

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591880

研究課題名(和文) 外科的侵襲時の脂肪細胞の役割と塩酸ピオグリタゾン投与の有効性

研究課題名(英文) The role of the adipocyte function after the surgical stress: the effectiveness of the pioglitazone administration

研究代表者

松谷 毅 (Matsutani, Takeshi)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：50366712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：マウス盲腸穿孔結紮術(CLP)による脂肪および肺組織の炎症に対するPPAR $\gamma$  リガンドの作用機序について検討した。マウスCLPを作製し、PPAR $\gamma$  リガンド前投与CLP群(P群)、CLP単独群(C群)とsham群で検討した。C群の腹腔液および血中TNF- $\alpha$ 値は、P群に比して有意に高値だった。脂肪組織TNF- $\alpha$  mRNA発現は、C群に比してP群で有意に抑制された。C群では肺胞上皮傷害や間質への細胞浸潤、アポトーシスおよびJNK kinase活性化が著しかったが、P群は軽度であった。CLPに対するPPAR $\gamma$  リガンド投与は、脂肪細胞からTNF- $\alpha$ 産生を減弱させ、肺組織の炎症を軽減することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the effect of PPAR-gamma (PPAR $\gamma$ ) agonist on cecal ligation and puncture (CLP)-induced adipose-tissue inflammation and lung injury in mice. Mice were assigned to 3 groups: 1) CLP group, 2) PPAR $\gamma$  agonist-treated CLP group, or 3) sham group. PPAR $\gamma$  agonist was injected intraperitoneally for 7 days. TNF-alpha (TNF) levels in serum and peritoneal lavage fluid were significantly higher in the CLP group than in the PPAR $\gamma$  agonist-treated CLP group. PPAR $\gamma$  agonist treatment decreased the TNF mRNA expression levels as compared with the CLP group. Histopathological analysis of lung tissue revealed significantly increased numbers of TUNEL-positive cells in the CLP group as compared with the sham-operated control group. PPAR $\gamma$  agonist treatment reduced the CLP-induced cell and tissue injury as compared with the CLP group. PPAR $\gamma$  agonist effectively suggested to prevent lung injury caused by CLP-induced sepsis by maintaining the anti-inflammatory status of adipose tissue.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

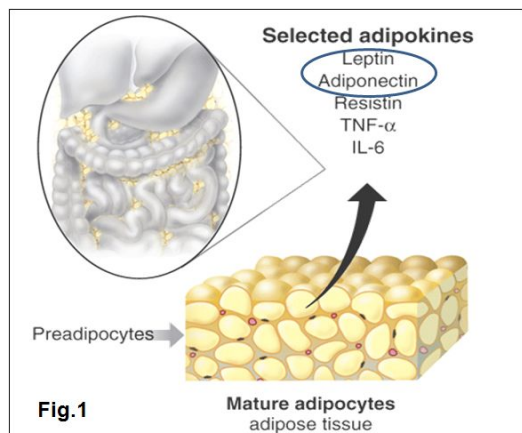
キーワード：脂肪細胞 手術侵襲 アディポサイトカイン ピオグリタゾン

## 1. 研究開始当初の背景

外科的侵襲は、生体の呼吸・循環状態、栄養・代謝そして免疫能などを変化させ、恒常性を維持するための合目的な生体防御反応を起こす。外科手術後、各臓器や免疫細胞から産生されるサイトカインがネットワークを形成し、過剰な生体防御反応は SIRS (systemic inflammatory response syndrome) あるいは CARS (compensatory inflammatory response syndrome) と呼ばれる免疫抑制状態をも惹起する。

われわれは性差/年齢差と免疫能の観点から侵襲後の生体防御反応の解明および術後合併症・臓器障害の病態解明に関する研究を行ってきた。さらに栄養代謝と免疫との相互作用が侵襲後の生体防御反応に重要な役割を担っていると考えている。

最近では「metabolic syndrome」の流れから、内蔵脂肪細胞の意義と重要性がわが国にも広く認識され研究が進められている。脂肪細胞が単なるエネルギー貯蔵庫ではなくアディポサイトカインと呼ばれる生理活性物質を分泌する機能が明らかにされた (Fig.1)。



代表的なアディポサイトカインであるレプチンやアディポネクチンは脂肪組織特異的に分泌されるペプチドホルモンが免疫能に関与していることが報告されている。さらにチアゾリジン誘導体のインスリン抵抗性改善薬(塩酸ピオグリタゾン)は核内受容体である peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) を活性化し、転写促進を介してアディポネクチン産生を増加させることが知られている。侵襲後の生体防御反応として脂肪細胞が重要な役割を担っていると推測される。

以上から脂肪細胞機能を考慮した手術侵襲後の合併症・臓器障害の病態解明は、外科学にとって極めて重要であると考えられた。

## 2. 研究の目的

外科的侵襲後のアディポネクチン産生を中心とした脂肪細胞機能を分子生物学的手法で明らかにし、さらに侵襲前に脂肪細胞機

能を活性化(抗炎症作用を有する血中アディポネクチンを増加)することによって侵襲後の生体防御・炎症反応の適正化が可能かどうかを解明する。

具体的には、Cecum ligation and puncture (CLP) によるマウス腹膜炎モデルを作成し、脂肪細胞のアディポサイトカイン、アディポネクチン産生関連・調節因子等の発現を検討する。CLP 腹膜炎前にアディポネクチン産生調節物質 (PPAR- $\gamma$  アゴニスト) を投与し生存率の改善が得られるか、およびその機序を肺障害の現象から解明する。PPAR- $\gamma$  アゴニストの抗炎症作用の機序を、ヒト培養脂肪細胞を用いて in vitro で検討する。

## 3. 研究の方法

雄性 C57BL/6 マウス(8-10 週令)に、吸入麻酔後、コントロールの CLP 群(盲腸結紮後、21G 針にて2回穿刺し糞便を排出させる)を作成し、24 時間後に全身麻酔下で犠死させる。PPAR- $\gamma$  アゴニスト (10mg/kg, i.p.) を CLP 施行前に7日間投与した CLP 群を作成し、同様に行う。両群のコントロールとして Sham (開腹のみ) を作成する。PPAR- $\gamma$  アゴニスト前投与 CLP 群 (P 群)、CLP 単独群 (C 群) と単開腹のみの Sham 群 (S 群) の3群で検討した。生存率を観察後に以下の解析を行う。

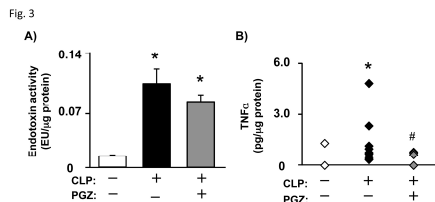
- (1) CLP 後 24 時間の時点で心臓穿刺にて採取した全血を遠心分離し、血漿中のアディポネクチン、TNF- $\alpha$  濃度を ELISA 法にて測定する。腹腔内へ DMEM/F-12 を 1ml 投与し腔洗浄液を回収し、腹腔液中のエンドトキシン、TNF- $\alpha$  値、を ELISA 法で測定する。
- (2) CLP あるいは Sham 手術後に腸間膜脂肪組織を摘出し PBS にて洗浄後、フェノール・チオシアン酸グアニジン法にて Total RNA を抽出する。cDNA に逆転写後、アディポネクチン、TNF- $\alpha$ 、IL-6、MCP-1 mRNA 発現を real-time PCR にて定量化する。
- (3) 肺組織の炎症を、HE 染色法、TURNEL 法およびリン酸化 JNK kinase を免疫蛍光法で評価する。
- (4) Omental Differentiation Medium (insulin, PPAR agonist, IBMX, Dexamethasone) でヒト大網前駆脂肪細胞を3週間培養し成熟脂肪細胞へと分化させ、培地を 2%FBS 含有 DMEM/F-12 に交換 (PPAR- $\gamma$  アゴニスト 1mM 処置)する。腹腔内洗浄液の上清と前駆脂肪細胞を分化させた成熟脂肪細胞を培養する。それぞれの群で、TNF- $\alpha$ 、IL-6 の mRNA の発現、細胞内蛋白質の量を PPAR- $\gamma$  アゴニストであるピオグリタゾン処理の有無で検討する。

#### 4. 研究成果

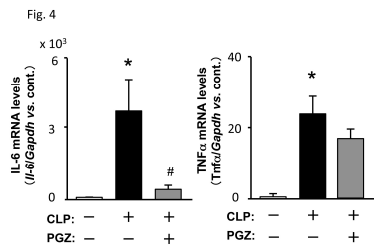
C 群の生存率に対し、P 群では有意に生存率が高値であった。

(1) 末梢血 TNF- $\alpha$  濃度は、C 群は S 群に比して有意に高値だったが、P 群と S 群には差がなかった (Fig 2)。

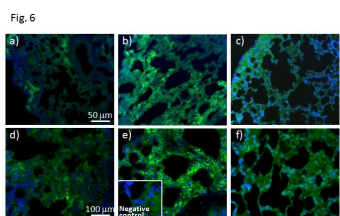
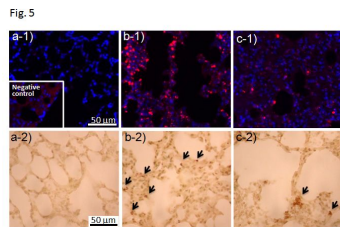
C 群の腹腔液中エンドトキシン、TNF- $\alpha$  濃度は、S 群に比して有意に高値だった。P 群の腹腔液 TNF- $\alpha$  濃度は、C 群に比して有意に低値であったが、エンドトキシン値は C 群と P 群では差がなかった (Fig 3)。



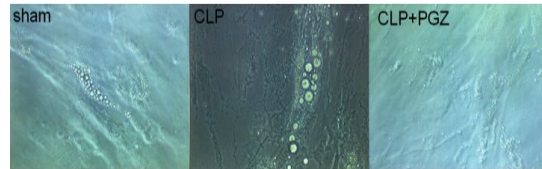
(2) 脂肪組織 IL-6, TNF- $\alpha$  濃度の mRNA 発現は、C 群に比して P 群で有意に抑制された (Fig 4)。



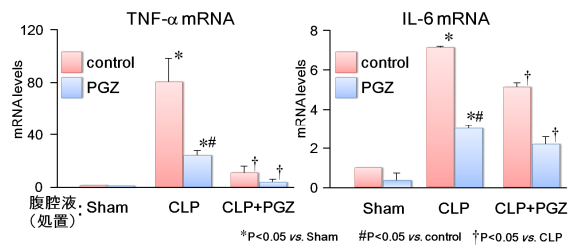
(3) C 群の肺組織は、肺胞上皮傷害や間質への細胞浸潤が著しかったが、P 群では軽度であった。組織構成細胞のアポトーシス (Fig 5) およびリン酸化 JNK kinase の活性化 (Fig 6) が認められたが、PGZ 前投与によりこれらは軽減した。



(4) S 群、C 群、P 群でヒト大網前駆脂肪細胞形態を比較した。C 群の腹腔洗浄液で処置をした細胞は、正常な形状を保っておらず、細胞死を起こしているような印象であった。P 群の細胞は、このような変化は見られず、両群間で大きな違いが見られた。また、この違いは培養時の PPAR- $\gamma$  アゴニスト処置の有無によるものでないことを確認した。



C 群の腹腔洗浄液の上清で前駆脂肪細胞を培養すると、S 群に比して有意に TNF- $\alpha$ , IL-6 の mRNA の発現は高値をしめしたが、P 群では有意にこれらの発現は低値を示した。さらに、PPAR- $\gamma$  アゴニストで前処置を前駆脂肪細胞では、非処置の脂肪細胞に比して TNF- $\alpha$ , IL-6 の mRNA の発現は有意に低値を示した。



結論：マウス CLP に対する PPAR- $\gamma$  アゴニスト前投与は、腹腔内炎症性サイトカイン値の上昇ならびに脂肪組織の炎症を軽減し、生存率を改善した。PPAR- $\gamma$  アゴニストの抗炎症作用は、脂肪細胞からアディポネクチン産生を亢進させることによると考えている。PPAR- $\gamma$  アゴニストによって CLP 後の脂肪組織の炎症を制御することによって、肺組織の炎症反応が軽減する可能性が示唆された。

アディポネクチン産生を中心とした脂肪細胞機能の制御は、外科的敗血症治療において有望な治療法となると考えられた。

今後の展望および課題：外科的侵襲時の脂肪組織機能において、マクロファージの脂肪組織への浸潤が重要な役割を担っているかを明らかにし、さらに PPAR- $\gamma$  アゴニストを用いて脂肪組織機能を活性化して脂肪組織における M1/M2 マクロファージとのクロストーク機構を解明する。さらに臨床応用として、消化器癌手術症例 (食道癌、胃癌、大腸癌など) で待期的手術が予定されている症例を対象に、術前から血中アディポネクチン値を上昇させ、術後合併症の頻度を減少させるか、否かを検討する。

## 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 7 件)

松谷 毅, 宮下正夫, 内田英二. 性差によって外傷の治療成績は変わるか? 侵襲と免疫 査読無 20: 36-38, 2011.

松田明久, 宮下正夫, 松谷 毅, ほか. ショック領域のトランスレーション・リサーチ MFG-E8 に着目したショックにおける過剰な炎症反応制御の可能性. 日本 Shock 学会雑誌 査読無 28: 63-68, 2014.

Tsujimura Y, Matsutani T, Matsuda A, et al. Effects of pioglitazone on survival and omental adipocyte function in mice with sepsis induced by cecal ligation and puncture. 査読有 J Surg Res 171: e215-e221, 2011. doi: 10.1016/j.jss.2011.08.012. Epub 2011 Sep 9.

Matsuda A, Jacob A, Matsutani T, et al. Novel therapeutic targets for sepsis: regulation of exaggerated inflammatory responses. 査読有 J Nippon Med Sch 79:4-18, 2012. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jnms/79/1/79\\_1\\_4/article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jnms/79/1/79_1_4/article)

Akagi I, Miyashita M, Matsutani T, et al. Determination of urinary trypsin inhibitor provides insight into postoperative complications in patients following esophagectomy. 査読有 Experimental and Therapeutic Medicine 4: 84-88, 2012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3460310/>

Matsuda A, Yang WL, Matsutani T, et al. FK866, a visfatin inhibitor, protects against acute lung injury after intestinal ischemia-reperfusion in mice via NF- $\kappa$ B pathway. 査読有 Ann Surg 259: 1007-1017, 2014. doi: 10.1097/SLA.0000000000000329.

Kutsukake M, Matsutani T, Tamura K, et al. Pioglitazone attenuates lung injury by modulating adipose inflammation. 査読有 J Surg Res 189: 295-303, 2014. doi: 10.1016/j.jss.2014.03.007. Epub 2014 Mar 12.

〔学会発表〕(計 11 件)

松谷 毅, 宮下正夫, 丸山 弘, ほか. マウス敗血症モデルにおける脂肪細胞の炎症性サイトカイン産生とピオグリタゾンの効果. 第 26 回日本 Shock 学会総会, 浜松, 2011, 5 月.

松谷 毅, 松田明久, 野村 務, ほか. 消化器癌手術侵襲における内臓脂肪細胞機能と術前 PPAR $\gamma$  リガンド投与による抗炎症作用. 第 112 回日本外科学会定

期学術集会, パネルディスカッション, 千葉, 2012, 4 月.

松谷 毅, 松田明久, 野村 務, ほか. マウス盲腸穿刺結紮術における脂肪細胞機能と PPAR $\gamma$  リガンド投与による抗炎症作用. 第 27 回日本 Shock 学会総会, 東京, 2012, 5 月.

松田明久, 宮下正夫, 松谷 毅, ほか. アポトーシス細胞の食食増強を軸とした MFG-E8 による腎虚血再灌流障害抑制効果. 第 27 回日本 Shock 学会総会, 東京, 2012, 5 月.

松谷 毅, 松田明久, 野村 務, ほか. 消化器癌手術による生体反応と性差-脂肪細胞機能としてのアディポサイトカインを中心に-. 第 54 回日本消化器病学会大会, 神戸, 2012, 10 月.

松田明久, 松谷 毅, 丸山 弘, ほか. 上部消化管癌手術における脂肪細胞機能低下の術後合併症発生への関与. 第 10 回日本消化器外科学会大会, 神戸, 2012, 10 月.

松田明久, 宮下正夫, 松谷 毅, ほか. Adiponectin 産生低下は, 術後合併症の予測因子となりうるか? - 上部消化管癌手術における検討 -. 第 19 回外科侵襲とサイトカイン研究会, 神戸, 2012, 12 月.

松田 明久, 松谷 毅, 横井公良, ほか. アポトーシス細胞に着目した肝虚血再灌流障害治療における新たな可能性. 第 113 回日本外科学会総会, 福岡, 2013, 4 月.

松田明久, 宮下正夫, 松谷 毅, ほか. MFG-E8 に着目したショックにおける過剰な炎症反応の制御の可能性. 第 28 回日本 Shock 学会総会, シンポジウム, 東京, 2013, 5 月.

若林秀幸, 松谷 毅, 松田明久, ほか. マウス盲腸穿刺結紮術により誘導される脂肪及び肺組織炎症に対するピオグリタゾン前投与の効果. 第 68 回日本消化器外科学会総会, 宮崎, 2013, 7 月.

松田明久, 宮下正夫, 松谷 毅, ほか. 肝虚血再灌流における MFG-E8 の臓器障害抑制効果. 第 68 回日本消化器外科学会総会, 宮崎, 2013, 7 月.

〔図書〕(計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松谷 毅 (MAYSUTANI TAKESHI)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号: 5 0 3 6 6 7 1 2