

平成 21 年 5 月 19 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19592094  
 研究課題名（和文）免疫グロブリンの臓器保護作用の発現機序の解明と重症敗血症治療への応用  
 研究課題名（英文）Therapeutic efficacy of immunoglobulin on the multiple organ injury associated with severe sepsis  
 研究代表者  
 原田 直明（HARADA NAOAKI）  
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授  
 研究者番号：00309915

## 研究成果の概要：

本研究では、人免疫グロブリン製剤（Ig）の新しい臓器保護作用を解析するために Ig がカプサイシン感受性知覚神経の活性化を促進して、虚血再灌流性臓器障害を軽減するか否かを解析した。Ig は知覚神経を刺激して、臓器保護作用に重要なインスリン様成長因子-I（IGF-I）の生成を促し、マウスの虚血再灌流性腎障害を軽減することが判明した。よって、Ig は重症敗血症などによる臓器障害抑制を目的とした治療にも有用である可能性が示された。

## 交付額

（金額単位：円）

|         | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2007 年度 | 1,700,000 | 510,000   | 2,210,000 |
| 2008 年度 | 1,700,000 | 510,000   | 2,210,000 |
| 総計      | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：免疫グロブリン、虚血再灌流障害、インスリン様成長因子-I、知覚神経、アポトーシス、腎障害、脊髄後根神経節細胞、カルシトニン遺伝子関連ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

敗血症性ショックやそれに引き続く虚血再灌流性（I/R）臓器障害は過剰な生体防御反応すなわち生体侵襲反応として発現するが、その発症制御の分子機構については未だに不明な点が多く残されている。また、これらの病態に対する有効な治療法は未だ十分に確立されておらず、重症敗血症の死亡率は高い。免疫グロブリン製剤は、感染制御の目的で、

重症敗血症治療にしばしば用いられる。近年、免疫グロブリンに臓器保護作用が存在することが報告されたが、その作用機序については未だ不明な点が多く残されている。すなわち、免疫グロブリンは、*in vitro* で分離された単球のインターロイキン-6 の産生を抑制することが報告されており、クッパー細胞の TNF 産生を抑制することで敗血症による肝障害を軽減する可能性や、白血球の活性酸素

種の産生を抑制してラットの肝 I/R 障害を軽減することなどが報告されているが、その臓器障害軽減機序は、未だ、十分に明らかにされてはいない。これまでに報告者らは、敗血症性ショックや I/R 臓器障害において、肺や虚血臓器のカプサイシン感受性知覚神経が活性化され、その神経末端から放出されたカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)が、さらに血管内皮細胞の一酸化窒素(NO)およびPGI<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>などのプロスタグランディン産生を促進することで、腫瘍壊死因子(TNF)の産生を抑制し、これらの病態を改善することを報告した。また、報告者らは、CGRPは、血管内皮細胞や臓器実質細胞に作用し、アポトーシスを抑制するインスリン様成長因子-I(IGF-I)の産生を促進することも明らかにした。

## 2. 研究の目的

人免疫グロブリン製剤がカプサイシン感受性知覚神経の活性化を促進して、敗血症性などに伴う I/R 臓器障害を軽減するか否かを解析し、得られた結果から、免疫グロブリンを用いた新たな重症敗血症治療戦略の理論的基盤を構築することを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 免疫グロブリンによる知覚神経刺激作用の解析

免疫グロブリンが、知覚神経に作用し、カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)の放出を促進するか否かを検討する為に、マウスより分離した脊髄後根神経節細胞に人免疫グロブリン製剤を30分間作用させ、CGRPの培養上清での濃度の変化を調べた。また、知覚神経表面のバニロイド受容体-1の活性化の拮抗物質であるカプサゼピンの免疫グロブリンによるCGRP放出に対する影響を調べ、免疫グロブリンの知覚神経刺激が、この受容体の活性化を介しているか否かを検討した。また、分離脊髄後根神経節細胞内のcAMP濃度が上昇するとバニロイド受容体-1の感受性が増加し、CGRP放出を増加させるので、免疫グロブリンによる分離脊髄後根神経節細胞内のcAMP濃度の変化を検討した。

(2) 免疫グロブリンのマウス腎 I/R 障害に対する効果の解析

免疫グロブリンが知覚神経の活性化の活性化を介して、マウスの腎 I/R 障害を軽減するか検討した。麻酔下にマウスの右腎を摘出して、左腎の動静脈を45分間遮断し、解除して腎 I/R 障害モデルを作成した。

①腎 I/R による腎組織中の CGRP および IGF-I 濃度の変化

腎 I/R により知覚神経が刺激され、腎組織中の CGRP 濃度が増加し、この CGRP が IGF-I 産生促進作用に寄与するか否かを検討するために、野生型マウスに腎 I/R を行い、経時的に腎組織中の CGRP および IGF-I 濃度を測定した。これらの変化に対する人免疫グロブリン製剤(100 mg/kg、静脈内投与)の影響を検討した。

②腎 I/R による腎アポトーシスに対する人免疫グロブリン製剤の効果

腎 I/R によるアポトーシスの変化を解析するために、腎の TUNEL 染色陽性細胞の増加と caspase-3 濃度の変化を測定し、人免疫グロブリン製剤(100 mg/kg、静脈内投与)の効果を検討した。

③腎 I/R による腎障害に対する人免疫グロブリン製剤の効果

腎 I/R による腎障害の指標として、血中尿素窒素(BUN)、血中クレアチニン(Cr)濃度を測定し、人免疫グロブリン製剤(100 mg/kg、静脈内投与)の効果を検討した。

## 4. 研究成果

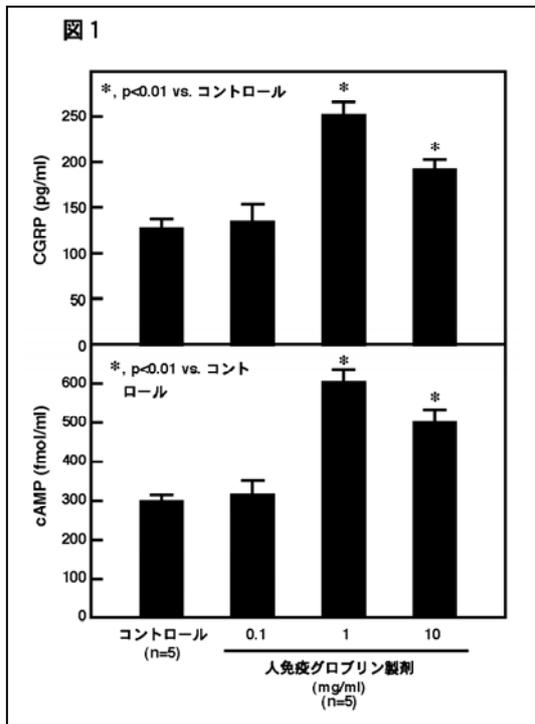
(1) 免疫グロブリンによる知覚神経刺激作用の解析

人免疫グロブリン製剤(1 mg/ml)を脊髄後根神経節細胞に作用させると、培養上清中の CGRP 濃度が有意に上昇した(図1)。バニロイド受容体-1の霜害剤であるカプサゼピン存在下に人免疫グロブリン製剤を作用させても、CGRP濃度の上昇は認められなかった。細胞内cAMP濃度は人免疫グロブリン製剤により上昇した(図1)。よって、免疫グロブリンは、細胞内cAMP濃度を上昇させることで、バニロイド受容体-1の感受性を増加させ、脊髄後根神経節細胞からの CGRP 放出を促進することが判明した。これらの成果により、免疫グロブリンは知覚神経刺激作用を有することが示された。

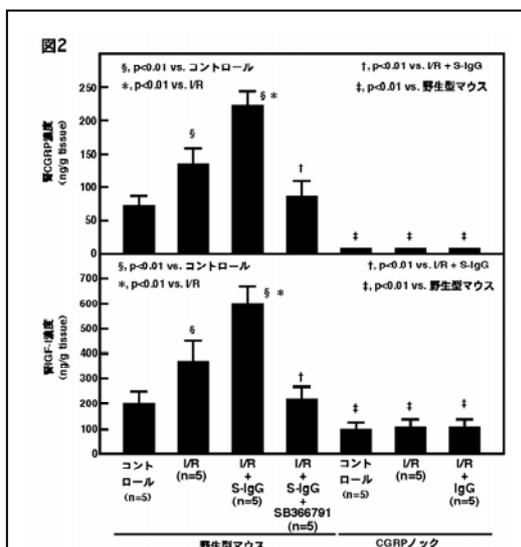
(2) 免疫グロブリンのマウス腎 I/R 障害に対する効果の解析

①腎 I/R による腎組織中の CGRP および IGF-I 濃度の変化

腎 I/R により腎 CGRP 濃度は有意に上昇し、

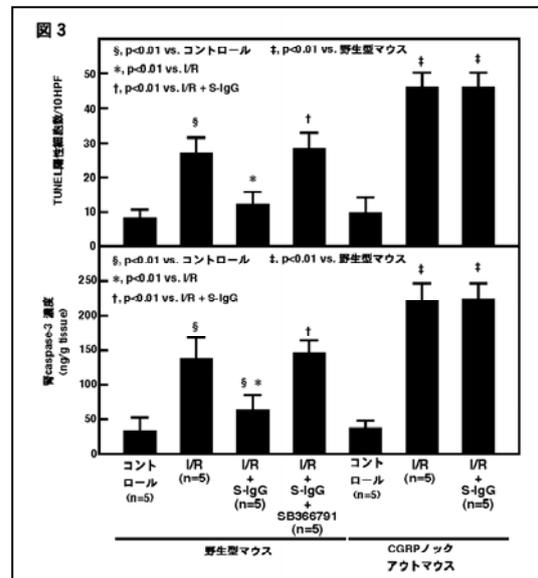


腎 IGF-I 濃度も著明に上昇した。人免疫グロブリン製剤 (S-IgG; 100 mg/kg、静脈内投与) をマウスに投与すると、腎 I/R による腎 CGRP および IGF-I 濃度の上昇が有意に促進された (図 2)。これらの上昇はバニロイド受容体-1 の選択的阻害剤である SB366791 投与により有意に抑制された (図 2)。また CGRP ノックアウトマウスでは、腎 I/R による IGF-I の上昇が認められず、人免疫グロブリン製剤を投与しても、腎 IGF-I 濃度は上昇しなかった (図 2)。これらの成果により、腎 I/R により知覚神経が刺激され、CGRP 濃度が上昇して、腎 IGF-I 産生を促進する可能性が示された。また、免疫グロブリンは知覚神経を刺激して、腎 CGRP 濃度を上昇することで、腎 IGF-I 産生を促進する可能性が示された。



## ②腎 I/R による腎アポトーシスに対する人免疫グロブリン製剤の効果

腎 I/R による腎の TUNEL 染色陽性細胞の増加と caspase-3 濃度の増加は、人免疫グロブリン製剤の投与で有意に抑制された (図 3)。人免疫グロブリン製剤によるこれらの抑制作用は、バニロイド受容体-1 の選択的阻害剤である SB366791 投与や抗マウス IGF-I 抗体投与により認められなくなった (図 3)。また、CGRP ノックアウトマウスでは、野生型マウスよりも腎 I/R による腎の TUNEL 染色陽性細胞の増加と caspase-3 濃度の増加が促進し、人免疫グロブリン製剤を投与しても、これらの増加は抑制されなかった (図 3)。以上の結果から、免疫グロブリンは知覚神経刺激作用を介して、マウスの腎 I/R によるアポトーシスを抑制する可能性が示された。

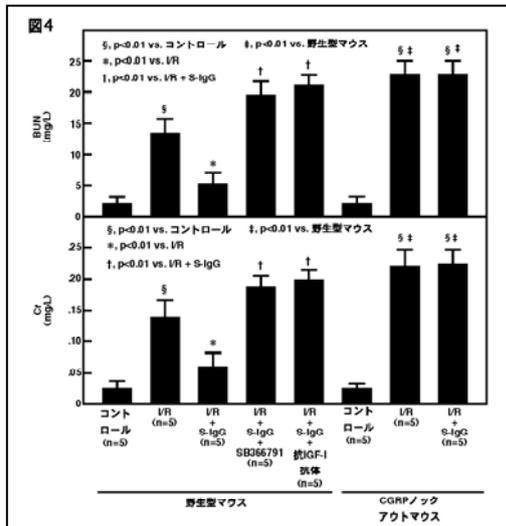


## ③腎 I/R による腎障害に対する人免疫グロブリン製剤の効果

腎 I/R による BUN および Cr の上昇は、人免疫グロブリン製剤の投与で有意に抑制された (図 4)。人免疫グロブリン製剤によるこれらの抑制作用は、バニロイド受容体-1 の選択的阻害剤である SB366791 投与や抗マウス IGF-I 抗体投与により認められなくなった (図 4)。また、CGRP ノックアウトマウスでは、野生型マウスよりも腎 I/R による BUN および Cr の増加が促進し、人免疫グロブリン製剤を投与しても、これらの増加は抑制されなかった (図 4)。以上の結果から、免疫グロブリンは知覚神経刺激作用を介して、マウスの腎 I/R による腎障害を抑制する可能性が示された。

本研究で得られた結果を統合すると、人免疫グロブリン製剤は知覚神経の刺激作用を

介して、腎の IGF-I 産生を促進し、虚血再灌流によるアポトーシスを抑制し、腎障害を軽減している可能性が示された。よって、人免疫グロブリン製剤は、重症敗血症の病態においては病原微生物の制御を目的とした、免疫増強作用を期待して用いられてきたが、それだけではなく、重症敗血症に伴って発生する臓器障害抑制を目的とした新たな治療戦略として有用である可能性が示された。



#### 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 岡嶋研二、原田直明、Promotion of insulin-like growth factor-I production by sensory neuron stimulation; molecular mechanism(s) and therapeutic implications, *Current Medicinal Chemistry*, 15, 3095–3112, 2008、査読有
- ② 原田直明、岡嶋研二、Effect of capsaicin on plasma and tissue levels of insulin-like growth factor-I in spontaneously hypertensive rats., *Growth Hormone & IGF Research*, 18, 75–81, 2008、査読有
- ③ 原田直明、岡嶋研二、磯部博隆、Role of neutrophil elastase in development of pulmonary vascular injury and septic shock in rats, *Shock*30,379–387, 2008、査読有
- ④ 原田直明、岡嶋研二、栗原裕基、中瀧直巳、Antithrombin prevents reperfusion-induced hepatic apoptosis by enhancing insulin-like growth factor-I production in mice., *Critical Care Medicine*, 36,971-974,2008、査読有
- ⑤ 幸村英文、内場光浩、水落雄一朗、新井正

徳、原田直明、勝屋弘忠、岡嶋研二、Antithrombin inhibits LPS-induced TNF production by monocytes in vitro through inhibition of Egr-1 expression., *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 6,499-507,2008、査読有

⑥ 原田直明、岡嶋研二、栗原裕基、中瀧直巳、Effect of topical application of raspberry ketone on dermal production of insulin-like growth factor-I in mice and on hair growth and skin elasticity in humans., *Growth Hormone & IGF Research*, 18,335-344,2008、査読有

⑦ 原田直明、Stimulation of sensory neurons by capsaicin increase tissue levels of IGF-I, thereby reducing reperfusion-induced apoptosis in mice., *Neuropharmacology*, 52, 1303–1311, 2007、査読有

⑧ 原田直明、Danaparoid sodium reduces ischemia/reperfusion-induced liver injury in rats by attenuating inflammatory responses, *Thrombosis and Haemostasis*, 97,81-87,2007、査読有

⑨ 原田直明、Effect of capsaicin on plasma and tissue levels of insulin-like growth factor-I in spontaneously hypertensive rats. , *Growth Horm IGF Res* , 18,75-81,2007、査読有

[学会発表] (計 1 件)

- ① 原田直明、岡嶋研二、Intravenous immunoglobulin reduces the ischemia/reperfusion-induced renal injury by increasing insulin-like growth factor-I production in mice., 28nd International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine, 2008年3月18日、Brussels, Belgium

[図書] (計 2 件)

- ① 原田直明、岡嶋研二、Springer Japan (Tokyo), New aspects of anti-inflammatory activities of antithrombin-Molecular mechanism(s) and therapeutic implications-. In: Tanaka K, Davie EW (eds) *Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis*. , 2008, 218-230
- ② 原田直明、先端医学社、X a 阻害薬のすべて、2007、83-88

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/molbio.dir/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 直明 (HARADA NAOAKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：00309915

(2) 研究分担者

岡嶋 研二 (OKAJIMA KENJI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：60152295

(3) 連携研究者