 発現量解析、組織切片による炎症シグナルの解析等を行った。

4. 研究成果

- (1) 敗血症モデル動物の組織におけるアドレナリンβ3 受容体発現の検討

マウスへの盲腸穿孔結紮術により敗血症を発症させ、脂肪組織におけるアドレナリンβ受容体の経時的発現変化を観察した。その結果、アドレナリンβ1、β2受容体は一時的に大きな発現変化が観察されたが、術後24時間の時点では大きな変化はなかった。対して、アドレナリンβ3受容体は術後6時間より有意な発現の低下が観察され、その後24時間まで有意な発現の低下が持続した(図1)。

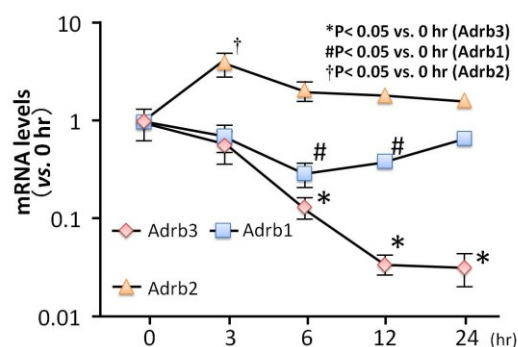


図1. 脂肪組織におけるアドレナリンβ受容体発現の変化
盲腸穿孔結紮術後、各時間において脂肪組織を採取、mRNA発現量を測定した。

この結果は敗血症時においてアドレナリンβ3受容体機能を調節する事により敗血症症状の状態を変化させることができることを想起させた。また、敗血症発症24時間後における血清中アドレナリン濃度、血清中遊離脂肪酸濃度は敗血症前の約6倍に増加している事が確認された(図2)。

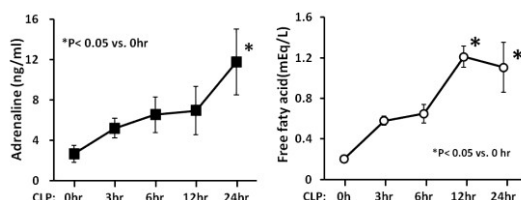


図2. 敗血症マウス血清中アドレナリン、遊離脂肪酸濃度
盲腸穿孔結紮術後、各時間において血清を採取、各因子の濃度を測定した。

遊離脂肪酸はアドレナリン刺激によりアドレナリンβ3受容体を介して脂肪組織より分泌されるため、この点においても敗血症症状にアドレナリンβ3受容体が関与する事が考えられた。

(2) 敗血症モデル動物の組織液がヒト脂肪細胞に与える影響に対するアドレナリンβ3受容体機能の解明

3T3L-1細胞を分化させた培養脂肪細胞においてアドレナリンβ3受容体発現が、分化前と比較して100倍に上昇している事を確認している。この培養脂肪細胞に対し、敗血症動物腹腔液の処置は、処置1時間の時点で炎症

性サイトカインであるTNFαの発現を170倍に上昇させた。対して、培養脂肪細胞へのCL316243 100 nMの処置30分後に腹腔液を処置した場合、TNFα発現は有意に低下していた。この発現の低下はSR59230A 10 μMの共処置により部分的に抑制された(図3)。

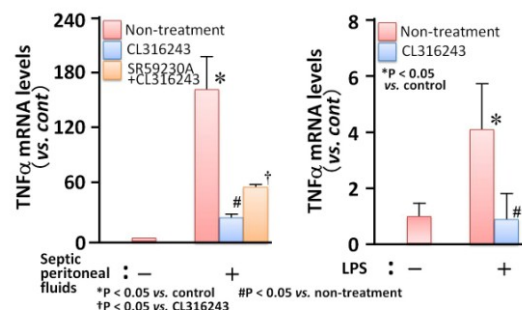


図3. 敗血症動物腹腔液処置により誘導される炎症性サイトカイン発現に対するアドレナリンβ3受容体刺激薬の効果
盲腸穿孔結紮術後24時間の時点で腹腔液を回収し、培養脂肪細胞に処置を行った。1時間後、mRNAを回収、解析をおこなった。また、CL316243は腹腔液処置1時間前より培養脂肪細胞に処置を行っている。

また、アドレナリンβ3受容体を同様に刺激しておくことにより、LPS刺激によるTNFα発現の上昇も抑制する事ができた。この結果はアドレナリンβ3受容体刺激により脂肪組織の炎症を抑制されることを推察させた。

(3) 敗血症モデル動物の生存率に対するアドレナリンβ3受容体作動薬、遮断薬の効果の検討

アドレナリンβ3受容体刺激薬を動物に予め腹腔内投与し、敗血症を誘導する事で敗血症症状の悪化防止を試みた。敗血症誘導後、一週間までの死亡率を観察することで評価を行った。しかしながら、現在のところアドレナリンβ3受容体刺激薬 CL316243 3mg/kgもしくはSR59230A 1mg/kgの3日間の腹腔内投与では敗血症誘導後の死亡率を改善できなかった。現在、生存率を上昇させることができる投与条件を探索中であり、今後も検討を続ける必要がある。

本検討では敗血症動物においてアドレナリンβ3受容体の発現が脂肪組織において減少している事、アドレナリンβ3受容体刺激薬が敗血症動物腹腔液により誘導される炎症性サイトカインの発現を抑制する事を見出すことができた。このことは、アドレナリンβ3受容体が脂肪組織において、炎症調節機能の一部を担っており、敗血症時にはその発現が減少する事により全身炎症が悪化する可能性が考えられる。残念ながら、本研究期間中において、アドレナリンβ3受容体機能調節薬を用いた敗血症症状の改善法を見出すことができなかったが、検討を続けることによりこの受容体を利用した敗血症症状の緩和

法を見出したいと考えている。

(4) PPAR γ 活性化薬による敗血症モデル動物の救命効果と脂肪組織構成細胞との関連

我々はこれまでに PPAR γ 活性化薬であるピオグリタゾン Maus 腹腔内に 7 日間前投与しておくことで敗血症誘導後の死亡率を減少させることができることを示している。ここでは、この死亡率減少効果と脂肪組織の関連について検討した。敗血症誘導 24 時間後の Maus 腹腔内脂肪組織では iNOS、CD163、IL-10 等の炎症誘導性 M1 マクロファージ (iNOS)、及び炎症抑制性 M2 マクロファージ (CD163、IL-10) のマーカー遺伝子が増加していたが、ピオグリタゾン投与動物ではそれら遺伝子がさらに増加している傾向にあった (図 4)。

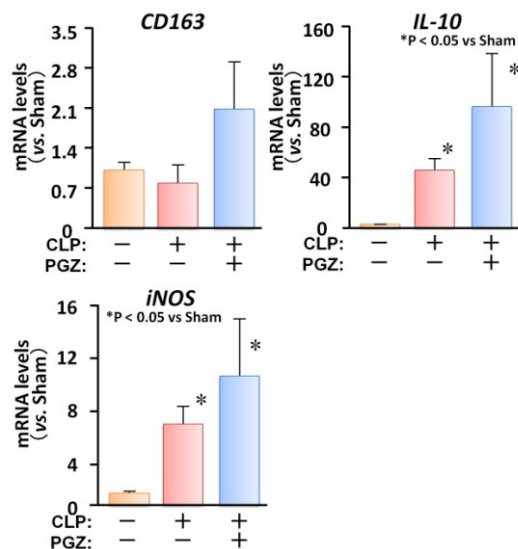


図 4. 敗血症動物脂肪組織における炎症性/炎症抑制性マクロファージマーカーの発現
盲腸穿孔結紮術後、24 時間の時点で脂肪組織より mRNA を回収し、解析を行った。

各遺伝子の発現には正の相関がみられるため、ピオグリタゾン投与動物では脂肪組織に通常時よりも多くのマクロファージが存在していることが考えられる。

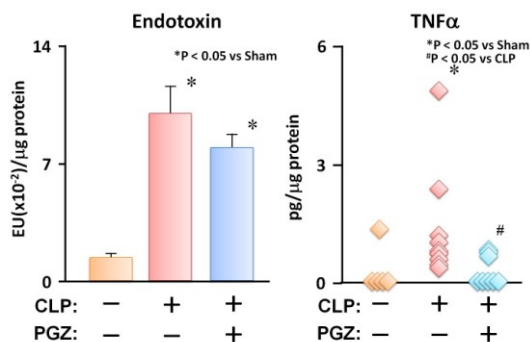


図 5. 敗血症動物腹腔液におけるエンドキシン活性と TNF α 濃度
盲腸穿孔結紮術後、24 時間の時点で動物より腹腔液を回収し、各因子の測定を行った。

このとき、腹腔液中のエンドトキシン活性はピオグリタゾン投与群と非投与群では変化が無いが、腹腔液中の TNF α 濃度はピオグリタゾン投与群で有意に低下していた (図 5)。

これらの結果は脂肪組織内におけるマクロファージ等の構成細胞が PPAR γ 活性化により変更され、腹腔内組織の炎症状態が抑制されたことを考えさせる。

敗血症時には体内で上昇した炎症性サイトカインが血液により循環し、炎症発症部位とは別の組織においても炎症正性障害を引き起こすことが分かっている。本検討では肺組織障害について着目し検討を行った。肺組織切片に対し、ヘマトキシリン-エオジン染色を適用した結果、敗血症 Maus 肺組織は通常 Maus と比較して肺泡構造の破壊、及び血球細胞の浸潤と思われる肥厚化が観察された。それに対してピオグリタゾン前投与 Maus では、敗血症による肺組織構造の変化が少なかった (図 6)。

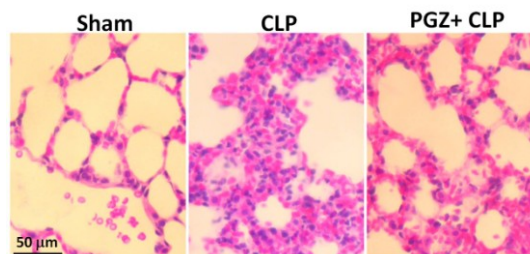


図 6. 敗血症動物肺組織像
盲腸穿孔結紮術後、24 時間の時点で動物より肺組織を回収、組織切片を作成し、ヘマトキシリン-エオジン染色を行った。

この時、敗血症 Maus 肺組織においてアポトーシス細胞が観察されたが、ピオグリタゾン前処置群ではアポトーシス細胞が減少傾向であった。また、炎症シグナルの伝達因子である JNK が敗血症 Maus 肺組織で活性化していたが、ピオグリタゾンの前処置はこの活性化も抑制していた (図 7)。

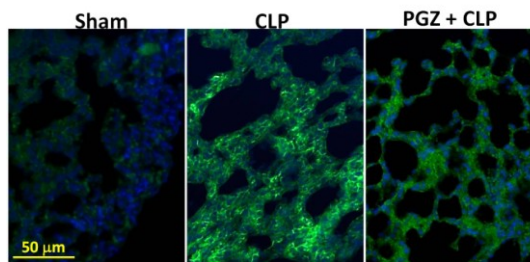


図 7. 敗血症動物肺組織における炎症シグナルの活性化
盲腸穿孔結紮術後、24 時間の時点で動物より肺組織を回収、組織切片を作成し、リン酸化 JNK の染色を行った。
図中、青: 核、緑: リン酸化 JNK

この結果は PPAR γ 活性化薬による敗血症モデル Maus の救命効果は、脂肪組織中に炎症抑制性細胞を増加し、腹腔組織の炎症を抑制する事により肺障害に代表される全身炎症症状を抑制する事により示されることを推察

させる。

ピオグリタゾンとは本邦において使用されている唯一の PPAR γ 活性化薬である。この薬物により敗血症症状を緩和する方法が確立する事ができれば、本邦における敗血症による死亡者数を減少させることができると考えている。本研究期間で見出すことができた結果はピオグリタゾン前投与による敗血症症状緩和作用の機序の一旦であると考えており、今後は脂肪組織のみならず、他の臓器の炎症に対する効果についても検討したいと考えている。

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)

〔学会発表〕(計 5 件)

杓掛 真彦、田村 和広、小林 誠人、堀江 まなみ、辻村 行啓、立川 英一、松谷 毅、松田 明久、笹島耕二

盲腸結紮穿刺術により誘導される腹腔内炎症物質の作用に対する PPAR γ 活性化薬の作用

第 123 回 日本薬理学会関東部会

2011 年 10 月 15 日

千葉県・日本大学薬学部

杓掛 真彦、田村 和広、小林 誠人、堀江 まなみ、辻村 行啓、吉江 幹浩、立川 英一、松谷 毅、笹島耕二

敗血症動物の腹腔内炎症物質の作用に対する PPAR γ 活性化薬の効果

日本薬学会 第 132 年会

2012 年 3 月 30 日

北海道・北海道大学

M. Kutsukake, M. Kobayashi, K. Tamura, M. Yoshie, E. Tachikawa, A. Matsuda, E. Uchida, and T. Matsutani

PPAR γ activator may improve sepsis symptom by inhibiting inflammation in adipose tissue

15th International Congress of Endocrinology, 14th European Congress of Endocrinology (ICE/ECE 2012)

2012 年 05 月 05 日～2012 年 05 月 09 日

Florence・Fortezza da Basso, Italy

小林誠人、杓掛真彦、田村和広、吉江幹浩、立川英一

脂肪細胞における TNF α 発現に対するアドレナリン β 3 受容体刺激の効果

第 126 回 日本薬理学会関東部会

2012 年 07 月 14 日

東京都・北里大学薬学部

杓掛真彦、小林誠人、田村和広、松谷毅、松田明久、内田英二、吉江幹浩、立川英一
敗血症時の脂肪炎症及び肺障害に対するピオグリタゾン前投与の効果

第 86 回 日本薬理学会年会

2013 年 03 月 21 日～2013 年 03 月 23 日

福岡県・福岡国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杓掛 真彦 (KUTSUKAKE MASAHIKO)

東京薬科大学・薬学部・医療衛生薬学科・助教

研究者番号：50459723