

## 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 6 月 20 日現在

機関番号：34519

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～2012

課題番号：23659852

研究課題名（和文）高度侵襲下のインスリン抵抗性に関する IL-18 の影響と雌雄差の検討

研究課題名（英文）The effect of IL-18 and gender difference on inflammation-related insulin resistance.

研究代表者

小谷 穰治 (KOTANI JOJI)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：80360270

研究成果の概要（和文）：侵襲後のサイトカイン増加はインスリン抵抗性を引き起こし、血糖コントロールを困難にすることで予後悪化に関連している。本研究では、急性炎症下の血糖変動への性差と IL-18 の関与についてマウス急性炎症モデルで検討した。ノックアウトマウスを用いた検討により、内因性の IL-18 は侵襲時の血糖値、インスリン値を肝臓のインスリンシグナルを介して抑制している可能性が示唆された。また、性別によって低血糖となる機序に差がある可能性が示唆されたが、IL-18 と性差との関連についてはさらなる検証が必要である。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to evaluate the effects of endogenous IL-18 and its gender difference on inflammation-related insulin resistance. The endogenous IL-18 might inhibit hyperglycemia and hyperinsulinemia during acute inflammation. The plasma insulin concentration was higher in male than in female mice, however, the relation of IL-18 to this gender difference has not been elucidated clearly yet. Further studies are needed to investigate the role of endogenous IL-18 on the gender difference in inflammation-related insulin resistance.

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	2,800,000	840,000	3,640,000

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：集中治療医学

## 1. 研究開始当初の背景

集中治療領域では、高血糖状態が敗血症などの病態に関与することが明らかとなり、現在では血糖値を 150 mg/dl 以下に維持するように推奨されている。我々は、マウスの重症急性エンドトキシン血症モデルにおいて、IL-18 の産生量には性差があり、IL-18 が雄において骨髄細胞からの好中球の放出を促進し、雌においては好中球のアポトーシスを促進する可能性があることを報告している。2009 年に TrOseid らは、IL-18 がメタボリックシンドロームの壮年男性における循環

器系疾患の発症率に強く関与していると報告しており、2010 年にはメタボリックシンドロームと IL-18 についてのレビューが報告されたが、糖尿病、循環器疾患などにおける関連を研究する論文のみであり、高度侵襲下のインスリン抵抗性における IL-18 との関連を検討する報告はまだ成されていない。また、救急領域での敗血症発症率や、生存率に性差があり、男性よりも女性のほうが予後良好であるとされているが、我々はこれらにも IL-18 が関与すると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、高度侵襲下におけるインスリン抵抗性と IL-18 の関連を、野生型と IL-18 ノックアウトマウスを用いた敗血症モデルにより解明し、侵襲後の血糖管理に IL-18 濃度調整という新しい方法を提案することを目的とした。

## 3. 研究の方法

野生型マウス (wild type; WT) と IL-18 knock out (KO) マウス、正常型マウス (normal) と TLR4 ミュータントマウス (mutant) の雌雄を用いた。腹腔内にエンドトキシンを注射し、急性重症エンドトキシン血症を作成した。エンドトキシン投与後 0-24 時間まで尾静脈より採血し、血糖値を測定する。任意の時間で犠牲せしめ、各種臓器を採取する。骨髄細胞、末梢血、腹腔内細胞はフローサイトメーターにてアポトーシス、表面マーカーを検出し、肺、肝、腎、腸管、筋肉については mRNA や蛋白を抽出し、リアルタイム PCR, western blot などで検出した。パラフィン切片を作成し、免疫染色を行った。血漿より、IL-18 をはじめとする各種サイトカイン、およびインスリンを測定した。

## 4. 研究成果

(1) IL-18KO マウスを用いた内因性 IL-18 が高血糖に与える影響の検討

C57BL6/J マウスを用いて LPS 40 mg/kg を腹腔内に投与し、経時的に血糖値を測定した。LPS によって低血糖となるが、投与後 1 時間までは高血糖を示し、KO マウスで有意に血糖値が高いことが明らかとなった (図 1)。

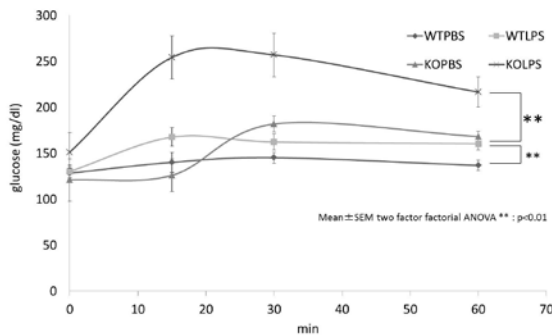


図 1. 血糖値の経時変化 (C57BL6/J)

投与後 1 時間における血漿インスリン濃度は KOLPS 群で有意に高く、血漿コルチコステロン濃度には変化は見られなかった (図 2)。

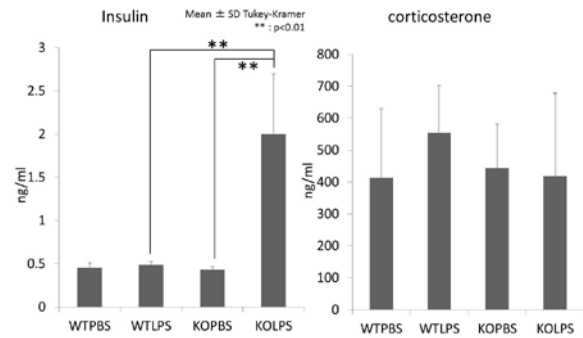


図 2. LPS 投与後 1 時間での血漿インスリン濃度と血漿コルチコステロン濃度

各種インスリン関連シグナルは、筋肉や脂肪では有意な差は見られなかったが、肝臓においては IRS-1 の発現が KO で有意に低値であった (図 3)。

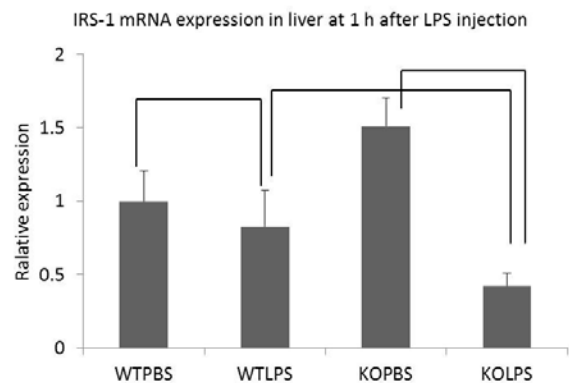


図 3. LPS 投与後 1 時間での肝臓 IRS-1 mRNA 発現

これらの結果より、LPS によりもたらされる高血糖状態では内因性の IL-18 は血糖値を抑制する働きをする可能性が示唆された。また、その機序として肝臓のインスリンシグナルの促進が考えられた。

この時の血漿サイトカイン濃度は IL-6, TNF-alpha とも PBS 群にくらべ、LPS 群で有意に増加した。また、IL-18KO マウスでは、WT マウスに比べて血漿 IL-6 濃度が高いことが明らかとなったが、IL-18 がインスリンシグナルに与える影響との関連はさらに詳細な検討が必要であると考えている。

(2) IL-18KO マウスを用いた内因性 IL-18 が低血糖に与える影響の検討

LPS 投与後 12 時間では WT, KO とも低血糖を示し、血糖値に有意な差は見られなかった。また、この低血糖には性差は無く、血中イン

スリン濃度も WT、KO、雌雄とも差は見られなかった。

しかし、肝臓の IRS-1 mRNA 発現は雄の WT LPS 群で有意に増加し、雄でのみ KO マウスよりも有意に高値であった。また、肝臓の IRS-2 mRNA 発現は WT LPS 群で雄よりも雌で高値であり、雌でのみ KO マウスよりも有意に高値であった。筋肉においては、IRS-1 mRNA は LPS 群における性差や WT と KO での差は見られなかった。

これらの結果より、低血糖状態では雄では肝臓の IRS-1 mRNA 発現を内因性 IL-18 は促進するのに対し、雌では肝臓の IRS-2 発現を内因性 IL-18 が促進する可能性が示唆され、低血糖時の内因性 IL-18 による肝臓のインスリンシグナル制御には性差が存在すると考えた。しかし、低血糖状態でのインスリンシグナル制御が病態にどのように関連しているのかについてはさらに詳細な検討が必要であると考えている。

### (3) IL-18KO マウスにおける高血糖時の自然免疫細胞のアポトーシス

免疫系への影響を検討するため、LPS 投与後 12 時間における IL-18KO マウスの骨髄細胞、末梢血、腹腔内細胞アポトーシスを WT と比較検討したが、いずれの細胞でもアポトーシスに有意な変化は見られなかった。

### (4) 低血糖時における性差の検討

C3H/HeN マウスをもちいて、性差における検討を詳細に行った。

LPS 投与後の血糖値の変動は図 4 の通りであり、投与後 1 時間までは血糖値が上昇し、特に雄で増加する傾向が見られたが、その後低血糖となり、血糖値に性差は認められなかった。血漿中のコルチコステロン濃度にも有意な性差は見られなかった(図 5)が、血漿インスリン濃度においては、LPS 投与後 6 時間の時点で、雌よりも雄で高い傾向が認められた(図 6)。

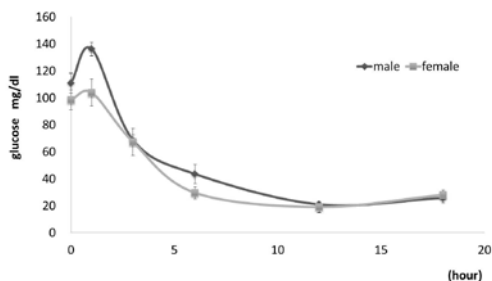


図 4. LPS 投与後の血糖値変化の性差

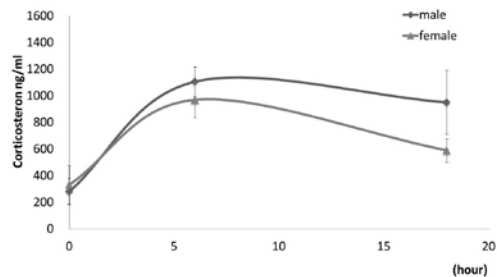


図 5. コルチコステロン濃度の性差

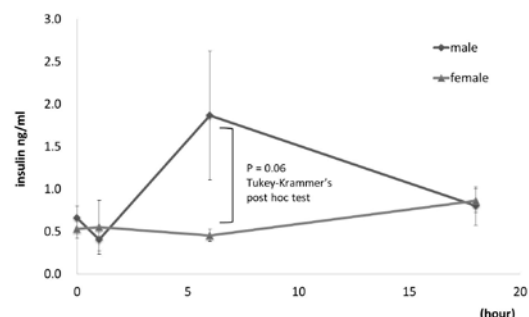


図 6. インスリン濃度の性差

そこで、LPS 投与後 6 時間の時点において、肝臓、筋肉のインスリンシグナル経路について検討したところ、肝臓の IRS-2 mRNA 発現に性差が見られた(図 7)。また、肝臓の IRS-2 発現および、リン酸化 IRS-2 発現も mRNA と同様に雌で高値であった。

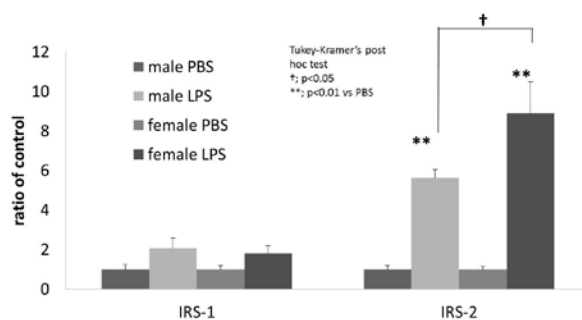


図 7. 肝臓における IRS-1, IRS-2 mRNA 発現

以上の結果より、低血糖時ではあるがインスリンシグナルには性差が見られ、雌ではインスリンシグナルが抑制されにくいのではないかと考えられたが、高血糖時における検証が必要であると考えている。

### (5) 低血糖時における自然免疫細胞のアポトーシスの性差

LPS 投与後 6 時間における末梢血と腹腔内

浸潤好中球のアポトーシスを検出したところ、雄ではアポトーシスが抑制され、細胞数が増加していたが、雌ではアポトーシスの抑制はあまり見られず、細胞数の増加も顕著ではなかった。また、肺へ浸潤した好中球のアポトーシスに関しても雌の方が多い傾向にあり、性差が認められたが、これらとインスリン抵抗性との関連については不明であったため、今後さらに検討を行う予定である。

#### 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 石川 (青山) 倫子、小谷穰治 血糖管理による生体反応の制御はどこまで可能か? 侵襲と免疫 22 巻p. 48-p. 50, 2013 年

[学会発表] (計 5 件)

- ① Hayato Yamashita, Michiko Aoyama-Ishikawa, Taketo Inoue, Makoto Miyoshi, Noriaki Maeshige, Yasuhiko Okimura, Makoto Usami, Joji Kotani. IL-18 suppressed hyperglycemia in hyperacute phase of endotoxemia. The 35 th Congress of the European Society of Parenteral and Enteral Nutrition. September, 1-4, 2013. Germany.
- ② 山下 勇人、青山倫子、高原美樹、山内千里、岡伸樹、井上岳人、前重伯壮、三好真琴、置村康彦、宇佐美眞、小谷穰治 マウス急性エンドトキシン血症下の高血糖へ及ぼすIL-18の関与の検討 第28回日本Shock学会 2013年5月17日-18日 東京
- ③ 山下 勇人、青山 倫子、高原 美樹、山内千里、置村康彦、宇佐美 眞、小谷 穰治 急性炎症下における血糖変動への IL-18 の関与 第 19 回外科侵襲とサイトカイン研究会 2012 年 12 月 8 日 神戸
- ④ 青山 倫子、高原 美樹、山内 千里、宇佐美 眞、小谷 穰治 エンドトキシン血症下の血糖変動とインスリンシグナルへの IL-18 の役割 第 27 回日本Shock学会 2012 年 5 月 11-12 日 東京
- ⑤ Chisato Yamauchi, Michiko Aoyama, Miki Takahara, Noriaki Maeshige, Makoto Miyoshi, Yasuhiko Okimura, Joji Kotani, Makoto Usami. Gender differences in neutrophil apoptosis, blood corticosterone, insulin and glucose levels. The 33th Congress of the European Society of Parenteral and Enteral Nutrition. September, 3-6, 2011. Sweden, Göteborgs.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小谷 穰治 (KOTANI JOJI)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：80360270

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

宇佐美 眞 (USAMI MAKOTO)  
神戸大学・保健学研究科・教授  
研究者番号：00193855

青山 倫子 (AOYAMA MICHIKO)  
神戸大学・保健学研究科・保健学研究員  
研究者番号：40566121

置村 康彦 (OKIMURA YASUHIKO)  
神戸女子大学・家政学部・教授  
研究者番号：30204100