

平成23年2月28日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791324
 研究課題名（和文） 敗血症病態における経腸栄養による消化管デスレセプターシグナル抑制の解明
 研究課題名（英文） Decreased death receptor pathway of apoptotic signaling in septic mouse gut: effect of nutrition support

研究代表者

二木 元典 (MOTONORI FUTATSUGI)
 京都大学・医学研究科・助教
 研究者番号：70419589

研究成果の概要（和文）：本研究では、CLP(盲腸結紮穿孔)誘導敗血症マウスの消化管において、TNFR-1, Fas, 活性化型 caspase3 の発現は十二指腸や空腸、回腸において高まっていた。また、CLP(盲腸結紮穿孔)誘導敗血症マウスに経腸栄養剤を投与した場合には TNFR-1, Fas, 活性化型 caspase3 の発現は抑制された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we found that the expression of TNF-R1, Fas, and cleaved caspase-3 was elevated in duodenum or jejunum or ileum in digestive tract of CLP-induced septic mice. In ileum of CLP-induced septic mice with EN, and the expression of death receptors (TNF-R1, Fas) and cleaved caspase-3 was down-regulated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
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：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：敗血症、経腸栄養、Death受容体

1. 研究開始当初の背景

敗血症は感染症を原因として惹起される全

身性炎症症候群 (systemic inflammatory response syndrome: SIRS) である。多発外傷や広範囲熱傷などの救急症例においても、2nd hit として敗血症が作用し、急性肺傷害、急性腎不全などの多臓器不全や、播種性血管内凝固症候群を誘導する。この敗血症病態では、炎症性サイトカインや炎症性物質が血液中に過剰に放出されることで、サイトカインストームとしてショックや多臓器不全を導くことが、これまでの研究により明らかにされている。さらに近年は、炎症性サイトカインや炎症性物質の受容体が、主要臓器の細胞や血管に存在し、主要臓器の炎症を増強することが分子レベルで明らかとされてきた。

このような敗血症の病態では、炎症性反応の側面ばかりではなく、さまざまな細胞のアポトーシスが確認できる。このアポトーシスには、tumor necrosis receptor (TNF-R), Fas, TRAIL 受容体 (DR4, DR5) といった Death 受容体群の活性化が関与することが明らかとなっている。

2. 研究の目的

近年、高度侵襲手術の術後や、多発外傷、広範囲熱傷などの集中治療管理において、栄養管理の重要性が再認識されている。中心静脈栄養に比較して、経腸栄養は感染症合併率を低下させ、生体侵襲の 24 時間以内に開始する早期経腸栄養により、さらに感染症合併率が低下することが検証されている。また、腸切除術後といえども、早期経腸栄養により生存率が高まることが、Cochrane Database に 2006 年にまとめられた。しかし、消化管を含めた主要臓器細胞に対する経腸栄養の保護作用は、未だ、臓器に特化した分子レベルでの十分な解明と理解が得られていない。本研究では、敗血症モデル動物を用いて、経腸栄養の有用性を分子生物学的手法で評価

する。経腸栄養による消化管の「炎症」と「再生」の組織化学的評価を行い、さらに「アポトーシス進行と経腸栄養の関連」を調査する。特に、アポトーシスを誘導する Death 受容体シグナルの消化管における解析として、消化管を食道、胃、空腸、結腸などのように、部位特異差にもこだわり、アポトーシス関連蛋白の mRNA および蛋白発現を評価する。また、Death 受容体ドメインの small interfering RNA (siRNA) やノックアウトマウスを用いて、アポトーシス抑制の観点より、敗血症病態における Death 受容体シグナルと経腸栄養の関連を明らかとする。敗血症病態における消化管の Death 受容体シグナルについての詳細な解析は、これまでに認められない。本研究は、消化管の細胞側の観点にたち、消化管傷害の機序を追及するものであり、アポトーシスと経腸栄養の関連を探る点に学術的特色と独創性を持つ。これまでの予備研究より、経腸栄養の役割は消化管免疫のみならず、腸の蠕動運動を介して腸の粘膜バリアの Death 受容体シグナルを抑制する結果が予想される。経腸栄養による消化管保護の可能性を探る本研究は、経腸栄養の有用性を分子レベルで証明する点に、学術的意義を持つ。

3. 研究の方法

(1) 敗血症動物の作成

研究動物には雄性BALB-Cマウス (8-10週、体重20-25g) を用いる。敗血症モデル動物は、以下の方法で、CLP(盲腸結紮穿孔)モデルとして作成される。セボフルラン麻酔下で、左臍下に約5 mmの皮膚切開を行い、虫垂を膨出した後、虫垂の先端に糞便を充満させ、先端約5 mmを結紮し、21 G針で2箇所穿孔を加える。対照群は腹膜切開と虫垂先端の膨出のみを行ったものとする。虫垂を腹腔内にもどした後、皮膚切開部を縫合する。対照群は皮膚切開と

縫合操作のみを加えたものとし、敗血症6時間群、敗血症10時間群、敗血症24時間、敗血症48時間群を研究対象とする。この敗血症病態モデルは、以下の参考研究をはじめとし、当研究室においても感染を基盤としたSIRSを惹起することが確認されている。

(2) 消化管におけるアポトーシスの出現の免疫組織化学的手法を用いた経時的空間的評価

敗血症の時系列に沿って、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、上行結腸および下行結腸をセボフルラン麻酔下で摘出し、各組織を凍結切片あるいはパラフィン切片とし、ヘマトキシリン・エオジン染色、TUNEL 染色、およびさまざまな抗体を用いた免疫組織学的評価を行う。

免疫組織染色では、アポトーシス関連受容体である Death 受容体ファミリー (TNF-R1, TNF-R2, Fas, DR4, DR5) と、その下流のアダプター蛋白である Fas associated death domain (FADD), アポトーシス抑制因子である c-FLIP, Bcl-X など、さらにアポトーシス誘導因子として caspase8, caspase10, caspase1, caspase3 などを評価する。この免疫組織染色により、敗血症病態の時系列に沿って、消化管でアポトーシスの生じる細胞の同定し、アポトーシス進行の方向性と、消化管部位における差異を評価する。

(3) Death 受容体ファミリーおよびアポトーシス関連因子の発現量の定量比較

敗血症の時系列に沿って上述の方法で摘出された食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、上行結腸および下行結腸の Death 受容体ファミリーやアポトーシス関連因子の蛋白レベルおよび mRNA レベルの発現解析を、ウェスタンブロット法と RT-PCR 法で行なう。これにより、各種消化管におけるアポトーシス誘

導の差異を比較する。さらに、各消化器官組織からは、DNA を分離し、DNA 断絶をラダー解析する。

4. 研究成果

(1) 雄性マウスを用いて、24 時間の絶食の後に CLP(盲腸結紮穿孔)作成し、48 時間の絶食を行った後、各消化管(食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、上行結腸、下行結腸)のサンプリングを行い、Western blot 法により腸管粘膜上の Fas, TNFR-1, 活性化型 caspase3 のタンパク発現を評価した。Fas (50kDa)は空腸に強く発現し、TNFR-1 (55kDa)は空腸と回腸に強く発現した。活性化型 caspase3 (17kDa)は十二指腸と空腸に強く発現した。

(2) 雄性マウスを用いて、24 時間の絶食の後に CLP(盲腸結紮穿孔)作成し、48 時間絶食群、水分投与群(水分のみを 8 時間毎に投与)、経腸栄養群(経腸栄養を 8 時間毎に投与)の 3 群に分け、空腸における Fas, TNFR-1, 活性化型 caspase3 のタンパク発現を評価した。経腸栄養剤としては、EPA(エイコサペンタエン酸)および GLA(γ -リノレン酸)配合経腸栄養剤(オキシパー®)を用いた。Fas 発現は 48 時間絶食群および水分投与群では高レベルの発現を示したが、経腸栄養群では、Fas 発現は有意に低下していた。TNFR-1 発現は 48 時間絶食群では高レベルの発現を示したが、水分投与群および経腸栄養群では、TNFR-1 発現は全く認められなかった。活性化型 caspase3 発現は 48 時間絶食群では高レベルの発現を示したが、水分投与群では活性化型 caspase3 発現は有意に低下し、経腸栄養群では活性化型 caspase3 発現は全く認められなかった。

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)

〔学会発表〕（計 3 件）

①平成 21 年 4 月 2 日

第 109 回日本外科学会総会（福岡市）

発表表題「敗血症病態の胃腸管における
EPA/GLA 配合経腸栄養剤のアポトーシス抑制
作用」

発表者：二木 元典

②平成 21 年 10 月 29 日

第 37 回日本救急医学会総会（盛岡市）

発表表題「敗血症病態の消化管における
EPA/GLA 配合経腸栄養剤の caspase 3 発現の
抑制効果」

発表者：二木 元典

③平成 22 年 4 月 9 日

第 110 回日本外科学会総会（名古屋市）

発表表題「敗血症病態の消化管における
EPA/GLA 配合経腸栄養剤のアポトーシス抑制
作用」

発表者：二木 元典

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二木 元典 (MOTONORI FUTATSUGI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：70419589