

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670783

研究課題名(和文) 吸入インスリンのARDS治療への応用の可能性の検討

研究課題名(英文) Effects of inhaled aerosolized insulin on acutely injured lungs.

研究代表者

中澤 弘一 (NAKAZAWA, KOICHI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：10207756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：高血糖下の急性肺傷害において、インスリンの気道吸入は炎症反応を抑制する。その効果が血糖降下によるのかインスリンの直接的抗炎症作用なのかを明らかにするために、今回は正常血糖でのインスリンの効果を検討した。肺洗浄によるウサギ急性肺傷害モデルでインスリン吸入を行った。6時間後に肺を摘出してBALF細胞および肺組織のIL-8, TLR-4, ENaCなどを測定し、生食吸入群と比較した。今回のモデルでは、インスリンによる有意な炎症反応の抑制は認めなかった。しかし肺胞水クリアランスに関与するENaCの発現はインスリンにより維持され、肺傷害からの回復に好ましい影響をもたらすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study is to clarify whether insulin exerts anti-inflammatory effects in acute lung injury under normoglycemia. Lung injury was induced by lung lavage. Mechanically ventilated rabbits were treated with either aerosolized insulin or saline. After 6 hours of treatment, the lungs were excised en bloc, and then we examined IL-8, TLR-4, or ENaC mRNA expression in BALF cells or lung tissue. Aerosolized insulin failed to ameliorated inflammatory responses under normoglycemia, however, the tissue levels of mRNA expression of ENaC were maintained by insulin. The results suggest that insulin might contribute to the lung fluid clearance via expression of epithelial sodium channel.

研究分野：麻酔・集中治療医学

キーワード：acute lung injury insulin blood glucose ARDS

1. 研究開始当初の背景

(1) 重症患者では、血糖管理を綿密にすることにより、予後を改善できる()。高血糖は、免疫能の低下・感染増悪・酸化ストレスの増加をきたすが、重症患者での血糖管理が、どのような機序で予後に影響を及ぼしているかは明らかにされていない。敗血症では高血糖により、全身の炎症反応の増悪をきたすが、動物実験では肺内の炎症マーカーを上昇させることも示されている()。その一方で糖尿病患者ではARDSの発症率が低いというデータがある()。そのメカニズムについては、糖尿病患者の治療に用いられている治療薬が有利に働いているという指摘もある。我々は最近、高血糖が肺傷害に与える影響とインスリンの効果を調べたところ、高血糖が肺傷害を増悪する一方で、インスリンは肺傷害を軽減することを明らかにした()。高血糖は肺の炎症反応を増悪し、インスリンは経気道的に吸入させると血糖降下作用のみならず、抗炎症作用をもたらす、肺浮腫軽減させることが示唆された。

(2) インスリンには肺胞内の水分調節に関わるNa-K ATPaseなどを活性化することを示唆する報告もある()。インスリンに肺胞浮腫抑制作用あるいは肺胞水クリアランス促進があるならば急性肺傷害の軽減あるいは回復にも恩恵があるかもしれない。我々のこれまでの研究では血糖値のレベルが高く(450mg/dl前後)、そのような炎症が増悪した悪条件下でのインスリンの効果を検討していたので、純粋なインスリンの効果を判定するために正常レベルの血糖値でインスリンの効果を再検討する必要があると考えた。

2. 研究の目的

(1) 今回は肺洗浄による急性肺障害モデルを作成し、血糖降下作用をきたさない吸入インスリン投与を行い、正常血糖での吸入インスリンの血糖降下作用によらない純粋な抗炎症作用を解明する。

(2) インスリンが、肺病変からの回復例えば血管外水分のクリアランスに何らかの効果がないかを調べ、ARDS治療における意義を明らかにする。

3. 研究の方法(図1)

(1) ウサギをコントロール群(C群)とインスリンエアロゾル吸入群(I群)に無作為割付し、肺洗浄による急性肺傷害モデルを作成し

た。インスリンの至適投与量はdose-response curveより検討し、I群では1IU/kgのインスリンを、C群は同量の生食を3時間毎に吸入させることとし、2%ブドウ糖を8ml/kg/hrで投与しながら、血糖値を正常(80-180mg/dl)に保った。6時間後に肺を摘出し、肺傷害作成前と実験終了時の肺胞洗浄液(BALF)中のInterleukin-8(IL-8), Toll様受容体4(TLR-4), 組織中のepithelial sodium channel alpha (ENaC), SGK-1, TGF- β 1, KGfを測定した。それ以外の肺傷害の評価として肺水分量(肺乾湿重量比)さらに肺組織所見により肺傷害スコアを比較検討した。

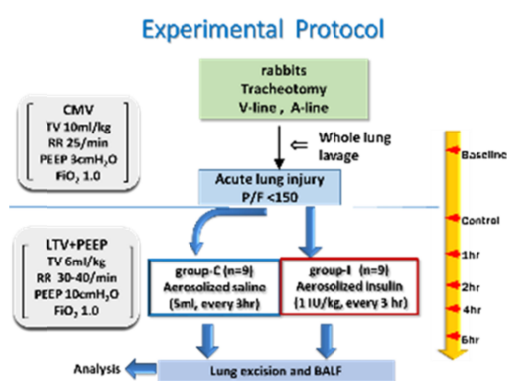


図1 実験プロトコール

(2) これまでに、肺に局限した病態(炎症)に対する高血糖やインスリン療法の影響について調べた研究は少ない。また、ラットやマウスのような小動物ではネブライザーを用いた気道への吸入の効率が悪く、本治療の効果を確認できないであろう。ヒト新生児にほぼ匹敵するウサギを用い、臨床にて一般使用されている人工呼吸器を用いて実験を行う。ARDSにおいて経気道的にインスリンを吸入させることでより選択的に抗炎症作用や肺水腫軽減作用をもたらすことができれば、ARDS治療の補助として有望であると思われる。

4. 研究成果

(1) 肺洗浄によりPaO₂/FiO₂ (P/F ratio)は150未満に低下したが10cmH₂OのPEEPを加えることにより有意に上昇した。血糖値は治療開始6時間の間インスリン吸入群、生食吸入群ともにほぼ同様の経過をたどった(図2)。

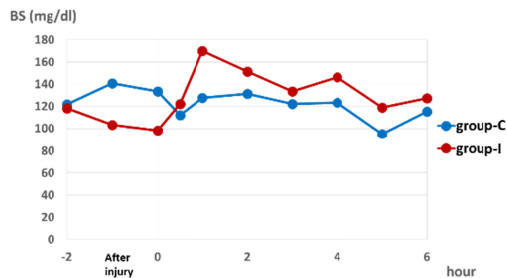


図2：血糖値の推移

(2) BALF細胞および肺組織のIL-8、TLR-4の mRNA発現について

肺傷害によってBALF細胞および肺組織のIL-8の発現は増強し、インスリン吸入でやや発現が抑制されたが、これは有意ではなかった(図3)。また肺組織でも有意差を認めなかった。TLR-4の発現については肺傷害による発現は軽度でインスリン吸入による効果もそれほど認めなかった。

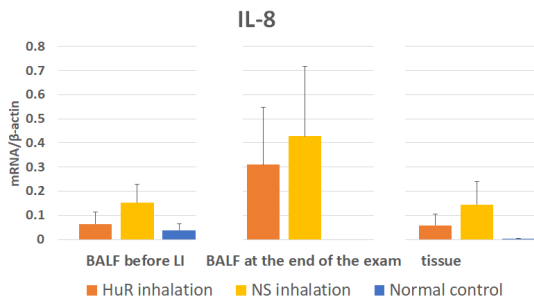


図3：BALF細胞および肺組織のIL-8発現

(3) BALF細胞のepithelial sodium channel alpha (ENaC)発現

生食吸入群ではENaC-の発現が有意に抑制されていたが、インスリン吸入群では発現が保たれていた(図4)。このことはインスリン吸入によりENaC-の活性が保たれ、肺胞内水分のクリアランスに有利に働く可能性を示唆すると考える。

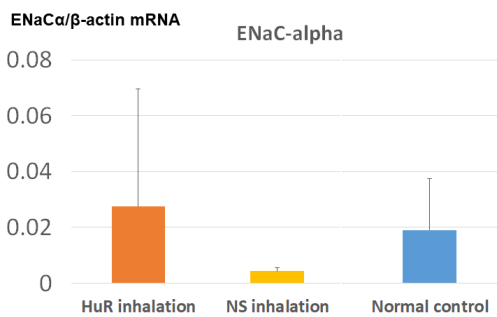


図4 BALF細胞のENaC 発現

(4) 肺組織傷害スコアと肺乾湿重量比
肺傷害の項目を好中球の肺胞及び間質浸潤、硝子膜形成、浮腫とし、傷害の強さを0-2点の3段階でスコア化し検討してみた。生食吸入群ではインスリン吸入群よりも有意に肺傷害が増強していた(図5)。肺乾湿重量比については両群で差を認めなかった。

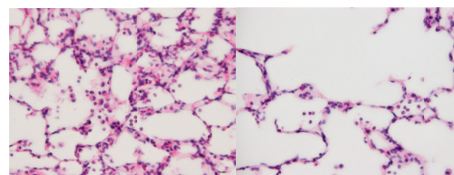
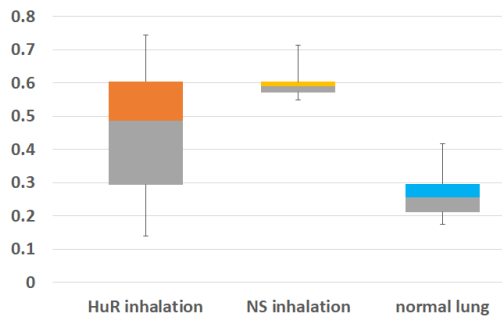


図5 肺傷害スコア(上)と組織所見(下)

(5) まとめと考察

今回の正常血糖モデルでは肺傷害によって引き起こされる炎症因子のmRNA発現も lung injury scoreは顕著ではなかった。インスリン吸入が当初予想していたほどの抗炎症作用を示さなかった原因は2点考えられる。1つは低血糖をきたさない程度のインスリンの投与量がまず挙げられる。以前の高血糖モデルで投与していた投与量に比べてかなり低用量であった。2つ目は今回のモデルでは、肺傷害の結果生じた炎症反応が弱かったことである。その理由として、血糖値が正常レベルに調節されていたこと、さらに今回の肺傷害では低1回換気量(6ml/kg)と適度なPEEP(10cmH2O)を加えて人工呼吸管理を行ったことにより、肺保護効果が表れたためではないかと推察する。以前の研究で行った高血糖ではその炎症反応が極めて増強されていたため、インスリンによる血糖降下作用と相まって抗炎症作用が発揮されたのではないかと考察される。例えば、敗血症における炎症反応はモデルとして確立され、インスリンの抗炎症作用は明らかにされているので、このようなモ

デルで肺をターゲットにした炎症反応の検証を行う意義はあるものと考え。また肺乾湿重量比に差を認めなかったが、インスリン吸入によりENaC の発現が維持されていたことは中長期的にみると肺水腫からの回復に貢献することも示唆され、今後の検討の余地があると思われる。

<引用文献>

- Gale SC, Sicoutris C, Reilly PM, Schwab CW, Gracias VH: Poor glycemic control is associated with increased mortality in critically ill trauma patients. *Am Surg* 2007, 73:454-460.
- Jacob A, Steinberg ML, Yang J, Dong W, Ji Y, Wang P: Sepsis-induced inflammation is exacerbated in an animal model of type 2 diabetes. *Int J Clin Exp Med* 2008, 1:22-31
- Honiden S, Gong MN: Diabetes, insulin, and development of acute lung injury. *Crit Care Med* 2009, 37:2455-2464.
- Fan W, Nakazawa K, Abe S, Inoue M, Kitagawa M, Nagahara N, Makita K. Inhaled aerosolized insulin ameliorates hyperglycemia-induced inflammatory responses in the lungs in experimental model of acute lung injury. *Crit Care*. 2013 Apr 28;17(2):R83.
- Zhu T, Zhang W, Wang DX: Insulin up-regulates epithelial sodium channel in LPS-induced acute lung injury model in rats by SGK1 activation. *Injury* 2012, 43:1277-1283.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計2件）

- Uzawa Y, Otsuji M, Nakazawa K, Fan W, Yamada Y. Derivation of recruitment function from the pressure-volume curve in an acute lung injury model. *Respir Physiol Neurobiol*. 査読あり
2015 Jan 1;205:16-20
- 中沢弘一、ARDSの人工呼吸管理におけるopen lung approachの現状と課題、呼吸器内科、査読無、2015
28(2):165-170

〔学会発表〕（計2件）

- Mariko Senda, Wei Fan, Koichi Nakazawa,

Koshi Makita. Effects of inhaled aerosolized insulin on acutely injured lungs under normoglycemia: insulin may contribute to enhance alveolar liquid clearance through epithelial sodium channel expression. *European Society of Intensive Care Medicine* October 1, 2014 Barcelona (Spain)

千田 麻里子, 范 惟, 中沢 弘一 急性肺傷害におけるインスリン吸入の効果：正常血糖モデルでの比較検討 第42回日本集中治療医学会学術集会 ホテル日航東京（東京）2015年2月9日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中沢 弘一 (NAKAZAWA, Koichi)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師
研究者番号：10207756