

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10977

研究課題名(和文) ARDSにおける糖尿病パラドックスの謎の解明と新たな治療戦略の探索

研究課題名(英文) Attempt to clarify the mystery of diabetes paradox in ARDS and search for new therapeutic strategies

研究代表者

松村 一弘 (Kazuhiro, Matsumura)

滋賀医科大学・医学部・特任教授

研究者番号：50378486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：急性呼吸窮迫症候群(ARDS)は死亡率の高い難治性の病態である。近年糖尿病患者においてARDSの発症が有意に低下する「糖尿病パラドックス」と呼ばれる現象が報告されているが、原因は不明のままである。糖尿病では骨髄に異常が生じることから、マウスにて肺における骨髄由来細胞とされる2型肺胞上皮細胞を調査した。2型肺胞上皮細胞は95%が骨髄由来であり、糖尿病モデルマウスにおいて優位に減少していた。研究期間内にこの減少とARDS発症の関連は明らかとは出来なかったが、糖尿病パラドックスの原因としてこの細胞の減少が関与する可能性はあると考えている。

研究成果の概要(英文)：Acute respiratory distress syndrome (ARDS) is a refractory condition with high mortality. Recently, the phenomenon called "diabetes paradox" in which the development of ARDS is significantly reduced in diabetic patients has been reported, but the cause remains unknown. Since bone marrow abnormality occurs in diabetes mellitus, type 2 alveolar epithelial cells, which are regarded as bone marrow-derived cells in the lung, were investigated. 95% of type 2 alveolar epithelial cells were derived from bone marrow and were significantly reduced in diabetic model mice. Although the association between this decrease and the development of ARDS could not be clarified within the study period, we believe that the reduction of this cell may be involved as a cause of diabetes paradox.

研究分野：糖尿病、臓器不全

キーワード：呼吸窮迫症候群 糖尿病 プロインスリン陽性細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1)急性呼吸窮迫症候群(Acute respiratory distress syndrome: ARDS)は、肺の炎症と透過性亢進を特徴とし、急性発症、両側性陰影、低酸素血症を呈するが心原性肺水腫ではない病態として捉えられている。直接的な肺障害からの発症としては、呼吸器感染症、誤嚥、肺挫傷、肺脂肪塞栓、溺水などがあり、間接的な肺障害からの発症としては、敗血症、急性膵炎、血液製剤の輸血等が挙げられ、多岐にわたる原因にて発症している。今までに多くの試みがなされているものの、その発症に関しては未だ不明な点が多く、また、薬物治療で効果があるとされているものも無い。2012年ARDS定義の問題点の見直しが行われ、ベルリン定義が提唱されたが、重傷度別の死亡率は軽傷27%、中等症32%、重症45%であり、医学の発展した現代においても未だ高率であった。ARDSに対する新たな治療法が強く望まれている。

(2)近年糖尿病患者においてARDSの発症が有意に低いとされる報告がなされ、「糖尿病パラドックス」なる呼称にて注目されている。(Yu et al. Crit Care Med; 41(12)2720-2730, 2013)。この論文の中でYuらは、肥満や高血糖、糖尿病の現行の治療の有無等の調整を行った後であっても、有意に糖尿病患者でARDSのリスクは低く、1型、2型糖尿病の違いも関係を認めなかったとしている。しかしこの現象に対する納得できる説明は未だなされていない。

## 2. 研究の目的

申請者らは今までの研究にて、高血糖状態のマウスにおいては、骨髄由来の proinsulin 産生細胞が肝臓、脂肪細胞等多臓器に認められ、坐骨神経においては proinsulin 産生細胞が神経細胞に融合し、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  を産生し、糖尿病性末梢神経障害の成因となっている可能性につき報告した。糖尿病の病態生理、合併症の成因が骨髄由来の異常細胞に起因する可能性があり、糖尿病の病態生理における新たな発見であると考えている。

さらに、骨髄由来の細胞である破骨細胞が骨より減少することが、糖尿病性の骨形成異常に関わっているとの報告。(Kasahara et al. Bone; 47(3)617-25, 2010)、骨髄由来細胞である消化管の Cajal 細胞が、糖尿病により減少することが糖尿病性の消化管運動障害の原因となっている可能性についての報告。(Li et al. J Gastroenterol Hepatol; 26(6) 1072-8, 2011)、視床下部室傍核における、骨髄由来細胞の減少が糖尿病マウスにおける摂食異常に関わっているとの報告がなされており(Urabe et al. Nat Commun(4)1526, 2014)、糖尿病における骨髄由来細胞の異常と病態との関連が続々と明らかとなってきた

ている。肺臓においても糖尿病に関連する疾患が骨髄由来細胞によって影響を受けていても不思議なことでは無い。申請者はここにARDSの病態生理の鍵が隠されていると考え本研究を開始した。

## 3. 研究の方法

### 1) マウス肺臓における骨髄由来細胞の糖尿病による影響の調査

GFP トランスジェニックマウスより骨髄を採取し、放射線照射した野生型マウスに移植を行った。その後移植マウスに対しSTZ(ストレプトゾシン)を用いて糖尿病とし、2か月後に安楽死させ、灌流固定の後、肺を取り出し、抗GFP抗体、抗サーファクタントA(SP-A)抗体を用いた免疫染色を行った。GFP陽性である骨髄由来細胞とSP-A陽性である2型肺胞上皮細胞が糖尿病によりどのように変化するかにつき調査を行った。

### 2) 実験的ARDSモデルマウスに対する糖尿病の影響

GFP トランスジェニックマウスより骨髄を採取し、放射線照射した野生型マウスに移植を行ったマウスに対しSTZ(ストレプトゾシン)を用いて糖尿病とし、2か月後にリポポリサッカライド吸入による実験的ARDSを生じさせ、1日後に安楽死させた。灌流固定の後、骨髄由来細胞がどのように働き、どのようにARDSに影響を及ぼしているかにつき調査を行った。

### 統計処理

2群間の比較をMann-Whitney Uの検定にて行った。ソフトウェアはSPSS(IBM Japan) version 22を用いた。

## 4. 研究成果

### 1) マウス肺臓における骨髄由来細胞の糖尿病による影響の調査

上記方法にて作成したマウス(C57/BL6)において、コントロール群(CTL)(N=5)、糖尿病群(STZ)(N=5)に分け、STZ投与後2か月における変化を調査した。

肺における骨髄由来細胞とされる2型肺胞上皮細胞を、抗SP-A抗体を用いて染色し、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。CTL群ではGFP陽性SP-A陽性である骨髄由来2型肺胞上皮細胞が散見されるが、STZ群では骨髄由来2型肺胞上皮細胞数は減少していた(図1)。

次にSP-A陽性細胞数、GFP陽性細胞数、SP-A陽性細胞におけるGFP陽性細胞数につき、それぞれの群に対し計測を行った。

まず2型肺胞上皮細胞における骨髄由来細胞の頻度を調査した。CTL群においては、肺におけるSP-A陽性細胞の内、94.9%がGFP陽性細胞であり、ほぼ骨髄由来細胞であるこ

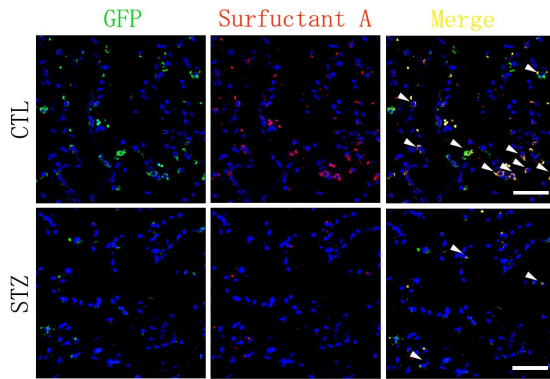


図1 : CTL 群では GFP、SP-A 共陽性の細胞(矢印)が多数存在するが(上段)、STZ 群では両者とも減少している(下段)。(白線=20 $\mu$ m)

とが示唆された。そして STZ 群では SP-A 陽性細胞中の GFP 陽性細胞は 70%と低下していたが、SP-A 単独陽性細胞数は両者間に差を認めず、肺に常在している 2 型肺胞上皮細胞数は糖尿病による影響を受けないことが示唆された。

続いて STZ 群、CTL 群での陽性細胞数を計測したところ、STZ 群では CTL 群に比し GFP 陽性細胞数、SP-A 陽性細胞数、GFP、SP-A 共陽性細胞数が有意に減少していた。(図2) 以上より、糖尿病においては、肺に常在する 2 型肺胞上皮細胞数はほぼ変化しないが、骨髄由来の 2 型肺胞上皮細胞は有意に減少し、全体の 2 型肺胞状細胞数を減少させていることが明らかとなった。

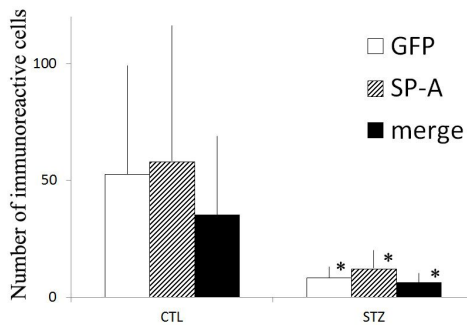


図2 ; 単位面積あたりの陽性細胞数の比較。STZ 群では GFP 陽性細胞、SP-A 陽性細胞数が有意に現象した (\* $p<0.01$ )

## 2) 実験的 ARDS モデルに対する糖尿病の影響

CTL 群、STZ 群共にリポポリサッカライド(LPS)を吸入させ、実験的 ARDS モデルを作製した。CTL 群、STZ 群ともに骨髄由来細胞が増加したものの、GFP 陽性細胞数、SP-A 陽性細胞数および、炎症マーカー(IL-6 等)の発現に有意な差を見出すことが出来なかった。

本研究により糖尿病モデルにおいて 2 型肺胞上皮細胞は減少することが明らかと出来

た。しかし、実験的 ARDS モデルにおいては、糖尿病による炎症抑制への影響は証明できなかった。

今回調査に使用した実験的 ARDS マウスモデルは、ヒトにおける ARDS と発症のメカニズムが異なる可能性がある。2 型肺胞上皮細胞は、ARDS 発症と関連するとの報告は多数存在しており、糖尿病における 2 型肺胞上皮細胞の減少、あるいは細胞の性質の変化が ARDS 発症抑制に関与しているのかもしれない。今後さらなる検討が必要であると考えている

## 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)

なし

〔雑誌論文〕(計 0 件)

なし

〔学会発表〕(計 0 件)

なし

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

なし

出願状況(計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況(計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

松村 一弘(MATSUMURA Kazuhiro)

滋賀医科大学・医学部・特任教授

研究者番号 : 50378486

(2)研究分担者

藤野 和典(FUJINO Kazunori)  
滋賀医科大学・医学部・助教  
研究者番号： 70402716

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
なし