

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 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 年度～ 2011 年度

課題番号：21592304

研究課題名（和文）敗血症の多臓器不全に関連する細胞傷害シグナル経路を主要臓器系毎に解析する

研究課題名（英文）Analysis of cytotoxic signal pathway in organ dysfunctions associated with sepsis.

研究代表者

張 京浩（CHOU KYOUHIRO）

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50302708

研究成果の概要（和文）：敗血症性多臓器不全の病態生理を明らかにするために、培養細胞に炎症性 mediator を投与し、惹起される細胞障害シグナルを検討し、以下の知見を得た。

- (1) 炎症性 mediator により細胞死が起こり、そのメカニズムにアポトーシス機構が関与している。
- (2) 細胞障害性シグナルは NO 依存性や MAP kinase の依存性などにおいて、細胞種により異なる要素がある。
- (3) 細胞種により有効な薬剤が異なるが、抗炎症作用薬、抗酸化薬に細胞保護作用がある。
- (4) アポトーシスの阻害のみでは細胞死を抑制できず、それ以外の細胞死の関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the pathophysiology of organ dysfunction associated with sepsis, we have analyzed cytotoxicity induced by proinflammatory cytokines in various cultured cell lines.

- (1) A mixture of proinflammatory cytokines exerted synergistic cytotoxic effects and this cytotoxicity was mediated at least partially by the caspase-dependent apoptotic signaling pathway.
- (2) The profile of cytotoxicity differed according to cell types, in terms of nitric oxide or MAP kinase dependency.
- (3) Antiinflammatory agents or antioxidants showed prominent cytoprotective effects against the cytotoxicity induced by proinflammatory cytokines.
- (4) Cell death other than apoptosis was implied in the underlying mechanism of the cytotoxicity induced by proinflammatory cytokines.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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・細胞死・アポトーシス・多臓器不全・一酸化窒素・酸化ストレス・MAP kinase

1. 研究開始当初の背景

(1) 敗血症における臓器不全の病態生理はまだよくわかっていない。よって有効な治療法も確立しているとは言えない。

(2) 臓器不全の過程で、細胞傷害に関与するシグナル経路がどのように関与しているかも未解明である。例えば、アポトーシスシグナルの活性化の関与も強く疑われ、それを支持する実験的事実も蓄積しつつあるが、臨床の場でアポトーシスという機構が臓器不全にどれほど主要な役割を果たしているかは不明である。

(3) 敗血症時に産生される主要な炎症性メディエータの中で、NOの病態生理における役割も確定していない。一方、生体侵襲時におけるNOの細胞保護作用が最近相次いで報告されており、従来の炎症病態でのNO悪玉説にも再考が必要と考えられている。

2. 研究の目的

敗血症における多臓器不全の病態生理をより明確にし、それに対する有効な治療法をその機序とともに明らかにするために、

(1) 敗血症の炎症性メディエータ由来の臓器傷害モデルを各重要組織由来の培養細胞系で作成する。

(2) その臓器障害モデルでどのような細胞傷害性シグナルが活性化しているかを組織系毎に解析する。

(3) 活性化している細胞傷害性シグナルにおいては、(1)アポトーシスシグナル、(2)NOストレス、(3)炎症性転写因子、(4)酸化ストレス、の関与を系統的に解析する。

(4) 敗血症の治療に有望視されている薬剤の中で、細胞傷害性シグナル伝達を抑制する候補を選びだし、その作用機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) in vivo マウス敗血症モデルの作成
C57/B6 マウス (♂) に LPS (0, 10, or 25mg/kg) を腹腔内投与して作成。

24 時間後に麻酔下に開胸・開腹し重要臓器を摘出、液体窒素で急速凍結後、凍結下に粉末状にして、後の蛋白解析に用いた。

(2) in vitro 重症炎症モデルの作成
ラット近位尿細管細胞 (immortalized rat proximal tubular cell: IRPTC)、

ラット心筋筋芽細胞 (H9c2)、

ラット筋芽細胞 (C2c12)

ヒト肺腺癌上皮細胞 (A549)

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) 等を使用した。

各培養細胞に、LPS/TNF α /IFN γ 、或は IL-1 β /TNF α /IFN γ (inflammatory mediators: IM) を共投与して、重症炎症モデルとした。

(3) 測定系

Cell Viability: 細胞の固定染色 (crystal violet)、全細胞蛋白の濃度測定、漏出 LDH の測定

炎症反応: iNOS, Cox2, ICAM-1, PAI-1, I κ B の発現変化 (western blotting)

Apoptosis: PARP 及び caspase 7 の cleavage (western blotting)、caspase3 活性の測定、cytokeratin 18 の断片化 (ELISA)

NO 生成: 培養液中の nitrite の測定 (griess 法)

4. 研究成果

急性尿細管壊死のモデルとして、ラット近位尿細管細胞 (IRPTC) を用いた検討では、

(1) 炎症性 mediator により細胞死が起こり、そのメカニズムにアポトーシス機構が関与している。

(2) NOS 依存性及び非依存性の細胞死が関与している。

(3) その細胞死の抑制には、糖質グルココルチコイド、melatonin、アンジオテンシン受容体阻害薬等、抗炎症性作用薬が有効な一方、NADPH oxidase 阻害薬、catechin, dimethyl sulfoxide (DMSO) 等、抗酸化作用薬も有効等の知見を得た。

一方、急性肺障害のモデルとして、ヒト肺胞上皮細胞を用いた検討では、

(4) 本細胞系では炎症性刺激によっても iNOS の上昇は軽度であり、細胞種によって惹起される細胞傷害性シグナルは IRPTC と顕著に異なる。

(5) 炎症性 mediator により細胞死が生じ、アポトーシス機構の活性化も確認したが、アポトーシスの抑制のみでは細胞死の抑制効果は限定的であり、それ以外の細胞死機構の関与も重要である。

(6)炎症性 mediator により全ての MAP kinase が活性化し、その中で JNK の活性化が細胞死の一部関与している。

(7)細胞死を軽減する薬剤として、糖質グルチコイド、アンジオテンシン受容体阻害薬、DMSO 以外に、免疫抑制薬、mitoKATP channel 開口薬、cyclic AMP, ω 3 脂肪酸等が同定できた。

等の知見を得た。

以上、炎症性細胞傷害の分子機構に関して新しい知見を得る一方、抗炎症・抗酸化薬を治療に応用する際の分子基盤を提示するなど、意義深い成果を得た。

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 3 件)

(1)Muroya M, Chang K, Uchida K, Bougaki M, Yamada Y. Analysis of cytotoxicity induced by proinflammatory cytokines in the human alveolar epithelial cell line A549. Biosci Trends. 2012;6:70-80. DOI:

10.5582/bst.2012.v6.2.70 (査読有り)

(2)張京浩 NO: そのシグナル伝達と新たな臓器保護作用

the Journal of the Japanese Society for Pharmacesthesiology (日本麻酔・薬理学会誌) 2009;20:15-21 (査読無し)

(3)張京浩. 【Sepsis】病態生理各論. 一酸化窒素 (NO) と sepsis. Intensivist. 2009;1:257-66. (査読無し) (<http://www.medsj.co.jp/>)

[学会発表] (計 7 件)

(1)張京浩、山田芳嗣. 敗血症性臓器傷害には過剰な酸化ストレスの抑制が重要である。- 急性肺傷害モデルを例として - . 第 2 回 癌・炎症と α リポ酸研究会 2011. 11. 9 大分

(2)張京浩、山田芳嗣. 敗血症性急性肺傷害における肺胞上皮細胞傷害機構の解明. 第 38 回 日本救急医学会 2011. 10. 20 東京

(3)張京浩、内田寛治、室屋充明、坊垣昌彦、

山田芳嗣. 敗血症での多臓器不全の病態生理における酸化ストレスの役割. 第 58 回日本麻酔科学会 2011. 5. 19 神戸

(4)張京浩、内田寛治、室屋充明、坊垣昌彦、山田芳嗣. 敗血症での多臓器不全にアポトーシスは関与しているか? 第 57 回日本麻酔科学会 2010. 6. 3 福岡

(5)Kyungho Chang, Yoshitugu Yamada. Can iNOS be the target in blocking of cytotoxic signal activation in pathophysiology of sepsis? 第 5 回国際 NO 学会 2010. 5. 15 京都

(6) Kyungho Chang, Yoshitsugu Yamada. Analysis of sepsis-associated cytotoxic signal pathway in rat renal proximal tubular cells. The 10th Joint Scientific Congress of Korean society of critical care medicine and Japanese society of intensive care medicine. 2010. March 5, 広島

(7)張京浩、山田芳嗣. 敗血症性急性腎障害において、尿細管細胞で活性化しうる細胞傷害性シグナル経路の検討. 第 37 回日本救急医学会 2009. 10. 30 岩手

6. 研究組織

(1)研究代表者

張 京浩 (CHOU KYOUHIRO)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 50302708

(2)研究分担者

山田 芳嗣 (YAMADA YOSHITSUGU)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号: 30166748