

機関番号：21601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20790464

研究課題名 (和文) 下肢虚血再還流障害の病態生理解析

研究課題名 (英文) Pathophysiological study of lower limb ischemia-reperfusion injury

研究代表者

加藤 菜穂 (KATO NAHO)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：20457766

研究成果の概要 (和文) : 挫滅症候群の動物実験モデルとしてマウス両大腿緊縛再還流モデルを作成し、遠隔障害臓器のひとつである腎における炎症性サイトカイン類の遺伝子発現を検討した。緊縛解除後に IL-6 mRNA の発現誘導と iNOS mRNA の発現抑制が観察された。野生型・IL-6KO 及び iNOSKO マウスの生存曲線を合わせると、IL-6 の保護的作用と iNOS の増悪的このモデルは作用が示唆された。24 時間以内に 50%以上という高い致死率を示すが、腎の病理組織所見の変化は尿細管上皮細胞の核萎縮と軽度の炎症細胞浸潤に留まった。

研究成果の概要 (英文) : The mouse bilateral hind limb tourniquet-reperfusion model can be considered as an experimental animal model of crush syndrome. By using this model, we investigated mRNA expression levels of various inflammatory cytokines in the kidney, a damaged organ distant from the ischemic hind limb. So, we found that the expression level of kidney IL-6 mRNA increased and that of iNOS mRNA decreased after reperfusion. In contrast, survival rates 24 h after ischemia-reperfusion were in the order of iNOS-deficient mice \geq C57Black/6J wild-type mice > IL-6-deficient mice. These results indicated that IL-6 plays an ameliorative role and that iNOS play a deteriorative role. This model shows a high mortality rate in mice, but morphological changes in the kidney, such as nuclear concentration of tubular epithelial cells and infiltration of inflammatory cells, were minor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：虚血再還流障害、挫滅症候群、IL-6 ノックアウトマウス、iNOS ノックアウトマウス、リアルタイム PCR

1. 研究開始当初の背景

大地震被災者は長時間にわたる四肢の圧迫により、救助後挫滅症候群により死亡することが少なくない。緊縛性ショックモデルは大腿部の緊縛による虚血とその後の再還流

がもたらす挫滅症候群の動物モデルである。ラット一側大腿緊縛モデルにおいて、緊縛解除後の再循環により破壊された筋細胞で生じたフリーラジカルなどがターゲット臓器を刺激し、肝及び腎で IL-6 及び iNOS mRNA

の発現が誘導された実績から、これらが二次的反応を誘発し、多臓器不全に至る可能性が考えられた。

一方、病態は異なるものの臓器移植の分野では、ターゲット臓器の虚血（摘出）と移植後の血液再循環を想定した研究が進んでおり、再還流後に IL-6 や iNOS の発現を観察している。一般に IL-6 及び iNOS は炎症増悪因子と考えられているが、遺伝子欠損マウスを使った大腿緊縛虚血/再還流モデルにおいて、二次性の遠隔臓器（肝・腎）障害を観察している報告はなく、さらに KO マウスを用いて下流遺伝子や代償性の遺伝子発現を観察する試みは希有である。

2. 研究の目的

控減症候群による多臓器不全の“引き金”を、虚血臓器（両大腿）に対する遠隔臓器（腎）における炎症性サイトカイン類の mRNA 発現量の変化から捉えること。

3. 研究の方法

(1) マウス緊縛性ショックモデル：C57Black/6J 野生型マウス、同 IL-6 ノックアウト (KO) マウス及び iNOSKO マウス (11~13 週齢、雄性) を用い、ペントバルビタール腹腔内投与による麻酔下に両鼠径部を輪ゴムで緊縛した。3 時間緊縛後解除しない群 (T3)、緊縛解除 1・2・3・12 時間後に観察する群 (TR1・TR2・TR3・TR12) を設定し、麻酔下に 6 時間置く群 (C) をコントロールとした。各群マウス数を表に示す。

	C	T3	TR1	TR2	TR3	TR12
WT	10	11	11	8	8	8
IL-6KO	10	9	9	9	8	8
iNOSKO	10	9	9	9	9	9

(2) 検体採取：深麻酔下に心臓採血後生理食塩水で血液還流し、腎を摘出した。

(3) リアルタイム PCR：(2) で採取した腎の一部から TRIZOL 法で RNA を抽出、逆転写して合成した cDNA を検体に、StepOne RealtimePCR System (Applied Biosystems) を用いて以下の項目を分析した。

IL-6 (Mm00446190_ml)
iNOS (Mm00440485_ml)
eNOS (Mm00435219_gl)
nNOS (Mm00435175_ml)
IL-1β (Mm01336189_ml)
TNF-α (Mm00443260_gl)

いずれもハウスキーピング遺伝子である β-actin (Mm00607939_sl) の発現量で除した値を Student-t 検定し、 $p < 0.05$ で有意差ありと判断した。

(4) 血液生化学検査及び ELISA による血中サイトカイン類の定量：(2) で採取した心臓

血の一部は血液生化学的検査に供した。また野生型マウスの C・T3・TR3 群については心臓血から得た血漿を検体に、Leptin, TNF-α, IGF-1, IL-6, VEGF, IL-1α, IL-1β, G-CSF の 8 項目の濃度を Mouse Cytokine ELISA Strip I for Profiling 8 Cytokines (Signosis) で測定した (各群 $n=6$)。統計処理には Mann-Whitney 検定を用いた。

(5) 組織学的検討：(2) で採取した腎の一部を常法に従い H-E 染色し、光学顕微鏡で観察した (各群 $n=3$)。

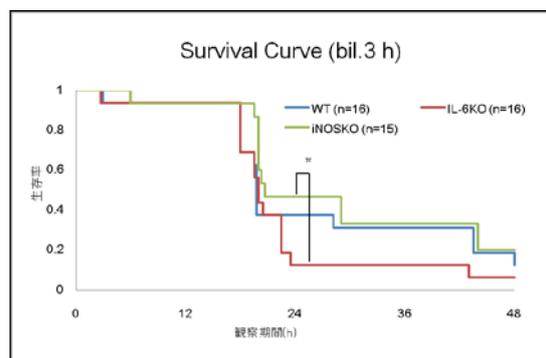
(6) 新たなマウス緊縛性ショックモデル：C57Black/6J 野生型マウス (11~13 週齢) を用い、同様の手順で両鼠径部を 1.5 時間緊縛し、再還流後 48 時間の生存曲線作成、リアルタイム PCR による腎における IL-6 及び iNOS mRNA 発現変化、並びに血液生化学的検討を行った (生存曲線： $n=19$ 、リアルタイム PCR：各群 $n=7$)。統計処理には Student t 検定を用いた。

(7) ポストコンディショニング (PC) 処置による臓器障害軽減効果の検討：マウス両大腿 1.5 時間緊縛モデルに対し、PC として「緊縛解除後 1 分間再還流 10 分間再緊縛」処置を施し、再還流後 48 時間の生存曲線作成、リアルタイム PCR による IL-6 及び iNOS mRNA 発現変化、並びに血液生化学的検討を行った (生存曲線： $n=24$ 、リアルタイム PCR：各群 $n=4$)。統計処理には Mann-Whitney 検定を用いた。

4. 研究成果

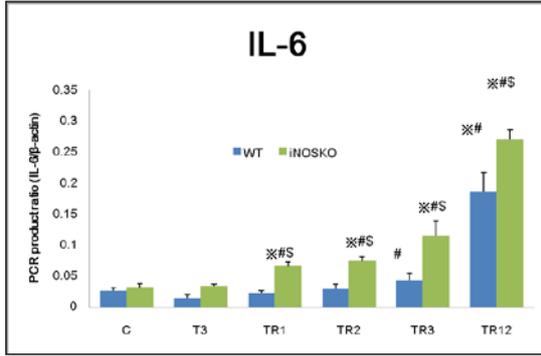
(1) 緊縛性ショックに対する IL-6 及び iNOS の作用について

① 本研究開始前に、マウス両大腿 3 時間緊縛モデルにおける再還流後 48 時間の致死率が IL-6KO > 野生型 \geq iNOSKO であり、Fisher の直接確率計算法で緊縛解除 24 時間後の IL-6KO 及び iNOSKO マウス間の生存率に有意差があることを確認している。

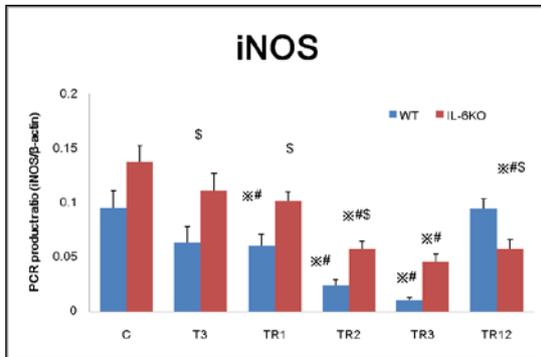


② 同モデル腎における IL-6 mRNA 発現量は野生型マウス・iNOSKO マウスとも緊縛解除後に増加し、野生型マウスでは TR3・TR12 群で、iNOSKO マウスでは TR1 群以降で有意な差となった (図中※： $p < 0.05$ vs C, #:

p<0.05 vs T3, \$: p<0.05 vs WT, 以下同様).

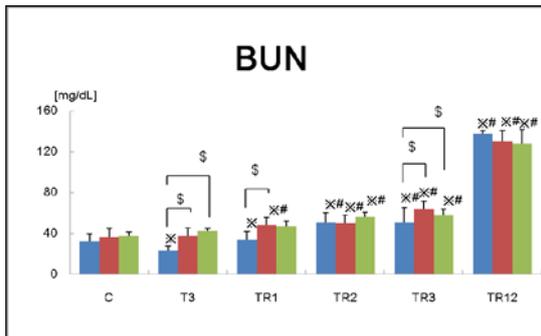


③同モデル腎における iNOSmRNA 発現量は野生型マウス・IL-6KO マウスとも緊縛解除後に減少し、ともに TR2・TR3 群で有意な差となった。



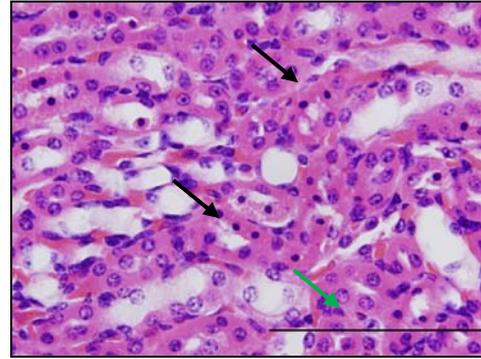
④IL-6 mRNA 発現量の変化は野生型マウスよりも iNOSKO マウスで、iNOS mRNA 発現量の変化は IL-6KO マウスよりも野生型マウスで有意に高度であった。

⑤BUN 値は TR3 群では各 KO マウスが野生型より有意に高値を示し、TR12 群では遺伝子型によらず全例 100mg/dl を超える高度の変化を認めた。



⑥腎の H-E 染色では遺伝子型によらず TR12 群の全例で尿細管上皮細胞の核濃縮及び軽度の炎症細胞浸潤を認めた。

図は野生型 TR12 群 (×400), →が尿細管上皮細胞核濃縮, →が炎症細胞。



(a)尿細管上皮細胞核濃縮

	C	T3	TR3	TR12
WT	0/3	0/3	1/3	3/3
IL-6KO	0/3	0/3	1/3	3/3
iNOSKO	0/3	0/3	2/3	3/3

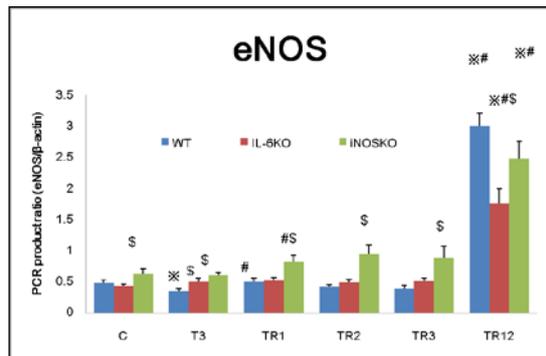
(b)炎症細胞浸潤

	C	T3	TR3	TR12
WT	0/3	0/3	1/3	3/3
IL-6KO	0/3	0/3	3/3	3/3
iNOSKO	0/3	0/3	3/3	3/3

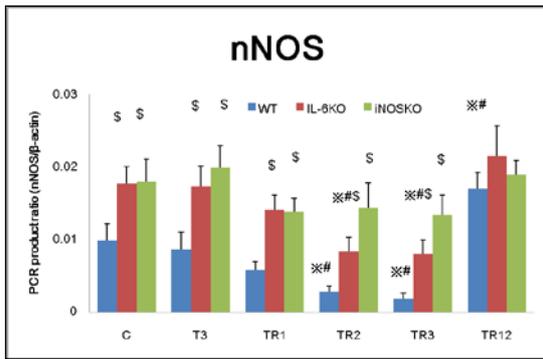
⑦以上から、本病態下での腎障害に対し、IL-6 の保護的な、iNOS の増悪的な作用が示唆された。

(2) 両大腿 3 時間緊縛モデル腎におけるその他の mRNA 発現量の変化について

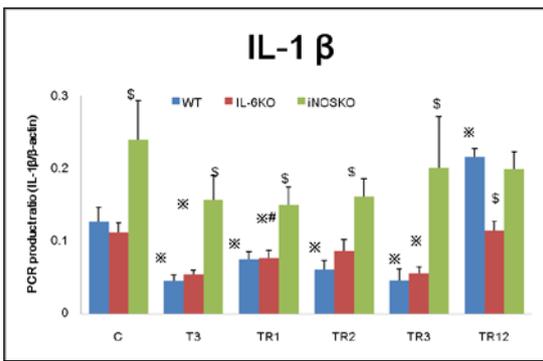
①eNOS mRNA は各遺伝子型マウスとも緊縛解除後に増加し、TR12 群で有意な変化となった。再還流 3 時間以内では iNOSKO マウスで他の遺伝子型より発現量は多く、iNOS 抑制の影響及び晚期臓器障害の結果と考えられた。



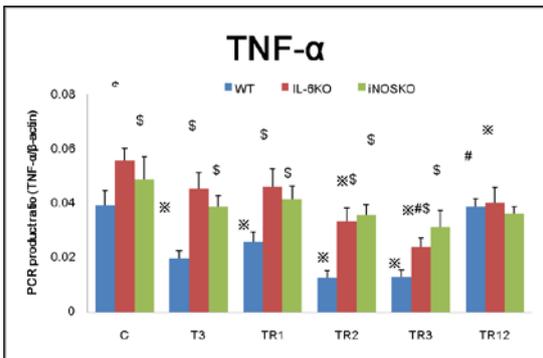
②nNOS mRNA は野生型及び IL-6KO マウスでは再還流 3 時間以内は発現低下、iNOSKO マウスではこの間の変化はなく、TR12 群ではいずれの遺伝子型でも有意に増加した。nNOS の変化のパターンは、野生型及び IL-6KO マウスでは iNOS の変化と近似していた。



③IL-1 β mRNA は、野生型及び IL-6KO マウスでは再還流 3 時間以内は発現低下し TR12 群で上昇に転じた一方, iNOSKO マウスでは経過を通じて変化がなかった。



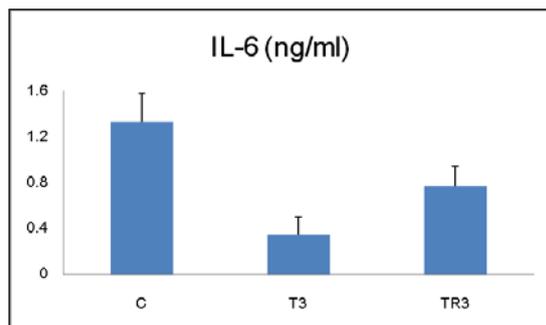
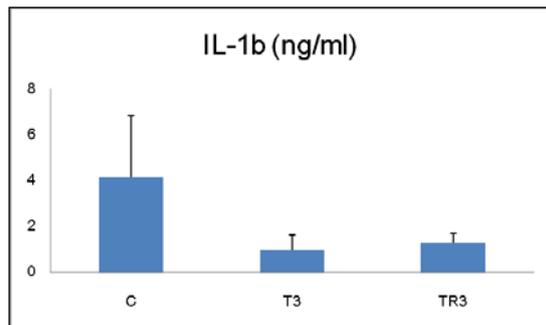
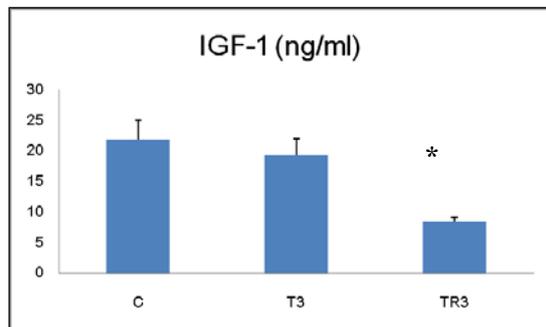
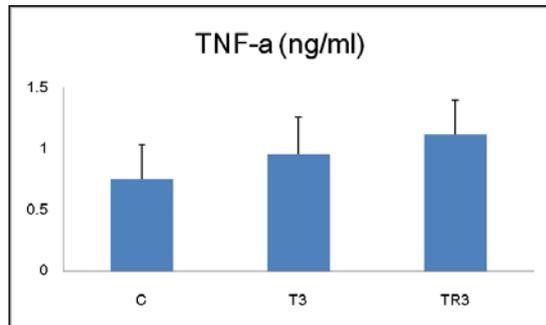
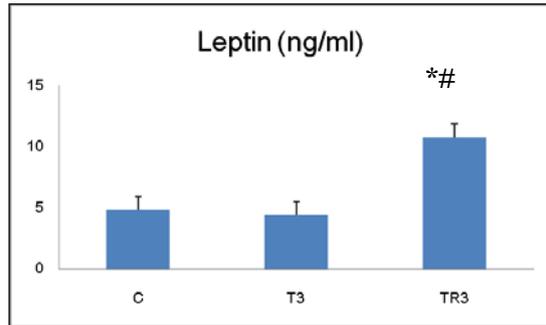
④TNF- α mRNA 発現量は野生型マウスでは再還流後 3 時間以内は発現低下した一方, IL-6KO 及び iNOSKO マウスでは野生型に比較し発現が多く, 経過を通じての著明な発現量変化は見られなかった。

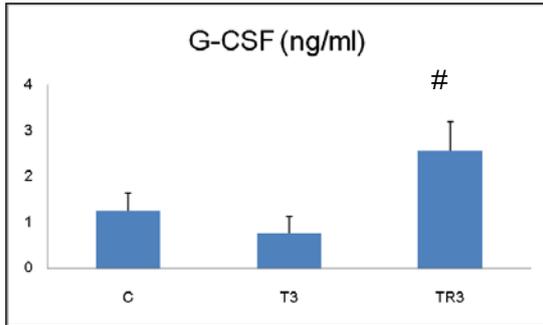


⑤以上から、本モデルにおいて、eNOS, nNOS 及び IL-1 β 発現量は iNOS 発現量と関連し, TNF- α の関与は少ない可能性が考えられた.IL-6 と連動する mRNA が明らかとなれば, 病態の理解が深まるものと考えられる。

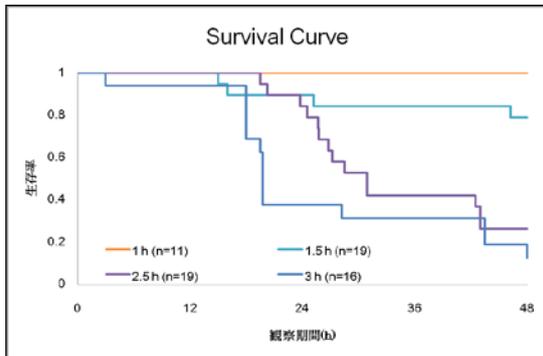
(3) ELISA を用いた炎症性サイトカイン類の定量：両大腿 3 時間緊縛モデル野生型マウスから採取した血漿を検体に Leptin, TNF- α , IGF-1, IL-6, VEGF, IL-1 α , IL-1 β , G-CSF の 8 項目の濃度を ELISA 法で測定したところ,

TR3 群の Leptin 及び G-CSF の増加と IGF-1 の減少が観察された. TNF- α , IL-6, IL-1 β は有意な変化を来さず, VEGF, IL-1 α は全ての検体で検出されなかった。

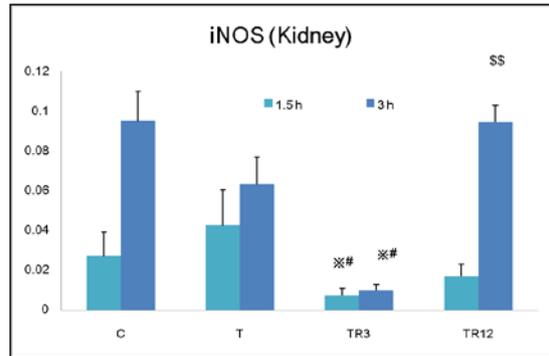
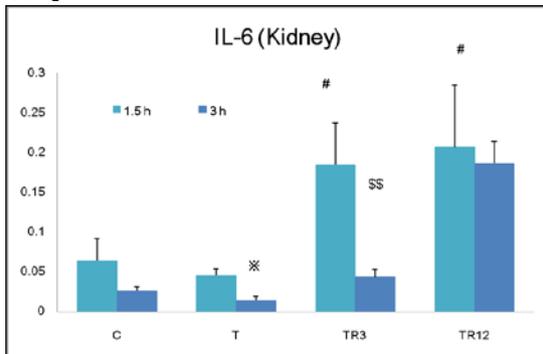




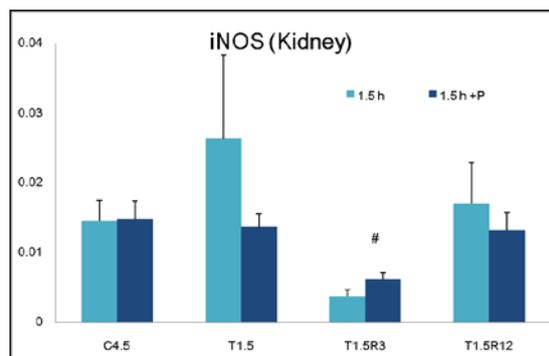
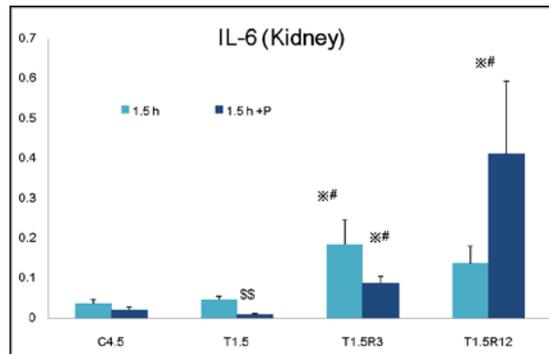
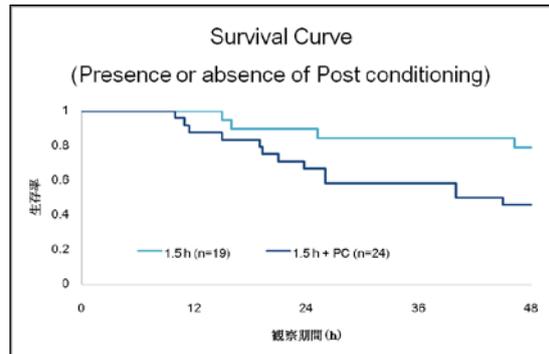
(4) 両大腿 1.5 時間緊縛モデルにおける検討
 ① 両大腿 3 時間緊縛モデルの致死率は各遺伝子型マウスとも 24 時間以内に 50% 以上と非常に高く、結果 (1) - (7), (2) - (5) に示すように、IL-6 及び iNOS を除いた特定の mRNA 発現変化と臓器障害の関連性は判然としない。そこでより軽度の緊縛再還流刺激として 48 時間以内の致死率が 21% であった両大腿 1.5 時間緊縛モデル (図中水色) を採用した。



② 両大腿 1.5 時間緊縛モデル野生型マウスの腎における IL-6 及び iNOS 発現パターンは両大腿 3 時間緊縛モデルと類似しており、他の関連遺伝子発現パターンの検討により、臓器障害成立の“境界”を見出せる可能性が示唆された (図中※: $p < 0.05$ vs C, #: $p < 0.05$ vs T3, \$\$: $p < 0.05$ vs 1.5h)。



(5) ポストコンディショニング (PC) 処置による臓器障害軽減効果の検討: マウス両大腿 1.5 時間緊縛モデルに対し、PC として「緊縛解除後 1 分間再還流 10 分間再緊縛」処置を施し、生存曲線と腎における IL-6 及び iNOS mRNA 発現量の変化を比較したが、PC による有意な変化を認めなかった (図中※: $p < 0.05$ vs C, #: $p < 0.05$ vs T3, \$\$: $p < 0.05$ vs 1.5h)。



(6) 今後の展望

①本研究結果からは、両大腿 3 時間緊縛再還流後の腎における IL-6 mRNA 発現の増加と iNOS mRNA 発現の減少を観察した。iNOS mRNA 発現減少は先行研究及び臓器移植分野における虚血再還流障害に関する研究では認められていないことから、従来とは異なる障害機序も示唆される。

②より致死率の低い条件である両大腿 1.5 時間緊縛再還流モデルマウスで、炎症性サイトカインを主とした各種遺伝子のより明確な病態変化への関与を捉えることができれば、挫滅症候群の新たな治療法開発の糸口となる可能性がある。検討項目としては、本研究結果 (3) に示した ELISA による血中サイトカイン類濃度変化や、平成 22~24 年度日本学術振興会科学研究費補助金研究課題「緊縛性ショックマウスにおける多臓器不全因子の分子生物学的解析 (基盤 (C): 課題番号 22590639, 研究代表者: 平岩幸一) において 3 時間緊縛/3 時間再還流後の野生型マウスヒラメ筋を試料とした DNA マイクロアレイ分析結果を踏まえて選定する。

③肝・腎などの遠隔臓器の一部からはタンパク質を抽出し、遺伝子発現量を検討する物質の臓器中濃度測定も考慮する。

④IL-6 や iNOS の作用をより明確化するために、IL-6 and/or iNOS を抑制する条件を検討する。副腎皮質ステロイド、好中球エラストラーゼ阻害剤、NOS 阻害剤の投与や、IL-6/iNOS ダブルノックアウトマウスの作成を考慮する。

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)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Naho Kato, Sumiko Abe, Miwako Suto, Kouichi Hiraiwa. Comparison of renal dysfunction in wild-type, IL-6 KO and iNOS KO mice hind limb tourniquet-reperfusion model. Legal Medicine (査読あり), 11, 2009, S248-251.

2. Satoru Mitazaki, Naho Kato, Miwako Suto, Kouichi Hiraiwa, Sumiko Abe. Interleukin-6 deficiency accelerates cisplatin-induced acute renal failure but not systemic injury. Toxicology (査読あり), 265, 2009, 115-121.

[学会発表] (計 3 件)

1. 加藤菜穂, 西形里絵, 須藤美和子, 水澤郁文, 栗崎恵美子, 平岩幸一. 新たな両後肢緊縛再還流条件によるマウスの腎障害について, 第 11 回日本法医学会北日本地方会, 平成 22 年 10 月 15 日, 福島.

2. Naho Kato, Sumiko Abe, Miwako Suto, Kouichi Hiraiwa. Comparison of renal dysfunction in wild-type, IL-6 KO and iNOS KO mice hind limb tourniquet-reperfusion model, , 7th International Symposium ADVANCES IN LEGAL MEDICINE, 平成 21 年 9 月 3 日, 大阪.

3. 加藤菜穂, 阿部すみ子, 須藤美和子, 平岩幸一. マウスの緊縛性ショックにおける IL-6 及び iNOS の関与, 第 93 次日本法医学会学術全国集会, 平成 21 年 5 月 14 日, 大阪.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 菜穂 (KATO NAHO)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 20457766

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし