

## 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 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791764

研究課題名（和文） 敗血症性ショックにおけるアディポネクチンの役割と治療法の検討

研究課題名（英文） Adiponectin improves survival rate of septic shock in mice model

研究代表者

原口 剛 (HARAGUCHI GO)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40361729

研究成果の概要(和文):アディポネクチン過発現マウスにおいて敗血症の生命予後が改善され、それらは炎症の抑制作用を介していることが判明した。血中アディポネクチン濃度が正常の50%低値を示す、糖尿病患者と同様の低アディポネクチン血症ヘテロ体低発現マウス敗血症の生命予後が敗血症の生命予後が悪化することも判明した。これらは、低発現マウスにおいて炎症がより激しくなっていた。

研究成果の概要(英文): Adiponectin transgenic mice were improved survival rate with septic shock compared to wild type mice. Furthermore adiponectin anti-sense transgenic mice, low adiponectin mice were worsened survival rate. Adiponectin suppressed inflammatory signaling in cells involving with septic shock progression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	700000	210000	910000
2010年度	500000	150000	650000
2011年度	500000	150000	650000
年度			
年度			
総計	1700000	510000	2210000

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：集中治療医学

## 1. 研究開始当初の背景

集中治療室における、心臓疾患以外の内因性疾患による死亡の中では敗血症性ショックが最も高頻度である。しかも現在、明らかなエビデンスの確立した治療法は存在せず、最近20年間生命予後は改善していない。また、糖尿病患者の敗血症性ショックにおける予後が悪いことは以前から判明していた。また、ICU入室患者に対して血糖を厳しく管理することで生命予後の改善が認められるという報告も存在する。

## 2. 研究の目的

敗血症性ショックの発症後に投与を行い、生命予後を改善する薬剤もしくは治療法の開発が急務とされている。前述したように、糖尿病患者の感染症における生命予後は一般患者よりさらに悪い。糖尿病患者を特徴づけるものとしては、慢性炎症の存在とそれに伴うインスリン抵抗性の存在である。以前我々はアディポネクチンを制御していると考えられるPPARリガンドを投与することで重症敗血症マウスの生命予後が改善されることを発表している。このため、PPARよりさら

にインスリン抵抗性の根源であると考えられる、アディポネクチン過発現・低発現両トランスジェニックマウスを用いて敗血症の進展におけるアディポネクチンの役割の検討を行うことを目的として実験を行った。

### 3. 研究の方法

(1) ヒトの腹膜炎による敗血症と極めて近いモデルであると考えられている、マウスの盲腸を露出させて、穿刺し、便を腹腔内に流出させることにより、敗血症性ショックが発生する、マウス盲腸結紮穿刺モデルを20Gの針で作成した。これらにアディポネクチントランスジェニック（過発現）マウス群、アンチセンスアディポネクチントランスジェニック（低発現）マウス群（アディポネクチンの発現が正常の半分となっている。）コントロール群に分け、おのおの30匹ずつ作製して7日間後に生命予後を判定した。20G針による敗血症以外にも軽症例と考えられる21G針によるもの、重症例と考えられる18G針によるモデルも併せて作成した。予後の有意差を正確に検討するため各群は30匹のマウスを使用した。

(2) 上述モデルに対し、生命予後観察以外のマウスをおのおの15匹ずつ作成し、作成0, 12, 24時間後に採血を行い、ELISAにて炎症性サイトカインであり、かつ敗血症性ショックにて重要な役割を果たしていると考えられる血清中IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-10、ケモカインMCP-1の定量をELISAキット、プレートリーダーを用いて行った。次に肝障害の検討のため、血液中肝酵素の測定を行った。

(3) 肺障害、肝障害を視覚化してとらえるため、上記マウスを使用して12時間後、24時間後に肺組織と肝組織の凍結標本・ホルマリン固定標本を作製し、CD11b・リン酸化マップキナーゼによる免疫組織染色を行った。また組織の傷害の程度の検討も行った。さらに肺傷害の検討のためMPO活性測定を過酸化水素法を使用して行った。

(4) マウス単核球系培養細胞であるJ773細胞とマウスの腹水からフィコールを使って遠心分離行って採取したマクロファージ、血中から採取した単核球を用いて、ERK、JNK、p38のいわゆるマップキナーゼアッセイを行い、炎症のアディポネクチンによるブロックの経路を検討した。また、過発現マウスに対して、アディポネクチンの下流にあると考えられるAMPKの阻害剤である、compoundCを投与することによって、生命予後・炎症抑制作用が打ち消されるか検討を行った。

(5) 上記細胞からメッセンジャーRNAを採取して相補DNAの作成を行い、サイバーグリーンを用いた定量PCR法を用いてアディポネクチンの受容体1、2の発現の検討を行った。受容体以外にもbcl、Baxなどアポトーシスに関連するような遺伝子の発現の検討も行った。

### 4. 研究成果

(1) アディポネクチン Tg マウスは盲腸結紮穿刺による敗血症の予後が改善することが示され、その効果は炎症所見の減弱によるものであった。ワイルドタイプマウス1週間生存率30%に対し、過発現マウスは43%であり、低発現マウスは6.6%ときわめて生存率が悪かった。また、21G針による軽症例において過発現マウスは生存率87%とワイルドタイプの60%より著明な改善認められたが、逆に低発現マウスにても生存率50%と有意な低下は認めなかった。最重症例と考えられる18G針によるモデルでは、過発現7%、ワイルドタイプ3.3%、低発現3.3%と3グループ間に予後の有意差は認められなかった。これらは最重症例の予後を改善するほどの抗炎症効果をアディポネクチンは敗血症によるショック後には発揮できないことを示しているが、ヒト臨床における一般的な予後の敗血症においては改善する可能性があることも示された。

(2) 血中サイトカイン濃度は予後と相関関係があり、IL-6、TNF- $\alpha$ 、MCP-1はワイルドタイプ、低発現マウスで上昇しており、抗炎症性サイトカインと考えられている、IL-10は過発現マウスで上昇していた。これらは炎症がアディポネクチンによって早期に抑制されていることが示された。

(3) マウス腹腔内マクロファージ・肺組織におけるアディポネクチン下流のAMPカインース (AMPK) の発現を検討したところ、非活性化型を含む全体の発現は変化せず、リン酸化の低下がウェスタンブロットにて証明された。炎症を司っているマップカインース (ERK、JNK、p38) の検討を行ったところERK・JNKのリン酸化は過発現マウスにおいてはワイルドタイプマウスと比較して低下しており、低発現マウスにおいては上昇していた。また、臓器障害を示す、肝・肺における炎症性細胞の浸潤の増加、ミエロペルオキシダーゼ活性の上昇も低発現マウスにおいて認められた。この現象は過発現マウスにおいては他の結果と同じく低下していた。

(4) アディポネクチン受容体 (R1、R2) の血中単核球における発現は、R1がR2より多く発現していることが示された。しかし、敗血症マウスから分離された血中単核球にお

いては両者ともに発現が減弱していたが、R1がより優位に低下していた。このため、培養単核球系細胞である、J774とTHP-1にLPSを投与し、その前後で発現を確認したところ、同様の結果が得られた。また、発現量を各群で比較したところ、アディポネクチン過発現群では受容体の低下がワイルドタイプより抑制されていた。アディポネクチンは転写因子Nf-kbと拮抗すると考えられ、アポトーシスの誘導も考えられたが、本実験においてはbcl、Baxなどのアポトーシス関連の遺伝子の発現に有意差は認めなかった。これらから、炎症細胞のアポトーシスを誘導して炎症の沈静化に寄与していることは否定的と考えられた。

(5) アディポネクチンの下流にあると考えられている、AMPKの阻害剤である、compoundCによってInVitroの単核球系細胞のLPS・TNF- $\alpha$ による炎症が抑えられたことから、AMPKを介した系が最も有力であると考えられた。また、過発現マウスの生命予後はcompoundCの腹腔内投与によってワイルドタイプと同等まで悪化したため、敗血症においては、このAMPKの活性化の上昇がアディポネクチンの作用点であると考えられた。

(6) これらからアディポネクチンは恐らくアディポネクチン受容体2を介して抗炎症作用を発揮していること、それはAMPKのリン酸化によっていることが明らかとされた。これらから現在まで報告されていた敗血症の予後と血糖の管理の関係の理論的裏付けが作成できた。また、糖尿病患者が敗血症の予後が不良であることのメカニズムも説明できると考えられる。

今回の研究の限界としては、トランスジェニックマウスを使用したため、敗血症発症前からアディポネクチンの血中濃度が決定しており、糖尿病患者における敗血症重症化のメカニズムは判明したが、治療のターゲットとするには糖尿病の日常管理の重要性を示したものの、直接アディポネクチンを治療目的で投与することの意義は検証できなかったことがあげられる。

しかし、糖尿病患者の重症化のメカニズムが明らかとなり、インスリン抵抗性の解除という、糖尿病患者管理の現在の潮流が正しい方向であることのサポートとなる結果であったと考えられた。

## 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) Ishihara T, Haraguchi G, Konishi M, Ohigashi H, Saito K, Nakano Y, Isobe M. Effect of adiponectin on cardiac allograft vasculopathy. *Circ J*. 2011;75(8):2005-12.

(2) Konishi M, Haraguchi G, Ohigashi H, Ishihara T, Saito K, Nakano Y, Isobe M. Adiponectin protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy by anti-apoptotic effects through AMPK up-regulation. *Cardiovasc Res*. 2011 Feb 1;89(2):309-19.

[学会発表] (計0件)

[図書] (計1件)

原口 剛, 秀潤社, SIRSからMODSへ、2012、p13-29.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

原口 剛 (HARAGUCHI GO)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：40361729

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：