

平成23年 5 月31日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592120

研究課題名 (和文)

Bacterial Translocationに対する新治療戦略の開発

研究課題名 (英文)

Development of Novel Strategies for Prevention from Bacterial Translocation

研究代表者

片山 浩 (KATAYAMA HIROSHI)

岡山大学・岡山大学病院・准教授

研究者番号：90161067

研究成果の概要 (和文)：

出血性ショック (hemorrhagic shock : HS) に伴う酸化ストレスは消化管傷害を引き起こし多臓器不全を発生させる。ヘムオキシゲナーゼ-1 (heme oxygenase-1 : HO-1) は酸化ストレスに対して細胞保護的に働くストレス蛋白である。我々は、ラット出血性ショックモデルの腸管傷害において、HO-1 発現に部位特異性があり、内因性の HO-1 は細胞保護的に働くことを報告した。本研究では、このラットモデルにグルタミン (GLN) を投与し、HO-1 が誘導されなかった回腸の組織傷害に対する効果を検討した。GLN は回腸に HO-1 蛋白を誘導し、腸管傷害を軽減した。選択的 HO 拮抗阻害剤の投与は GLN の効果を消失させた。以上のことから、GLN は HO-1 の誘導を介して出血性ショックによる組織傷害を改善することが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：

Hemorrhagic shock (HS) is an oxidative stress which causes intestinal tissue injury. Heme oxygenase (HO)-1 is induced by oxidative stress, and is thought to play an important role in the protection of tissues from oxidative injury. We previously reported the ileum to be the most susceptible to HS-induced tissue injury site in the intestine, because HO-1 induction is the lowest at this site. We also previously demonstrated that glutamine significantly induced HO-1 in the lower intestinal tract. In the present study, we investigated whether glutamine pretreatment improves HS-induced intestinal tissue injury in the ileum by HO-1 induction. Treatment of rats with glutamine markedly induced functional HO-1 protein in mucosal epithelial cells in the ileum. Glutamine treatment before HS (mean arterial blood pressure of 30 mmHg for 60 min) significantly ameliorated HS-induced mucosal inflammation and apoptotic cell death in the ileum. In contrast, treatment with a specific inhibitor of HO activity, abolished the beneficial effect of glutamine pretreatment. These findings indicate that glutamine pretreatment significantly ameliorated tissue injury in the ileum after HS by inducing HO-1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：麻酔・蘇生学、集中治療医学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：消化管傷害、グルタミン、ストレス蛋白、炎症、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

集中治療医学の進歩により、外傷・手術に伴う出血性ショックからの蘇生率は著しく向上している。しかし、一旦、蘇生に成功しても、虚血により腸管粘膜が傷害され Bacterial Translocation (BT) が発生し、腸管粘膜の炎症細胞が活性化される。活性化炎症細胞より放出されたサイトカインは全身性に播種し過剰な炎症反応を引き起こし、最終的に多臓器不全(MODS)に至る。実際、申請者らはラット出血性ショックモデルを作成し、蘇生後、回腸で腸管細胞のアポトーシスと炎症に引き続き、MODS が発生することを明らかにした。これまで、BT に対しては経腸栄養による腸管 integrity の維持や、腸管細菌叢の是正などが提唱されてきた。しかし、未だ決め手となる治療戦略はない。そこで腸管粘膜バリア機能保持作用と抗炎症性作用を併せ持つ物質が BT の治療薬として適しているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

アミノ酸の一種であるグルタミンは非必須アミノ酸であるが重症患者の予後を改善することから、“Conditionally essential amino acid in critically ill” 考えられている。

しかし、グルタミンの生体保護作用のメカニズムは明らかではない。われわれは、グルタミンが腸管粘膜バリア機能保持作用と抗炎症作用によりBTを阻止し、その結果、重症患者の予後を改善するのではないかと考え、BT に対する新しい治療戦略を開発し救命率の上昇を目指し、医療費有効利用への道を開くことを目的として本研究を行った。

3. 研究の方法

雄性SDラットにグルタミン(Gln:0.75g/kg)を静注し回腸のHO-1蛋白発現を免疫染色にて検討した。また、脱血・返血によりラット出血性ショック(HS)モデルを作成しショック前にグルタミンを投与して、腸管傷害に対する効果を検討した。ショックラットは、Gln投与(Gln/HS)群、溶解液を投与したVehicle/HS群、Glnに加えてHO-1の拮抗阻害薬:tin mesoporphyrin (SnMP)を投与したGln/SnMP/HS群の3群に分けた。グルタミン(GLN: 0.75g/kg)をHS 1時間前に尾静脈より投与した。コントロールには出血させる以外の手術を施したSham ratを用いた。蘇生開始時より回腸を採取し、炎症性サイトカインTNF- $\alpha$ , iNOS, 抗炎症性サイトカインIL-10, 接着因子ICAM-1, VCAM-1, 抗アポトーシス遺伝子Bcl-2のmRNA発現を測定した。また、

myeloperoxidase (MPO)活性と好中球染色で好中球浸潤をISOL染色、activated caspase-3染色でアポトーシス細胞を検索した。

#### 4. 研究成果

出血性ショック (hemorrhagic shock : HS)に伴う酸化ストレスにより消化管は傷害を受けやすく、重症化すれば多臓器不全へと進行する。ヘムオキシゲナーゼ-1 (heme oxygenase-1 : HO-1) はヘム分解の律速酵素であり、酸化ストレスが関与する病態において細胞に誘導され、細胞保護的に働くと考えられている。申請者らは、ラット出血性ショックモデルの腸管傷害において、HO-1発現に部位特異性があること、内因性のHO-1は細胞保護的に働くことを報告した。本研究では、腸管傷害に対してその有用性が認められているグルタミン (Gln) を用いて、HO-1が誘導されなかった回腸のHS後組織傷害に対する効果を検討した。その結果、Glnは回腸にHO-1蛋白を誘導した。また、HSモデルではVehicle/HS群において増加したTNF- $\alpha$ 、iNOS、ICAM-1、VCAM-1 mRNA、MPO活性、組織内好中球数、アポトーシス細胞数がGln/HS群では減少し、IL-10、Bcl-2 mRNAが上昇した。しかし、これらの効果はGln/SnMP/HS群では消滅した。以上より、GlnはHO-1の誘導を介して、抗炎症、抗アポトーシス作用を発揮し、出血性ショックによる組織傷害を改善すると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 7 件)

1. Arimori Y, Takahashi T, Nishie H, Inoue K, Shimizu H, Omori E, Kawanishi S, Toda Y, Morimatsu H, Morita K (2010): Role of heme oxygenase-1 in protection of the kidney after hemorrhagic shock. International Journal of Molecular Medicine, 26,27-32. (査読有)
2. Kanagawa F, Takahashi T, Inoue K, Shimizu H, Omori E, Morimatsu H, Maeda S, Katayama H, Nakao A, Morita K (2010): Protective effect of carbon monoxide inhalation on lung injury after hemorrhagic shock/resuscitation in rats. The Journal of Trauma, 69, 185-194. (査読有)
3. Suzuki S, Morimatsu H, Omori E, Shimizu H, Takahashi T, Yamatsuji T, Naomoto Y, Morita K (2010): Responses to surgical stress after esophagectomy: Gene expression of heat shock protein 70, toll-like receptor 4, tumor necrosis factor- $\alpha$  and inducible nitric oxide synthase. Molecular Medicine Reports, 3, 765-769. (査読有)
4. Morimatsu H, Takahashi T, Matsusaki T, Hayashi M, Matsumi J, Shimizu H, Matsumi M, Morita K (2010): An Increase in Exhaled CO Concentration in Systemic Inflammation/Sepsis. Journal of Breath Research, 4, 047103 (online publication). (査読有)
5. Umeda K, Takahashi T, Inoue K, Shimizu H, Maeda S, Morimatsu H, Omori E, Akagi R, Katayama H, Morita K. (2009): Prevention of hemorrhagic shock-induced intestinal tissue injury by glutamine via heme oxygenase-1 induction. Shock, 31: 40-49.. (査読有)
6. Nishie H, Takahashi T, Inoue K, Shimizu H, Morimatsu H, Toda Y, Omori E, Akagi R, Katayama H, Morita K. (2009): Site-specific

induction of intestinal hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  after hemorrhagic shock. Mol Med Rep, 2: 149-152. (査読有)

7. Takahashi T, Shimizu H, Morimatsu H, Maeshima K, Inoue K, Akagi R, Matsumi M, Katayama H, Morita K. (2009): Heme Oxygenase-1 is an Essential Cytoprotective Component in Oxidative Tissue Injury Induced by Hemorrhagic Shock. J Clin Biochem Nutr, 44: 28-40, 2009 (査読有)

[学会発表] (計 3件)

1. Toru Takahashi, Kazuyoshi Inoue, Hiroko Shimizu, Hiroshi Morimatsu, Hiroshi Katayama, and Kiyoshi Morita, Protective role of heme oxygenase-1 induction in hemorrhagic shock-induced intestinal tissue injury The 10th Joint Scientific Congress of the KSCCM and JSICM, 2010, March 3, Hiroshima
2. 高橋 徹、井上一由、清水裕子、森松博史、榎田佳奈、片山 浩、森田 潔、グルタミンはHO-1誘導を介して自然免疫系の活性化を抑制し出血性ショック後の腸管障害を軽減する、第15回日本エンドトキシン研究会、2009年11月13日、東京
3. 高橋 徹、清水裕子、井上一由、森松博史、片山 浩、森田 潔、ラット出血性ショック後腸管障害に対する Heme Oxygenase-1 (HO-1) の細胞保護効果、第24回日本 Shock 学会総会、2009年5月30日、金沢市

[図書] (計 2件)

1. 高橋 徹、井上一由、清水裕子、榎田佳奈、有森 豊、川西 進、松三昌樹、片山 浩、森松博史、森田 潔 (2010): グルタミンはHO-1誘導を介して自然免疫系の活性化を抑制し出血性ショック後の腸管障害を軽減する. エンドトキシン研究、13、65-68. 医学図書出版 (株)、(東京).
2. 高橋 徹、井上一由、清水裕子、榎田佳奈、松三昌樹、片山 浩、森田 潔 (2009): ストレス蛋白HO-1は出血性ショックによる自然免疫系の活性化を抑制し消化管を保護する. エンドトキシン研究、12、61-63, 医学図書出版 (株)、(東京).

[その他]

ホームページ等

<http://www.okadaimasui.com/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

片山 浩 (KATAYAMA HIROSHI)  
岡山大学・岡山大学病院・准教授  
研究者番号：90161067

### (2) 研究分担者

森田 潔 (MORITA KIYOSHI)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：40108171  
清水 裕子 (SHIMIZU HIROKO)  
岡山大学・医学部・客員研究員  
研究者番号：80423284  
高橋 徹 (TAKAHASHI TORU)  
岡山大学・大学病院・准教授  
研究者番号：40252952 (H20~H21)