

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591977

研究課題名（和文） 全身性炎症反応時におけるオートファジーの役割の検討とその制御法の開発について

研究課題名（英文） The role and the control method of autophagy at systemic inflammation.

研究代表者

萩原 聡 (Hagiwara Satoshi)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：50527661

研究成果の概要（和文）：

急性全身性炎症反応症候群においてオートファジーが誘導されることが示された。このオートファジーの誘導は全身性炎症反応症候群における臓器傷害に深く関与している可能性が示唆された。一方、全身性炎症反応症候群時において適切な栄養管理はオートファジーを減弱させ臓器傷害等の改善に寄与できるかもしれない。

研究成果の概要（英文）：

Autophagy is activated at systemic inflammation. This activation may contribute to the inflammatory process and tissue injury observed after systemic inflammation. On the other hand, adequate nutrition improves systemic inflammation by reducing autophagy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医学 臨床分野

科研費の分科・細目：麻酔科

キーワード：オートファジー、敗血症、エンドトキシン、静脈栄養、炎症

1. 研究開始当初の背景

細胞死は、細胞死を起こしたときの形態学上の違いから次の3つのタイプに分類されている。タイプ1細胞死としては、アポトーシスによるものを指しており、この細胞死は、クロマチンが凝縮して細胞核が断片化するという形態上の特徴を示す。タイプ3細胞死としては、ネクロシス型のプログラム細胞死であり、細胞内小器官や細胞質膜の膨化を形態上の特徴とする。近年、タイプ2細胞死として、オートファジー(Autophagy)を伴う細胞死が注目を集めている。この細胞死は、細胞質内にオートファゴソームと呼ばれる小胞が形成されるという形態上の特徴を示す。また、細胞核の萎縮が見られるが、断片化はあまり見られない。オートファジーは、細胞が持っている、細胞内のタンパク質を分解するための仕組みの一つであり、酵母からヒトにいたるまでのすべての真核生物に見られる機構である。オートファジーの役割としては、細胞内での異常タンパク質の蓄積防止、過剰に合成されたタンパク質や栄養環境が悪化したときのタンパク質のリサイクル、細胞質内に侵入した病原微生物を排除するといった作用であり、生体の恒常性維持に関与している重要な細胞機能の一つである。

生体にとって、細胞の増殖と細胞死の均衡を保ち恒常性を維持することは重要であり、オートファジーはこの生体の恒常性を維持するために重要な機構の一つである。しかし、疾患に陥った場合は、しばしばこの恒常性がバランスを失っている場合がある。実際、オートファジーが個体発生の過程でのプログラム細胞死や、神経疾患、癌などにも関与することが知られており、近年その重要性から各種疾患との関係において注目を集めている細胞機構のひとつである。

一方、敗血症や外傷、重要臓器の虚血再環流、熱傷などは、いずれの疾患においても、全身性に炎症を生じることで、様々な臓器に対して機能障害を引き起こし、最終的には死に至る重篤な疾患である。治療法が進歩してきた現在でも、集中治療領域において難治性疾患群である。現在までの研究において、これらの疾患によって生じた過剰な全身性炎症反応が、細胞死を生じさせ、最終的には重要臓器の機能障害に陥ることが考えられている。この臓器障害に新たな細胞死としてオートファジーの関与が考えられている。

2. 研究の目的

全身性炎症反応に伴う臓器障害の病態形成過程において、それらを構成する細胞の障害が重要である。近年、この細胞障害の過程にオートファジーの関与が言われている。オートファジーを誘導するストレス経路には様々なものがあるが、その一つに小胞体ストレスを介した経路が知られている。小胞体ストレスとは、様々な原因により強いストレスが細胞にかかることで、小胞体内に異常タンパク質が蓄積し誘導される現象であるが、最近の研究では炎症反応において、小胞体ストレスが重要役割を演じており、やはり細胞障害性との関連性も指摘されている。そこで、今回の研究において、炎症反応時におけるオートファジーのメカニズムとして小胞体ストレスとの関連性に着目し更なる検討を行うこととした。

今回の研究では、炎症反応におけるオートファジー活性化の経路や役割を明らかにするとともに、オートファジーを制御する方法を検討し、全身性炎症反応症候群での治療における新たな可能性を模索することを目的とした。

3. 研究の方法

初めに、Wistar 系雄性ラット(体重 250-300g)に、エンドトキシン(LPS 10mg/kg)を静注することで全身性炎症モデルを作成。次の各群に対して検討を行った。

- a) 正常コントロール群
- b) LPS 投与群

エンドトキシン投与後の経時的な血清中サイトカイン濃度および HMGB1 濃度の検討並びに 12 時間後にセボフルレン吸入麻酔下で、犠死させ肝組織を摘出。なお、炎症反応の指標としては、High mobility group box 1(HMGB1)および血清サイトカインを用い、各群間におけるラットの肝組織標本、肝組織中 HMGB1 濃度を検討した。

更に、炎症時のオートファジーの制御法の検討として各種栄養素投与による影響を検討した。上述と同様に、Wistar 系雄性ラット(体重 250-300g)に、エンドトキシン(LPS 10mg/kg)を静注することで全身性炎症モデルを作成。次の各群に対して検討を行った。

- a) 生食持続投与群
- b) 5%グルコース持続投与群
- c) アミノ酸持続投与群
- d) LPS + 生食持続投与群
- e) LPS + 5%グルコース持続投与群
- f) LPS + アミノ酸持続投与群

エンドトキシン投与後の経時的な血清中サイトカイン濃度および HMGB1 濃度の検討並びに 12 時間後にセボフルレン吸入麻酔下で、犠死させ肝組織を摘出。各群間におけるラットの肝組織標本、肝組織中 HMGB1 濃度を検討、並びに HMGB1 の測定、核蛋白質抽出による NF- κ B 等の活性化測定を施行した。

4. 研究成果

LPS 投与後の炎症反応を検討した結果、LPS 投与により、血清中の炎症性サイトカインや

HMGB1 といった蛋白の有意な上昇を認めた。

さらに、LPS 投与における肝臓への影響を検討するため、肝組織における炎症像を評価(壊死、出血、炎症細胞浸潤、浮腫)した。この結果、LPS 投与 12 時間後に肝小葉構造の破壊や炎症細胞の浸潤などを認め、これらの変化は正常コントロール群に比べて有意に悪化することが明らかになった。この際の、肝臓におけるオートファジーの発現について検討すると、電子顕微鏡写真にて正常コントロール群に比べて、増加していること像を捉えることが出来た。また、発現の変化を定量化するために、免疫染色および Immunoblotting 法による検討を施行し、オートファジー発現の指標である LC-II や Atg7 の発現増加を認めた。

LPS 投与により、血清中の炎症性サイトカインや HMGB1 といった蛋白の有意な上昇を認めた。さらに、LPS 投与 12 時間後に肝小葉構造の破壊や炎症細胞の浸潤などを認め、この際の、肝臓におけるオートファジーの発現について検討すると、電子顕微鏡写真にて正常コントロール群に比べて、増加していた。一方、5%グルコース持続やアミノ酸の持続投与により血清中サイトカイン濃度および HMGB1 濃度の低下やオートファジーの減少をとらえることが出来た。更に、NF- κ B を中心とした炎症反応に関連した核内タンパク質の抑制が確認された。

これらの事実より、

①炎症反応時に生じる肝障害の原因のひとつに、オートファジーが関与していることが示唆された。

②炎症反応時に生じる肝障害の原因のひとつに、オートファジーが関与しており、エネルギー供与がこれらの病態改善に役立つ可能性が示唆された。

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 2 件)

1. Hagiwara S, Iwasaka H, Hasegawa A, Kudo K, Kusaka J, Oyama Y, Noguchi T.

Infusion of a Glucose Solution Reduces Autophagy in the Liver after LPS-induced Systemic Inflammation.

Inflammation. in press

2. Hagiwara S, Iwasaka H, Koga H, Hasegawa A, Kudo K, Kusaka J, Oyama Y, Noguchi T.

Stimulation of autophagy in the liver by lipopolysaccharide-induced systemic inflammation in a rat model of diabetes mellitus.

Biomed Res. 2010

[学会発表] (計 2 件)

① 萩原聡

重症患者管理における臓器保護戦略

関東甲信越 集中治療地方会 2010 年

② 今富良太、岩坂日出男、長谷川輝、萩原聡、野口隆之

敗血症モデルでの病態形成におけるオートファジーの関与について

第 15 回日本エンドトキシン研究会

2009 年

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

萩原 聡 (Hagiwara Satoshi)

大分大学・医学部・講師

研究者番号 : 50527661

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし