

科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号 : 12501

研究種目 : 挑戦的萌芽研究

研究期間 : 2011~2012

課題番号 : 23659280

研究課題名(和文)

多臓器不全に至る全身性炎症反応症候群モデルマウスの樹立と治療法の探索

研究課題名(英文)

Establishment of model mice of systemic inflammatory response syndrome associated with multiple organ dysfunction syndrome, and investigation of the effective therapy.

研究代表者

粕谷 善俊 (KASUYA YOSHITOSHI)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号 : 70221877

研究成果の概要(和文): 全身性炎症反応症候群(SIRS)の分子発症メカニズムを明らかにし、新たな治療法に生かすべく、以下の研究を遂行した。(1) mitogen-activated protein kinase (MAPK)の1つであり、炎症反応の中心的役割を演じているp38に着目し、テトラサイクリン依存的に全身でp38を活性化する遺伝子改変マウスの作出を試みた。(2) SIRSモデルの1つである盲腸結紮穿孔モデルに代わる、新たな敗血症モデルの作出を試み、その信頼性を検討した。

研究成果の概要(英文): To put the molecular mechanism for pathogenesis of systemic inflammatory response syndrome (SIRS) to practical use, the following studies were performed. (1) Focusing on p38 which plays a central role in various inflammatory responses, one of mitogen-activated protein kinase (MAPK), we tried to produce transgenic mice exhibiting systemic p38 activation in a tetracycline-dependent manner. (2) We produced a new model mouse of sepsis in place of the cecal ligation and puncture, one of SIRS models. Then, we investigated its reliability.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 境界医学・応用薬理学

キーワード: ファーマコゲノミクス

1. 研究開始当初の背景

申請者等は、これまでのp38ノックアウトマウスおよびp38トランスジェニック(TG)マウスを用いた解析から、p38が、少なくとも、皮膚、肺、リンパ節、中枢神経系などの組織で、SIRSの病態と深く関わるサイトカイン: TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 等の発現を促進的に制御することを見出している。また、SIRSから多臓器不全に至る過程においては、微小血栓形成による循環障害(播種性血

管内凝固症候群)が密接に関係するが、p38が血栓形成に積極的に関与することも、すでに確認し報告している。これらの事実から、単一の分子活性をコントロールすることで、SIRS発症の中心的位置付けとなるサイトカインストームおよびそれに続く多臓器不全を演出できる有力な候補因子としてp38を選択した。

p38は、グラム陰性桿菌外膜の構成成分であるlipopolysaccharide(LPS)の負荷に応

答する MAPKs の 1 つとして、また、TNF- α および IL-1 β の mRNA を不安定化する非ステロイド性抗炎症薬のターゲット分子として、ほぼ同時期に発見された。さらに、感染性 SIRS として位置づけられる Sepsis の主因子の 1 つとして、LPS は最もポピュラーな研究対象として認識されている。このような背景からも、p38 に着目し、p38 関連遺伝子改変モデルマウスをツールとして SIRS に切り込む strategy は、信頼性の高いアプローチと考えられた。

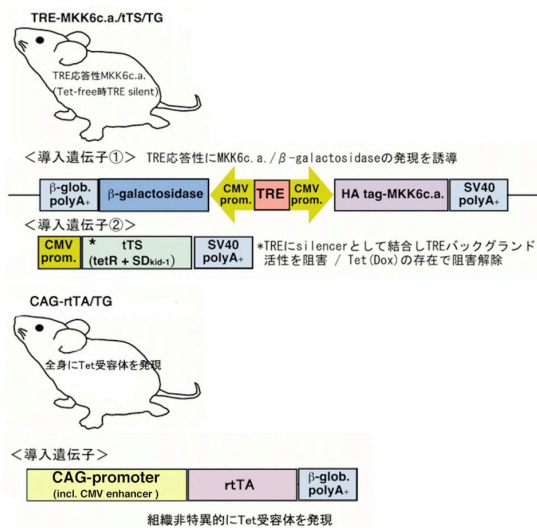
2. 研究の目的

多臓器不全に至る全身性炎症性反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome: SIRS) の有効な治療法の探索を目的とし、誘導性 SIRS モデルマウスの作出を目指す。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変 SIRS モデルマウスの作出

以下の 2 種の TG マウスを作出・掛け合せ、triple TG マウスを作出し、ドキシサイクリン:Dox の飲水により、全身性に p38 の活性化を促し、個体反応を検討する。



(2) 新たな敗血症モデルマウスの提案

SIRS モデルマウスの 1 つとして、腹膜炎の誘発をトリガーとした敗血症モデル/盲腸結紮穿孔法 (cecal ligation and puncture: CLP) が汎用されている。しかしながら、侵襲性の高さや手技上のバラツキも指摘されている。そこで、これに代わる簡便な敗血症モデルを作出すべく、盲腸内生糞便液を腹腔内に注入する方法でどのような個体反応を示すかを詳細に検討した。

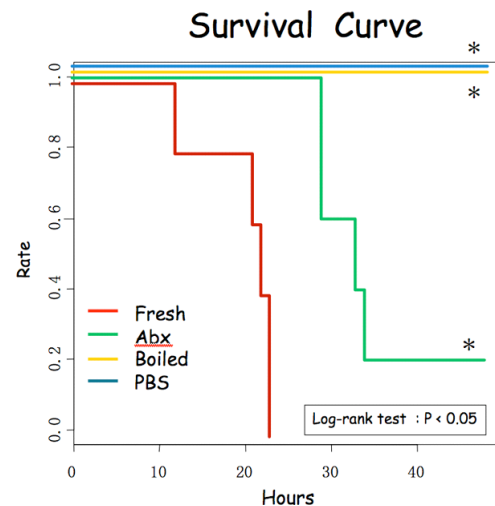
4. 研究成果

(1) すでに作出を終えている TRE-MKK6c. a. / tTS/TG [Dox-rtTA (ドキシサイクリン-Tet 受容体) 複合体に応答して、p38 を特異的に活性

化させる MKK6c. a. を産生させる TG マウス] のうち、高い transgene コピー数を有する個体と、CAG-rtTA/TG [全身性に Tet 受容体を発現し、Dox の飲水により、転写因子として機能し得る Dox-Tet 受容体複合体を形成する TG マウス: 現在 1 ラインのみ保有] を交配し、両 transgene を有する個体を作成した。そのマウスに Dox を飲水させ、SIRS 症状を呈するかを検討したが、残念ながら期待した成体反応を得るまでには至っていない。理由として、CAG-rtTA/TG のコピー数の少なさ、rtTA 発現臓器の限局などが考えられた。今後、高コピー数を有する CAG-rtTA/TG の作出、もしくは、用いるプロモーターの変更等して、検討を加えていきたい。

(2) 生糞便液 (Fresh) もしくは煮沸処理糞便液注入 (Boiled) 群、抗生物質処理個体への生糞便液注入群 (Abx)、sham 群 (PBS) の 4 群について、生存率、自発運動活性、末梢血内のサイトカイン/ケモカイン/アディポカインの網羅的検出、脳内神経発火、血液培養、臓器内血管透過性の変化および血栓形成、臓器構成細胞の細胞死等を比較検討した。

① 生存曲線



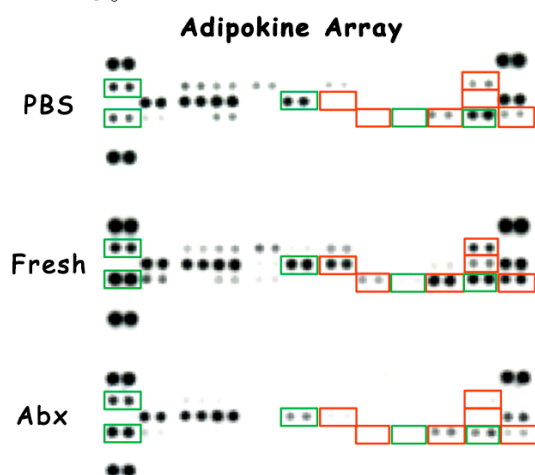
生糞便液注入群では、著しい自発運動活性の低下に準じた 20 時間強で、全例が死亡した。しかし、抗生物質処理により、有意に生存率が改善されるとともに、煮沸処理群では sham 群と変わらず、全例が生存した。

② 末梢血内アディポカイン

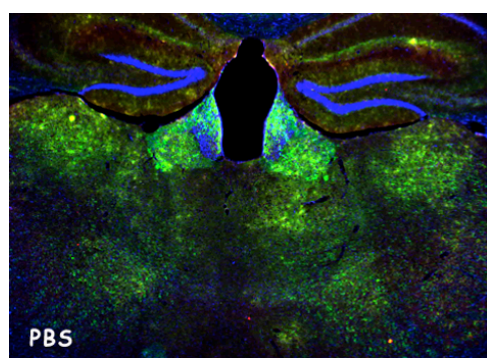
生糞便液注入群で強く誘導され抗生物質処理で抑制される分子 (赤枠: IL-6, RANTES, TIMP-1, LIF, ICAM-1, Resistin)、また、有意に誘導され抗生物質処理で抑制される分子 (緑枠: adiponectin, MCP-1, Serpin E1, RBP4, IGFBP-6) を 1 例として示した。

これらの分子以外にも、サイトカインアレイ (150 分子強を対象として解析) の結果から、IL-5, IL-1ra, IL-17F, RAGE, prolactin, osteopontin 等の生糞便液注入群での発現誘

導と、抗生物質処理、熱処理での抑制を確認している。



③脳内反応



生糞便液注入により、2時間以内で c-fos 陽性を指標とする神経発火が、手綱核、視床下部室傍核（図内赤丸）およびその投射領域に局限して認められた。この現象は、ハンス・セリエによって提唱された適応症候群理論をトレースするものであり、大変興味深い。

④臓器内血管反応

脳、腎臓をはじめとするいくつかの臓器で、エバンスブルーの漏出を指標とした、血管透過性の亢進を認めた。また、肺の微小血管に

おける CD41 抗体陽性の血小板凝集-血栓形成を認めた。

現在、血液培養による作用の主体を成す菌の同定、心電図をはじめとした個体のバイタル測定、臓器機能検査を行っており、本法が新たな敗血症の gold standard モデルに成り得るか否か、その信憑性を探っている。

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 5 件）

- ① Namiki K, Matsunaga H, Yoshioka K, Tanaka K, Murata K, Ishida J, Sakairi A, Kim J, Tokuhara N, Shibakawa N, Shimizu M, Wada Y, Tokunaga Y, Shigetomi M, Hagihara M, Kimura S, Sudo T, Fukamizu A and Kasuya Y: Mechanism for p38 α -mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Biol. Chem.* 査読有、vol.287、2012、24228-24238 DOI: 10.1074/jbc.M111.338541
- ② Ishizaki S, Kasuya Y, Kuroda F, Tanaka K, Tsuyusaki J, Yamauchi K, Matsunaga F, Iwamura C, Nakayama T and Tatsumi K: Role of CD69 in acute lung injury. *Life Sci.* 査読有、Vol. 90、2012、657-665、DOI: 10.1016/j.lfs.2012.03.018
- ③ Tsuyusaki J, Kuroda F, Kasuya Y, Ishizaki S, Yamauchi K, Sugimoto H, Kono T, Iwamura C, Nakayama T and Tatsumi K: Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation is attenuated in CD69-deficient mice. *J. Recept. Signal Transduct.* 査読有、vol. 31、2011、434-439、DOI: 10.3109/10799893.2011.631929
- ④ Yamauchi K, Kasuya Y, Kuroda F, Tanaka K, Tsuyusaki J, Ishizaki S, Matsunaga H, Iwamura C, Nakayama T and Tatsumi K: Attenuation of lung inflammation and fibrosis in CD69-deficient mice after intratracheal bleomycin. *Respir. Res.* 査読有、vol. 12、2011、131-140、DOI: 10.1186/1465-9921-12-131
- ⑤ Tanaka Y, Takahashi H, Shibata S, Namiki K, Kimura S, Koike K and Kasuya Y: Functional analysis of guinea pig β 1-adrenoceptor. *J. Recept. Signal Transduct.* 査読有、vol. 31、2011、395-401、DOI: 10.3109/10799893.2011.610109

〔学会発表〕（計 16 件）

- ① 内藤雄介、吉岡健人、田中健介、松永博文、永野克将、石田純治、深水昭吉、木村定雄、巽浩一郎、粕谷善俊：新たな敗血症モデルマウスについての検討、第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 23 日、福岡

- ② 小林健、天野寛之、田中健介、吉岡健人、木村定雄、巽浩一郎、粕谷善俊：肺線維症の病態進展と蛋白質リン酸化シグナル、第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 23 日、福岡
- ③ 田中健介、藤田哲雄、吉岡健人、萩原昌彦、木村定雄、巽浩一郎、粕谷善俊：肺由来幹/前駆細胞 (PSPC) の簡便な採取方法の検討、第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 21 日、福岡
- ④ 田中健介、天野寛之、小林健、吉岡健人、萩原昌彦、木村定雄、巽浩一郎、粕谷善俊：細胞治療に向けた、肺胞 II 型上皮細胞の簡便な in vitro expansion 法の検討、第 126 回薬理学会関東部会、2012 年 7 月 14 日、白金
- ⑤ 吉岡健人、並木香奈、田中健介、木村定雄、粕谷善俊：p38 による IL-17 遺伝子の転写制御様式、第 126 回薬理学会関東部会、2012 年 7 月 14 日、白金
- ⑥ 山内圭太、粕谷善俊、黒田文伸、田中健介、露崎淳一、石崎俊介、松永博文、巽浩一郎：ブレオマイシン肺線維症モデルマウスにおける CD69 の役割、第 52 回日本呼吸器学会学術講演会、2012 年 4 月 21 日、神戸
- ⑦ 小林健、田中健介、天野寛之、木村定雄、巽浩一郎、粕谷善俊：肺線維症の病態進展と蛋白質リン酸化シグナル、第 52 回日本呼吸器学会学術講演会、2012 年 4 月 21 日、神戸
- ⑧ 田中健介、天野寛之、小林健、萩原昌彦、木村定雄、巽浩一郎、粕谷善俊：肺胞 II 型上皮細胞の簡便な in vitro expansion 法の検討、第 52 回日本呼吸器学会学術講演会、2012 年 4 月 21 日、神戸
- ⑨ 露崎淳一、黒田文伸、粕谷善俊、石崎俊介、山内圭太、杉本洋美、河野剛志、巽浩一郎：マウス急性喫煙暴露モデルにおける CD69 の役割、第 52 回日本呼吸器学会学術講演会、2012 年 4 月 20 日、神戸
- ⑩ 石崎俊介、粕谷善俊、黒田文伸、田中健介、露崎淳一、山内圭太、松永博文、巽浩一郎：マウス急性肺障害における CD69 の役割、第 52 回日本呼吸器学会学術講演会、2012 年 4 月 20 日、神戸
- ⑪ 天野寛之、田中健介、小林健、松永博文、大沼和弘、西川顕治、萩原昌彦、木村定雄、巽浩一郎、粕谷善俊：タバコ煙溶液およびリポポリサッカライドによるマウス肺気腫モデル、第 52 回日本呼吸器学会学術講演会、2012 年 4 月 20 日、神戸
- ⑫ 田中健介、天野寛之、小林健、萩原昌彦、木村定雄、巽浩一郎、粕谷善俊：肺由来幹/前駆細胞 (PSPC) の簡便な採取方法の検討、第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 16 日、京都
- ⑬ 小林健、田中健介、天野寛之、木村定雄、

- 巽浩一郎、粕谷善俊：肺線維症の病態進展における肺胞 II 型上皮細胞における蛋白質リン酸化シグナルとサイトカイン産生、第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 16 日、京都
- ⑭ 並木香奈、松永博文、吉岡健人、田中健介、石田純治、須藤龍彦、深水昭吉、木村定雄、粕谷善俊：EAE 発症における p38 による IL-17 発現の調節、第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 16 日、京都
- ⑮ 吉岡健人、田中健介、須藤龍彦、小林健、天野寛之、木村定雄、粕谷善俊：第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 16 日、京都
- ⑯ 粕谷善俊（招待講演）：p38 阻害薬-p38 遺伝子改変マウス解析のフィードバック、第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会/第 20 回国際リウマチシンポジウム:Next Decade Symposium『新しい病因・病態・治療法を探る-あらたな関節リウマチ治療標的分子』、2011 年 7 月 19 日、神戸

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：増大された継代能を有する神経幹細胞、前記増大された継代能を有する神経幹細胞の製造方法、神経幹細胞の継代能を増大させるための神経幹細胞の培養方法

発明者：粕谷善俊、宮本憲優、尾野雄一、並木香奈

権利者：エーザイ・アール・アンド・ディー・マネジメント株式会社

種類：特許

番号：特願 2012-241366 号

出願年月日：2012 年 10 月 31 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/bunsis eitai/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

粕谷 善俊 (KASUYA YOSHITOSHI)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：70221877