

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590461

研究課題名（和文） ヒト敗血症ショックの実験モデルの確立と新しい治療法の開発

研究課題名（英文） Establishment of a new experimental model for human septic shock

研究代表者

横地高志（YOKOCHI TAKASHI）

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：20126915

研究成果の概要： ガラクトシルセラミド（ $\alpha$ -GalCer）を投与すると肺の NKT 細胞が活性化し、肺局所で インターフェロンが産生され、各種接着因子が発現され、炎症性細胞が肺に集積する。これがエンドトキシン投与による肺病変の準備段階となる。それら炎症性細胞をエンドトキシンが刺激して、各種炎症性メディエーターを過剰に産生させ、血管内皮や肺胞上皮などの障害が起こり、血管透過性を亢進し、肺病変、呼吸不全を導き、致死性のショックを誘導することを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：エンドトキシン、ガラクトシルセラミド、NKT 細胞、インターフェロン、LPS

## 1. 研究開始当初の背景

敗血症ショックは、現在も相変わらず高い致死率(30%以上)を示し、その治療は困難を伴う。わが国でも、年間数万人が罹患し、一万人以上が死亡していると推定されている。このため、適切な治療法の確立が、感染症対策として重要な課題である。この敗血症ショックの実験モデルとして、エンドトキシンを用いた実験的エンドトキシンショックモデルが用いられてきた。D-ガラクトサミンで感作したマウスにエンドトキシンを投与する実験的エンドトキシンショックモデルが有名であるが、この実験モデルは、急性肝壊死

が主病変で、ヒト敗血症ショックとは明らかに病変が異なる。すなわち、ヒト敗血症ショックは、レスピレーターが必要な呼吸器不全が特徴であり、肝病変は著明ではない。また、全身性血管内凝固(DIC)の実験モデルとして、エンドトキシンを用いたシュワルツマン反応がある。しかしながら、このモデルは、血管内皮傷害が特徴で、なおかつ作製は容易ではなく、安定したDICモデルとはなりえない。このように、優れたヒト敗血症ショックモデルが確立されていないため、申請者もやむなく従来のD-ガラクトサミン感作マウスやシュワルツマン反応を用いて、ヒト敗血症

の病態を研究してきた。D-ガラクトサミンを用いたエンドトキシンショックモデルでは、腫瘍壊死因子(TNF- $\alpha$ )の関与が重要であり、このTNF- $\alpha$ が肝細胞にアポトーシスを導き、急性肝アポトーシスを主体とした致死的ショックが起こることを報告した(Morikawa A. et al. Infect Immun. 1999;67:1018-24)。また、シュワルツ反応を用いて、実験的DICの病態解析を行い、インターフェロン $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ がそれぞれ異なった役割を持ち、さらに接着分子が病変形成に関与していることを報告した(Koide N. et al. FEMS Immunol Med Microbiol. 1996;16:205-11、FEMS Immunol Med Microbiol. 1997;18:67-74)。しかしながら、ヒト敗血症の病態の解析、治療法を開発するためには、従来の実験モデルでは不十分で、肺を主病変とする呼吸器不全を伴った実験モデルの作製が、ヒト敗血症ショックの解析には必要であることを痛感した。

昨年、我々は、Natural Killer T (NKT)細胞を活性化することで知られている $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer)でマウス腹腔細胞を刺激すると、大量の一酸化窒素(NO)が産生されることを見つけた(Ito H. et al., J Endotoxin Res. 2005;11:213-9)。この実験結果から、 $\alpha$ -GalCerで前処置されたマウスにエンドトキシンを投与すると、生体レベルで大量のNOが産生される可能性が示唆され、生体レベルでのNO産生を調べようとした。その実験の過程で、極めて興味深いことに、 $\alpha$ -GalCerで感作したマウスに微量のエンドトキシンを静脈内に投与すると、著明な肺病変を特徴としたヒト敗血症ショックに酷似した致死的ショックが誘導されることを偶然見出した。この致死的ショックは、投与後12時間以内に全例に誘導され、呼吸器不全で死亡する。肝病変は軽微で、肺病変が主体であるヒト敗血症ショックモデルとして優れた実験モデルになりうることを報告した(Ito H. et al., Lab Invest. 2006;86:254-61)。このモデルは、作製が容易で、かつ全例に致死的肺障害が起きるため、ヒト敗血症ショックの実験系として有用である。

## 2. 研究の目的

この $\alpha$ -GalCerで感作したマウスにエンドトキシンを投与して誘導できる致死的ショックを用いれば、ヒト敗血症ショックの病態解析、新しい治療法の開発が可能である。今回、この致死的ショックの詳細な病態を解析したい。特に、 $\alpha$ -GalCerでの感作が肺病変を選択的に誘導するメカニズムを明らかにしたい。さらに、主病変である肺病変の形成メカニズムを明らかにする。リンパ球、単球、マクロファージ、白血球などの炎症性細胞が、

肺病変に浸潤するその機序、肺上皮細胞や血管内皮細胞が細胞死を起こす機序を解析する。特に、サイトカイン、フリーラジカル、接着分子などの関与について解析する予定である。この肺病変形成機序を正確に解析できれば、この肺病変を制御が可能である。治療法への応用が可能である。最近、細胞外マトリックスがエンドトキシンの細胞傷害を抑制することが報告されている。できれば、細胞外マトリックスの治療効果を試みたい。

## 3. 研究の方法

新しいヒト敗血症ショックモデルの病態解析

エンドトキシン以外の微生物由来物質が同様な致死的ショックを誘発するかどうかを検討する。CpG DNA、ペプチドグリカン、ザイモザンなどを試みる。

$\alpha$ -GalCerに代わりうる物質を探索する。

NKT細胞を刺激する物質で試みる。

致死的ショック誘発に関与するサイトカインを解析するため、血中各種サイトカインを酵素抗体法により測定する。また、抗サイトカイン中和抗体を用いて、致死抑制効果を調べ、致死に関与するサイトカインを見つけ出す。予備的には、インターフェロンと腫瘍壊死因子- $\alpha$ の関与が推定されている。

新しい敗血症モデルは、肺病変が特徴的であるため、肺病変の形成過程に接着分子が関与するかどうか免疫組織染色で解析する。ICAM-1、LFA-1などの抗体による染色を試みる。

血管内皮細胞傷害を導く細胞死シグナルを解明するため、細胞死シグナル関連分子の活性化をリン酸化抗体を用いて免疫プロット法で解析する。各種キニナーゼ、NF- $\kappa$ B、BCLファミリーなどの活性化を調べる。

肺病変に集積する炎症性細胞の細胞表面抗原を免疫組織染色、レーザーフローサイトメトリーを用いて解析し、浸潤している炎症細胞の活性化状態を細胞表面抗原のパターンで解析する。

肺病変で細胞死を起こす細胞群を病理組織学的に同定する。

細胞死を引き起こす機序、特にアポトーシスの関与をTUNEL法で解析する。

細胞死を誘導するシグナル経路を各種抗体を用い免疫プロット法で解析する。

フリーラジカルの病変形成に及ぼす作用を抗ニトロ化抗体で検出する。

肺病変と致死性との相関関係を検討する。

## 4. 研究成果

$\alpha$ -GalCerで感作されたマウスにエンドトキシンを投与し、肺病変を伴う致死的ショック

クを誘導し、その肺病変形成メカニズムを解析した。alpha-GalCer を投与すると肺のNKT細胞が活性化し、肺局所でインターフェロンが産生され、各種接着因子の発現され、炎症性細胞が肺に集積することがエンドトキシン投与による肺病変の準備段階であることを明らかにした。特に、NKT細胞から産生されるインターフェロンの役割が重要であると結論づけた。alpha-GalCer 感作マウスにエンドトキシンを投与することにより、肺で腫瘍壊死因子(TNF-alpha)、インターロイキン6など炎症性サイトカインが産生され、血管透過性が亢進し、肺病変や機能不全が誘導されることを明らかにした。肺に浸潤した炎症性細胞をエンドトキシンが刺激して、各種炎症性メディエーターを産生させ、血管内皮や肺胞上皮などの細胞傷害、臓器障害が起こり、肺病変、呼吸不全を導き、致死性のショックを誘導することを明らかにした。エンドトキシンショックにおける肺病変形成にNKT細胞の重要性が示唆された。

#### 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10件)

1. Tumorxhuu G, Koide N, Dagvadorj J, Hassan F, Islam S, Naiki Y, Mori I, Yoshida T, Yokochi T. MnTBAP, a synthetic metalloporphyrin, inhibits production of tumor necrosis factor-alpha in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages cells via inhibiting oxidative stress-mediating p38 and SAPK/JNK signaling. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007; 49: 304-11.
2. Islam S, Hassan F, Tumorxhuu G, Dagvadorj J, Koide N, Naiki Y, Mori I, Yoshida T, Yokochi T. Bacterial lipopolysaccharide induces osteoclast formation in RAW 264.7 macrophage cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 360: 346-51.
3. Koide N, Morikawa A, Tumorxhuu G, Dagvadorj J, Hassan F, Islam S, Naiki Y, Mori I, Yoshida T, Yokochi T. Lipopolysaccharide and interferon-gamma enhance Fas-mediated cell death in mouse vascular endothelial cells via augmentation of Fas expression. *Clin Exp Immunol*. 2007; 150: 553-60.
4. Hassan F, Morikawa A, Islam S, Tumorxhuu G, Dagvadorj J, Koide N, Naiki Y, Mori I, Yoshida T, Yokochi T. Lipopolysaccharide augments the in vivo

lethal action of doxorubicin against mice via hepatic damage. *Clin Exp Immunol*. 2008; 151: 334-40.

5. Tumorxhuu G, Koide N, Dagvadorj J, Morikawa A, Hassan F, Islam S, Naiki Y, Mori I, Yoshida T, Yokochi T. The mechanism of development of acute lung injury in lethal endotoxic shock using alpha-galactosylceramide (alpha-GalCer) sensitization. *Clin Exp Immunol*. 2008; 152: 182-91
6. Ito H, Ando K, Ishikawa T, Nakayama T, Taniguchi M, Saito K, Imawari M, Moriwaki H, Yokochi T, Kakumu S, Seishima M. Role of V{alpha}14+ NKT cells in the development of Hepatitis B virus-specific CTL: activation of V{alpha}14+ NKT cells promotes the breakage of CTL tolerance. *Int Immunol*. 2008; 20: 869-79.
7. Dagvadorj J, Naiki Y, Tumorxhuu G, Hassan F, Islam S, Koide N, Mori I, Yoshida T, Yokochi T. Interleukin-10 inhibits tumor necrosis factor-alpha production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells through reduced MyD88 expression. *Innate Immun*. 2008; 14: 109-15.
8. Nakao N, Kurokawa T, Nonami T, Tumorxhuu G, Koide N, Yokochi T. Hydrogen peroxide induces the production of tumor necrosis factor-{alpha} in RAW 264.7 macrophage cells via activation of p38 and stress-activated protein kinase. *Innate Immun*. 2008; 14: 190-6.
9. Noman AS, Koide N, Khuda II, Dagvadorj J, Tumorxhuu G, Naiki Y, Komatsu T, Yoshida T, Yokochi T. Thalidomide inhibits epidermal growth factor-induced cell growth in mouse and human monocytic leukemia cells via Ras inactivation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 374: 683-7.
10. Kasugai C, Morikawa A, Naiki Y, Koide N, Komatsu T, Yoshida T, Yokochi T. Concanavalin A induces formation of osteoclast-like cells in RAW 264.7 mouse macrophage cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2008. 2009;31:103-7.

[学会発表](計6件)

Dagvadorj J, et al. IL-10 prevents LPS induced IL-6 production via inhibition of I{kappa}B-zeta by Bcl-3  
第82回日本細菌学会総会  
平成21年3月13日(名古屋) 他5件

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横地高志 (YOKOCHI TAKASHI)  
愛知医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20126915

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者