

氏 名	宇 治 祥 隆
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）
学 位 記 番 号	博 士 第 5 9 1 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 1 年 3 月 2 5 日
学 位 論 文 題 目	Adiponectin deficiency promotes the production of inflammatory mediators while severely exacerbating hepatic injury in mice with polymicrobial sepsis (アディポネクチン欠損がマウス敗血症モデルにおいて、炎症性メディエターの産出を促進し、肝障害を悪化させる)
審 査 委 員	主 査 教 授 藤 山 佳 秀 副 査 教 授 後 藤 敏 副 査 教 授 遠 山 育 夫

論文内容要旨

*整理番号	596	氏名 (てふりがな)	宇治 祥隆 (うじ よしたか)
学位論文題目	Adiponectin deficiency promotes the production of inflammatory mediators while severely exacerbating hepatic injury in mice with polymicrobial sepsis (アディポネクチン欠損がマウス敗血症モデルにおいて、炎症性メディエーターの産出を促進し、肝障害を悪化させる)		
<p>【目的】</p> <p>敗血症は多臓器不全の最も代表的な原因の一つで、その病態解明はきわめて重要である。重症敗血症に対する治療戦略は、全身循環の維持と原因感染菌の除去という従来の治療法に加え、細菌やエンドトキシンにより惹起される過剰な炎症性サイトカイン産生をいかにコントロールするかが重要である。炎症性サイトカインに対する特異的拮抗薬が期待されたが臨床応用に至らず、未だ敗血症治療に有効なものは認められていない。</p> <p>Adiponectin(APN)は脂肪細胞由来蛋白であり、最近の研究ではメタボリックシンドロームとの関連が注目され、様々な生理作用のうち抗炎症作用を有している。私たちはこれまでに <i>in vitro</i> で APN がエンドトキシンと結合し中和していることと、アディポネクチン-ノックアウト(APN-KO)マウスの敗血症モデルを使用して APN 欠損による生存率の悪化を証明した。本研究の目的は、APN-KO マウスの敗血症モデルと、APN プロモーターに直接作用し APN 産出を増加させる peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ) の選択的リガンドであるロジグリタゾンを用いて、サイトカイン、ケモカインを含む炎症性メディエーターの変動並びに肝障害の変化について検討し、敗血症における APN の抗炎症作用と肝障害の改善効果を証明することである。</p> <p>【方法】</p> <p>C57BL/6J コントロールマウス (WT 群) と APN-KO マウス (KO 群) に対して盲腸結紮(CLP)による敗血症モデルを作成した。腹腔内麻酔後、下腹部正中切開を行い、盲腸を回盲弁直下で結紮し、盲腸に 22G 針を 2 回穿刺し、閉腹後補液として背部皮下に生理食塩水の投与を行った。CLP 前と CLP 後 24, 48 時間で全血採血と肝臓採取を行い、血漿を分離後 TNF-α, IL-6, MCP-1 をフローサイトメーターによる CBA 法で、肝障害指標である ALT を自動分析器で測定した。さらに、肝臓はホモジナイズ処理後、肝臓内 TNF-α, IL-6, MCP-1 を ELISA 法で測定した。また組織学検討のために両群の肝臓を用いて HE 染色、Oil red O 染色、蛍光二重免疫染色を行い、肝障害の原因を検討した。次に、ロジグリタゾンを WT, KO 群のマウスに 10mg/kg を 2 回/日、5 日間腹腔内投与を行い、上記と同様に CLP モデルを作成した。CLP 前の血漿 APN 濃度を ELISA 法で測定し、CLP 前、CLP 後 24, 48 時間の TNF-α, IL-6, MCP-1 の変動をロジグリタゾン非投与群と比較した。</p>			

【結果】

血漿内炎症性メディエーターにおいて、WT 群に比して KO 群は CLP24 時間後に TNF- α , IL-6, MCP-1 共に有意な上昇を示した。一方、ALT では KO 群で CLP48 時間後に有意な上昇を示し、肝臓内炎症性メディエーターにおいては、CLP48 時間後に KO 群の MCP-1 で有意な上昇を示した。また、組織学分析では、CLP48 時間後の KO 群で著明な肝細胞内脂肪滴の出現を認め、Oil red O 染色により脂肪変性の割合を比較したところ、KO 群で有意な上昇を示した。次に、MCP-1、マウスマクロファージ特異抗体である F4/80 抗体を用いた蛍光二重免疫染色では、活性化した Kupper cell が MCP-1, F4/80 抗体により二重に染色され、KO 群において有意な集積を認めた。さらに、肝細胞内での MCP-1 産出が KO 群で著明に認められた。

また、ロジグリタゾン投与の WT マウス(WT-rosi 群)において CLP 前の血漿 APN 濃度は非投与 WT マウスと比較して有意に上昇し、CLP 後の血漿内炎症性メディエーター濃度は有意な低下を示した。一方、ロジグリタゾン投与の APN-KO マウス(KO-rosi 群)においては、非投与 APN-KO マウスと比較して炎症性メディエーターの有意差は認めなかった。

【考察】

APN は脂肪細胞やマクロファージで LPS 誘導性 NF- κ B 活性を抑制していることがわかっており、最近の研究では APN がエンドトキシンの毒性に対して拮抗する作用があることも報告されている。本研究は APN の敗血症誘導性肝障害に対する改善効果を示した初めての研究である。

APN 欠損による ALT の上昇、肝臓の脂肪変性を示したが、これは、二重蛍光免疫染色から活性化された Kupffer cell の集積と肝細胞内での MCP-1 産出がもたらした結果であることが示唆される。活性化された Kupffer cell は MCP-1 や TNF- α , IL-6 を産出するが、肝臓内濃度としては MCP-1 のみが産出亢進していることより、APN 欠損により肝細胞内で産出された MCP-1 が肝障害、脂肪変性に関与していることが示唆される。

ロジグリタゾン投与により血中炎症性メディエーターの上昇は抑制された。このメカニズムとして、ロジグリタゾンによる APN 濃度上昇と、NF- κ B 経路に対する直接的な炎症性メディエーターの抑制が考えられる。しかし、ロジグリタゾンを APN-KO に投与しても炎症性メディエーターは抑制されなかったことから、直接作用は低いと考えられる。

これらのことから、内因性 APN は敗血症において炎症性メディエーターの上昇を抑制し、生存率を改善する重要な役割を担っていることが示唆された。

【結論】

APN は、敗血症における炎症性メディエーターの上昇を抑制し、敗血症誘導性肝障害（肝細胞内 MCP-1 産出を介した脂肪変性）を改善する。

(備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。

2. ※印の欄には記入しないこと。

(続 紙)

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	596	氏名	宇治 祥隆
論文審査委員			
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>脂肪細胞から分泌される Adiponectin (APN) は Lipopolysaccharide (LPS) に結合することで中和し、抗炎症作用をもたらす。今回、APN ノックアウト (APN-KO) マウスを用いて敗血症モデルを作製し、生存率、炎症性 mediator の変動および肝障害への影響から APN が関与する敗血症病態生理について検討した。</p> <p>盲腸結紮穿孔法 (CLP) を敗血症モデルとし、WT 群と KO 群に群別し比較検討した。その結果、生存率の低下や血中炎症性 mediator レベルの上昇が、KO 群で有意に認められた。さらに、KO 群の肝臓で MCP-1 の有意な上昇と脂肪変性所見、クッパー細胞の集積と肝細胞内での MCP-1 の発現を認めた。</p> <p>また、APN 分泌促進薬である Rosiglitazone の CLP 前投与により WT 群で敗血症死亡率の低下や血中炎症性 mediator、ALT の低下を認めた。これらの結果から、敗血症で APN が直接 LPS を中和するのみならず、マクロファージ活性を抑制、炎症性 mediator の低下や肝機能改善作用をもち、生存率を高めるものと考えられた。</p> <p>本研究は敗血症での APN の関与について証明し、敗血症の新たな治療法の開発に対する知見を示したものと考えられ、博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認められる。</p>			
(平成 21 年 2 月 16 日)			