

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 1 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592306

研究課題名（和文） 敗血症における高血糖状態の肝不全発症機序

研究課題名（英文） The mechanism of liver failure by hyperglycemia in septic state

研究代表者

松村 一弘（MATSUMURA KAZUHIRO）

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50378486

研究成果の概要（和文）：

敗血症モデルマウスを作製するのに適した LPS の基礎検討は困難であった。LPS 単独投与したマウスが生存している場合でも、炎症性サイトカインである TNF を抑える薬剤と併用すると死亡することから、炎症性サイトカインは生体防御反応において必要不可欠であると考えられた。一方、肝不全と関連がある小腸において、敗血症でも認められる高血糖状態と同じ糖尿病では、骨髄由来の Cajal 細胞との融合が減少していることを発見し雑誌に報告した。

研究成果の概要（英文）：

We studied basic experiments for the optimal LPS dose that induced septic state of mice. It was difficult to decide the optimal LPS dose that induced septic state. Then, we tried studying for the LPS dose using anti-TNF drug. Interestingly, the mice treated with only LPS were survived, and the mice treated with LPS and anti-TNF drug were dead. Probably, it means that inflammatory cytokines are necessary for the bio response at the inflammatory state. The further study is necessary. On the other hand, we studied gut function associated with liver failure at high glucose state induced by sepsis. At high glucose state of diabetes mellitus, Cajal cells from bone marrow were decreased in small intestine. We reported that.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 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：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：

(1) 敗血症 (2) サイトカイン (3) 肝不全 (4) 高血糖 (5) インスリン (6) LPS (7) 骨髄細胞 (8) 内皮細胞障害

1. 研究開始当初の背景

敗血症により、心不全、呼吸不全、腎不全、肝不全など多臓器不全が生じる可能性があり、その多臓器不全の中でも肝不全に対する対策は治療を行う上でも極めて重要である。しかしながら敗血症による肝不全の発症機序は未だ明らかではない。

2. 研究の目的

敗血症患者においても、Burghe らの報告で正常血糖状態が多臓器不全の頻度を低下させることから考えて、我われが報告してきた糖尿病と同じく、骨髄細胞よりの異常な細胞の各臓器細胞への融合が多臓器不全の発症に関連しているとの仮説を我々は立ててみた。すなわち敗血症において、肝臓での骨髄細胞からの異常なインスリン産生細胞の発現の有無と肝不全発症との関連について検討する。

3. 研究の方法

1) LPS を用いて作製した敗血症モデルマウスにおける、インスリンまたはプロインスリン陽性である骨髄細胞由来の異常細胞の出現についての検討実験。

LPS を用いて作製した敗血症モデルマウスにおいて、肝機能評価、内皮細胞障害を表すTAT, PAI-1 などの凝固線溶マーカー、炎症性サイトカインの濃度を測定する。また肝臓および骨髄の組織を調べ、プロインスリン、インスリン、CD 抗原マーカーの免疫染色を行い、それらの抗体に陽性の細胞が存在するかどうかにつき検索する。なおその臓器内の微小血管内皮細胞においても発現の有無につき調査す

る。ただし、この検索にてプロインスリン、インスリン、CD 抗原マーカー (CD45, CD11c, CD11b など) の染色が肝臓にて陽性とならない場合には、本研究を中止するものとする。

2) LPS を用いて作製した敗血症モデルマウスにおける骨髄由来細胞と、肝細胞や内皮細胞との細胞融合についての検討実験。

Green Fluorescent Protein (GFP) を遺伝子組み換えにて発現させたマウスの骨髄を、GFPを発現していないマウスに移植し、その後LPS を用いて敗血症を発症させたモデルマウスの肝細胞、内皮細胞に対し、GFPの発現を調べることにより、骨髄由来細胞との細胞融合が生じているかについて証明する。

3) insulin therapy による炎症性サイトカイン、凝固線溶マーカーへの影響

LPS を用いて作製した敗血症モデルマウスにおいて、insulin therapy を行う群、行わない群に分け、第1, 3, 5, 7病日にて採血検査を行いそれぞれの群における炎症性サイトカインの濃度 (IL-6, IL-8, TNF- α)、凝固線溶マーカーの測定 (TAT, soluble fibrin, PAI-1)、内皮細胞の防御 (異常な内皮細胞の出現の防止) に役立つか否かを検討する。

4) insulin therapy の肝障害への影響。

3) で分けた2群において、第1, 3, 5, 7病日にて採血検査を行い、肝機能 (GOT, GPT, γ -GTP, Alb, T-bil) を測定し、肝機能悪化の防御に役立つか否かを検討する。

5) insulin therapy における内皮細胞、臓

器細胞と骨髄由来細胞との細胞融合の影響

3) で分けた 2 群において、肝および骨髄を取り出し、臓器細胞、内皮細胞のプロインスリン、インスリン、CD 抗原マーカー、GF P の染色を行い、細胞融合の出現の有無を調べ、サイトカイン濃度、凝固線溶マーカー、臓器障害への相関関係につき検討する。

4. 研究成果

この研究を行うのにまず、LPS を用いた敗血症モデルマウスを作製する必要があった。敗血症モデルとしてのマウスを作製するのに適した LPS の投与量を確立するための基礎検討を行った。

LPS の投与量およびマウスの年齢別等を検討したが LPS 投与後すぐに死亡し、敗血症状態を呈する時間が極端に短く、敗血症モデル作成に適切な LPS の投与量を定めることが困難であった。

そのため、炎症性サイトカインである TNF を抑える薬剤を投与することで適切な LPS の投与量を調べてみることにした。

結果は興味深いことに、LPS 単独で投与したマウス群と LPS を投与したのち抗 TNF 作用の薬剤を投与したマウス群では、LPS 単独投与したマウス群が生存している場合でも抗 TNF 作用の薬剤を投与すると死亡することが分かった。

このことから感染状態で、炎症性サイトカインはある時期、生体防御反応において必要不可欠である可能性が考えられ、今後、抗 TNF 薬の濃度や投与時間による効果など、さらなる検討により炎症性サイトカインの役割が解明できる可能性があると考えられた。

また肝不全と関連がある腸管機能において、敗血症で引き起こされる高血糖との関連を調べたところ、高血糖である糖尿病での小腸では、骨髄由来の Cajal 細胞との融合が減少していることを発見し雑誌に報告した。

以上から高血糖状態により、骨髄細胞由来の異常な細胞の各臓器細胞への融合が多臓器不全の発症に関連している可能性があると思われる、敗血症状態で引き起こされる高血糖によっても同じことが引き起こされている可能性があると思われる。

敗血症で引き起こされる高血糖は、炎症性サイトカインとの関連も考えられ、今後、このサイトカインの生体への影響、また炎症物質である LPS との関係や抗 TNF 薬による影響について特に骨髄において検討する必要があると思われる。

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 1 件)

(1) Yimin Li, Hideto Kojima, Kazunori Fujino, Kazuhiro Matsumura, Miwako Katagi, Hiroshi Urabe, Lawrence Chan, Yutaka Eguchi, Linghui Zhao, Hiroshi Kimura

Homing of the Bone Marrow-Derived Interstitial Cells of Cajal Is Decreased in Diabetic Mouse Intestine

J Gastroen Hepatol J Gastroen Hepatol
26 2011 1072-1078 査読有

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松村 一弘 (MATSUMURA KAZUHIRO)
滋賀医科大学・医学部・准教授
研究者番号：50378496

(2) 研究分担者

藤野 和典 (FUJINO KAZUNORI)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：70402716