

## 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25年 4月26日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590639

研究課題名（和文） 緊縛性ショックマウスにおける多臓器不全因子の分子生物学的解析

研究課題名（英文） Molecular biological analyses of distant organ failure in tourniquet shock mice.

## 研究代表者

平岩 幸一 (HIRAIWA KOUICHI)

福島県立医科大学・法医学講座・教授

研究者番号：60124616

研究成果の概要（和文）：クラッシュ症候群のモデルである緊縛性ショックマウスを用い、遠隔臓器障害の分子生物学的解析を行った。DNA マイクロアレイ分析により虚血・再還流後のヒラメ筋で Hsp70, c-fos, Cox-2 等の遺伝子発現増加を認めた。腎・肝でも遺伝子発現変化やタンパク局在変化を認め、遠隔臓器への影響が示唆された。アポトーシスは腎で観察されず、遠隔臓器障害にアポトーシスは関与しないと考えられた。血液では再還流後に酸化ストレスが増大し、酸化ストレスが遠隔臓器障害を誘導することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Molecular biological analyses of distant organ failure were performed using tourniquet shock mice for crush syndrome. DNA microarray analysis showed increased expression levels of various genes including Hsp70, c-fos, Cox-2 in soleus muscles after ischemia/reperfusion. Gene expression changes and protein translocation were observed in kidney and liver, suggesting effects on distant organs. Apoptosis was not seen in kidney. It is considered that apoptosis is not related to distant organ failure. Oxidative stress was increased after reperfusion in blood samples. It is considered that oxidative stress induces distant organ failure.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012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：法医学

キーワード：法医病理学

## 1. 研究開始当初の背景

大地震被災者は長時間にわたる四肢の圧迫により、救助後クラッシュ症候群により死亡することが少なくない。クラッシュ症候群は広範な筋肉の挫滅に起因する遷延性ショックと多臓器不全を特徴とする。過去の研究において、犬の大腿殴打による筋肉挫滅実験

で血圧低下、体温低下、呼吸浅速、尿量低下、ミオグロビン尿等が観察されている。また、大腿部の緊縛とその後の再還流による緊縛性ショックモデルは筋肉挫滅よりも致死率や再現性が高いため、クラッシュ症候群のモデルとして動物実験が行われている。

これまでに、血中の酵素活性上昇や電解質

変動、遠隔臓器における炎症性サイトカイン等の遺伝子発現上昇や脂質過酸化物の濃度上昇などの報告がある。しかし、これらで遠隔臓器障害のすべてを説明できるわけではない。また、局所臓器における虚血・再還流後のアポトーシスの報告はあるものの、遠隔臓器障害とアポトーシスとの関連は不明である。

## 2. 研究の目的

クラッシュ症候群における遠隔臓器障害の増悪因子、さらにアポトーシスとの関連について分子生物学的に解析する検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒラメ筋の DNA マイクロアレイ分析

C57BL/6J 雄マウス(以下、マウス)3 匹にペントバルビタール(80 mg/kg)腹腔内麻酔後、両大腿を輪ゴム(No. 8)で7回巻いて緊縛した。3 時間緊縛後、輪ゴムを切断し3 時間再還流し、ヒラメ筋を採取した。対照検体は緊縛なしで6 時間の麻酔をかけたマウス3 匹のヒラメ筋とした。Affimetrix 社 GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array を用い DNA マイクロアレイ分析を行った。

### (2) 諸臓器の遺伝子発現変化の測定

マウス 8 匹(TR3 群)の両大腿を麻酔下に3 時間緊縛、3 時間再還流後に心臓より採血し(ヘパリンナトリウム注射液により凝血を防止)、生理食塩水で全身還流後にヒラメ筋・腎・肝・肺を採取した。対照としてマウス 8 匹(C 群)に6 時間麻酔をかけ同様に採血し、諸臓器を採取した。TRIZOL 法にて諸臓器の total RNA を抽出し、High Capacity RNA-to-cDNA Kit を用いて cDNA に逆転写させた。リアルタイム PCR 法を用い Hsp70, c-Fos, Cox-2, Bcl-2, Caspase-3 遺伝子の発現変化を測定した。

### (3) 免疫組織染色

TR3 群・C 群の諸臓器の一部をパラホルムアルデヒド固定パラフィン包埋切片とし、ヒラメ筋・腎・肝・肺にヘマトキシリン・エオジン(H. E.)染色、免疫染色(抗 HSP70 抗体・抗 c-Fos 抗体・抗 Cox-2 抗体・抗 Bcl-2 抗体染色)を、ヒラメ筋・腎に TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling method (TUNEL 法)を施行した。

### (4) 薬剤投与による生存率への影響

マウス 20 匹を麻酔下に両大腿を3 時間緊縛、その後再還流し、緊縛解除後の生存時間を測定した。緊縛解除10 分前に生理食塩水で溶解させたアニソマイシン(0.15mg/10  $\mu$  l/g)を腹腔内投与した。同様に、生理食塩水

で溶解させた6 $\alpha$ -メチルプレドニゾン(0.02mg/10  $\mu$  l/g)をマウス13 匹に、溶媒で溶解させた SP600125(0.01mg/g)をマウス11 匹に腹腔内投与した。同量の生理食塩水を投与したマウス19 匹(生食群)、あるいは同量の溶媒を投与したマウス11 匹(溶媒群)と生存時間を比較した。

### (5) 酸化ストレスマーカーの測定

TR3 群・C 群の血液を遠心分離し血漿を得た。3 時間緊縛し再還流せずに採血したマウス6 匹(TR0 群)、3 時間緊縛後1 時間再還流させたマウス6 匹(TR1 群)の血漿も検討に加えた。

バック式臨床化学分析装置 FREE (Free Radical Elective Evaluator)を用い、各群の血漿20  $\mu$  l の d-ROM テスト値を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) ヒラメ筋の DNA マイクロアレイ分析

C 群と比較し TR3 群のヒラメ筋では Cox-2 遺伝子のシグナル強度が268.4 倍と最も強く上昇した。Hsp70 は64.8 倍、c-fos は47.6 倍、Caspase-3 は2.3 倍、Bcl-2 は-2.3 倍であった。

### (2) 諸臓器の遺伝子発現変化の測定

C 群と比較し TR3 群の Hsp70 mRNA 発現はヒラメ筋のみで有意に増加し、腎・肝・肺では差を認めなかった。c-fos mRNA 発現はヒラメ筋・腎・肝で有意に増加した。Cox-2 mRNA 発現はヒラメ筋・腎で有意に増加した。Bcl-2 mRNA 発現はいずれの臓器でも差がなかった。Caspase-3 mRNA 発現は腎でわずかに低下した。

### (3) 免疫組織染色

ヒラメ筋の H. E. 染色では虚血・再還流により筋の浮腫・膨化や横紋の変性を認めた。再還流3 時間の時点では腎・肝・肺に明らかな変化を認めなかった。

抗 HSP70 抗体染色では、C 群と比較し TR3 群でいずれの臓器でも核が染色された割合が増加し、細胞保護効果が示唆された。

抗 c-FOS 抗体染色ではヒラメ筋・腎・肝で核移行を認めた。H. E. 染色で明らかな変化がない時点であっても、腎・肝にも再還流の影響が及ぶことが示唆された。

抗 Cox-2 抗体および抗 Bcl-2 抗体染色では、いずれの臓器も核の染色割合に差がなかった。免疫染色ではタンパク発現の定量的差異については言及できない。

TUNEL 染色により、ヒラメ筋では虚血・再還流によりアポトーシス細胞が増加した。しかし、その割合は平均2%程度と少なく、アポトーシスよりネクローシスが重要と考えられた。腎ではC 群・TR3 群ともアポトーシス細胞がほとんど観察されず、前述(2)の結果

も併せると、遠隔臓器障害にアポトーシスは関与していないと考えられた。

#### (4) 薬剤投与による生存率への影響

アニソマイシン投与群は生食群と比較し緊縛解除後の生存率が有意に低下した。タンパク合成阻害剤・JNK アクチベーターであるアニソマイシンはクラッシュ症候群の治療薬として不適切であることが示された。

6 $\alpha$ -メチルプレドニゾン投与群は生食群と比較し生存率に有意差がなかった。SP600125 投与群は溶媒群や生食群と比較し生存率に有意差がなかった。溶媒群と生食群の比較でも差がなかった。従って、糖質コルチコイド系薬剤である 6 $\alpha$ -メチルプレドニゾンや JNK 阻害薬である SP600125 はクラッシュ症候群の治療薬としての効果が認められなかった。

#### (5) 酸化ストレスマーカーの測定

d-ROMテスト値はC群と比較しTR1群とTR3群で有意に上昇した(図1)。再還流による酸化ストレスの上昇が明らかとなった。

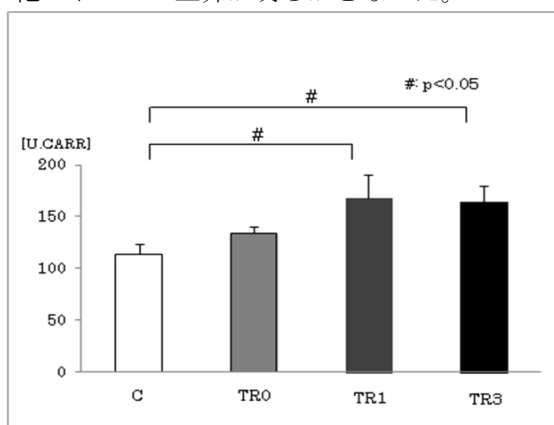


図1. d-ROMテスト値

#### 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5件)

①西形里絵、加藤菜穂、須藤美和子、水澤郁文、栗崎恵美子、平岩幸一、緊縛性ショックモデルマウスに対する種々の薬剤の効果、第96次日本法医学会学術全国集会、2012年6月9日

②西形里絵、加藤菜穂、須藤美和子、水澤郁文、栗崎恵美子、平岩幸一、緊縛性ショックモデルマウスに対する薬剤の効果、第12回日本法医学会学術北日本地方集会、2011年10月21日

③西形里絵、加藤菜穂、須藤美和子、水澤郁文、栗崎恵美子、平岩幸一、緊縛性ショックモデルマウスにおける遺伝子とタンパクの発現変化、第95次日本法医学会学術全国集

会、2011年6月16日

④西形里絵、加藤菜穂、須藤美和子、水澤郁文、栗崎恵美子、平岩幸一、緊縛性ショックモデルマウスの諸臓器の遺伝子発現変化、第11回日本法医学会学術北日本地方集会、2010年10月5日

⑤西形里絵、加藤菜穂、須藤美和子、水澤郁文、栗崎恵美子、平岩幸一、緊縛性ショックモデルマウスの後肢筋組織の遺伝子発現変化、第10回日本法医学会学術北日本地方集会、2009年9月26日

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

平岩 幸一 (HIRAIWA KOUICHI)

福島県立医科大学・法医学講座・教授

研究者番号：60124616

##### (2) 研究分担者

加藤 菜穂 (KATO NAHO)

福島県立医科大学・法医学講座・助教

研究者番号：20457766