

氏名(本籍)	土橋 洋史(大阪府)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士第527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18年3月24日
学位論文題目	Circulating concentrations of adiponectin, an endogenous lipopolysaccharide neutralizing protein, decrease in rats with polymicrobial sepsis (ラット敗血症モデルにおいて、アディポネクチンは内因性のエンドトキシン中和蛋白として作用し、血中濃度が減少する)
審査委員	主査 教授 松田 昌之 副査 教授 岡田 裕作 副査 教授 岡村 富夫

論文内容要旨

*整理番号	532	(ふりがな) 氏名	つちはし ひろし 玉橋 洋史
学位論文題目	Circulating concentrations of adiponectin, an endogenous lipopolysaccharide neutralizing protein, decrease in rats with polymicrobial sepsis (ラット敗血症モデルにおいて、アディポネクチンは内因性のエンドトキシン中和蛋白として作用し、血中濃度が減少する)		
<p>【目的】</p> <p>グラム陰性菌の細胞膜構成成分の一つであるエンドトキシンは重症敗血症患者の循環動態、血液凝固系、内分泌代謝系等に様々な影響を及ぼす。重症敗血症に対する治療戦略は全身循環を維持し、原因となる感染巣の除去を行うという従来の治療法に加え、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視されるようになってきている。その中で、炎症性サイトカインに対する特異的拮抗薬の臨床試験が行われてきたが、未だ敗血症治療に有効なものは認められていない。</p> <p>アディポネクチンは脂肪細胞から分泌される蛋白であり、血中に 5-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と豊富に存在する。最近の研究でメタボリックシンドロームでの関与が注目されているが、様々な生理作用のうち抗炎症作用を有することも分かっている。アディポネクチンは TNF-α の産生と作用点の両面で拮抗的に働き、エンドトキシンと高親和性の補体成分 C1q と高い相同性を有している。そこでアディポネクチンの抗炎症作用がエンドトキシンに対する直接的な作用によりもたらされると考え、アディポネクチンとエンドトキシンの相互作用を <i>in vitro</i> で検討すると共に、ラット敗血症モデルを用いてアディポネクチン、エンドトキシン、TNF-α の変動を検討した。</p> <p>【方法】</p> <p>ヒトリコンビナントアディポネクチン 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と LPS (<i>E. coli</i> 0111:B4) 0.1, 1, 10 ng/mL を混和し、37°C 1 時間加温した。混和したサンプルをエンドトキシン定量法の一つであるリムルスアッセイ (LAL) 法にて測定した。同様にアディポネクチン 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と LPS 100, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を混和・加温後、ウェスタンブロット法にて両者の相互作用を検討した。</p> <p>動物モデルとして盲腸結紮 (CLP) モデルを用い、CLP を行う群 (CLP 群) と単開腹のみ行う群 (sham 群) とに分けた。雄 SD ラットを腹腔内麻酔後、下腹部正中切開を行い、盲腸を回盲弁直下で結紮した。結紮部位より末梢で 21G 針で 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。処置後 1.5, 3, 24 時間で全血採血を行い、血漿を分離後アディポネクチン、TNF-α を ELISA 法で、エンドトキシンを LAL 法で測定した。</p>			

- (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。

【結果】

アディポネクチン 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と混和した LPS のエンドトキシン活性は LPS 5000 pg/mL でコントロールの 11.2%、同 500 pg/mL で 4.4%、同 50 pg/mL で 3.6%と有意に抑制が見られた。同様にアディポネクチン 1, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と混和した LPS のエンドトキシン活性も用量依存性に抑制が見られた。ウェスタンブロット法でも LPS と混和したアディポネクチンのバンドは、アディポネクチン単独のバンドより用量依存性に高分子量側にシフトが見られた。

動物モデルでは、sham 群では血漿エンドトキシン、TNF- α 値ともほぼ検出限界以下だったのに対し、CLP 群では両者とも経時的に増加し、処置後 3, 24 時間で sham 群と有意差が見られた。一方 sham 群の血漿アディポネクチン値は処置前の値とほとんど変化がなかったのに対し、CLP 群では経時的に漸減し処置後 3, 24 時間で sham 群と有意差が見られ、24 時間では処置前の約半分にまで減少した。さらに血漿アディポネクチン値は血漿エンドトキシン、TNF- α 値と有意な負の相関が見られた。

【考察】

アディポネクチンは LPS 刺激によるマクロファージの TNF- α 分泌や食作用を抑制し、脂肪細胞や血管内皮細胞において LPS 刺激による NF- κB 活性を抑制することが分かっている。本研究は、アディポネクチンが LPS と直接相互作用しエンドトキシンを中和することでこれらの抗炎症作用をもたらす可能性を示唆した初めての研究である。アディポネクチンと一次構造が類似した C1q やハイサーファクタントプロテイン、マンノース結合蛋白は LPS 中のマンノース基を介して相互作用することが分かっており、アディポネクチンと LPS との相互作用も同様の機序を介していると考えられる。

さらにラット敗血症モデルでアディポネクチンの変動を検討した報告はなく、今まで報告されてきた高比重リポ蛋白、LPS 結合蛋白等の内因性 LPS 中和物質に加えて、アディポネクチンが新規の LPS 抑制系として機能している可能性が示唆された。高比重リポ蛋白は敗血症患者において減少することが報告されており、その減少の程度が病態の重症度と相関することが分かっている。詳細なメカニズムについては今後研究が必要であるが、アディポネクチンも敗血症で血中に放出される LPS と結合することで減少し、余剰の LPS が TNF- α をはじめとした炎症性サイトカインの産生を惹起することが考えられる。アディポネクチンの減少の程度を評価することで敗血症の重症度を早期に反映する指標となりうることも考えられる。

【結論】

in vitro の実験でアディポネクチンが LPS と相互作用し、エンドトキシン活性を抑制することが確認された。またラット敗血症モデルで血漿アディポネクチン値は漸減し、血漿エンドトキシン、TNF- α 値とは相反的に変動した。アディポネクチンはエンドトキシンに対し直接抑制的に作用することで抗炎症作用をもたらす可能性がある。今後アディポネクチン分泌を促進する物質が敗血症下でのサイトカインストームに対する治療薬となりうると思われる。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	532	氏名	土橋 洋史
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>エンドトキシンによる重症敗血症に対する治療では、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のコントロールが重要であるが、未だ満足のいく治療成績は得られていない。一方、メタボリックシンドローム発症との関与が指摘されているアディポネクチンは、その生理作用の一つに抗炎症作用を有することが報告されている。本研究はアディポネクチンの抗炎症作用にアディポネクチンとエンドトキシンとの結合が関与しているか否かを検討すると同時に、動物敗血症モデルを用いて生体内でのこれらのメディエーターの関係を明らかにしようとしたものである。</p> <p>その結果、アディポネクチンとエンドトキシンの混合液のエンドトキシン活性の測定やウエスタンブロットの結果から、アディポネクチンがエンドトキシン活性を抑制し、両者が結合していることを明らかにした。また敗血症モデルの一つであるラット盲腸結紮モデルにより、敗血症の進行とともに両者が相反的に変動する事を明らかにした。</p> <p>このように本論文は、敗血症モデルでアディポネクチンが減少することを初めて明らかにするとともに、アディポネクチンがエンドトキシンを中和する可能性を示唆したものであり、博士(医学)の学位授与に値するものと認められる。</p>			
(平成 18 年 2 月 20 日)			