

主論文の要旨

**Inducible nitric oxide synthase during the late  
phase of sepsis is associated with hypothermia  
and immune cell migration**

〔敗血症後期の iNOS は低体温と免疫細胞の遊走に関連している〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
生体管理医学講座 救急・集中治療医学分野

(指導：松田 直之 教授)

高谷 悠大

## 【緒言】

2016年、敗血症の定義が国際的に新しくなり、従来の「感染による全身炎症」から「感染による臓器障害」に変更となった。感染症による多臓器障害が誘導される病態を解明し、新たな創薬に結びつけることが期待される。また、低体温は、敗血症における予後不良因子として知られており、臓器不全の誘導にも関与するが、その機序については必ずしも明確とはいえない。

Inducible nitric oxide synthase (iNOS)は、敗血症で誘導される代表的な炎症性メディエーターであり、iNOSによる nitric oxide (NO)の過剰産生はショックの誘導因子として知られている。しかし、動物実験では iNOS の阻害が予後を改善させたという報告と、逆に悪化させたという報告が混在しており、ヒト敗血症における選択的 iNOS 阻害剤の臨床試験は未だに行われていない。さらに、iNOS を発現する細胞は、組織における常在細胞なのか、組織に遊走してくる細胞なのかについても一定の見解を得られていない。

本研究では、敗血症病態における体温調節障害および臓器障害に対する iNOS の役割を検討することを目的とした。

## 【方法】

野生型マウスと iNOS ノックアウト (KO) マウス (雄性、8~12 週齢) の 2 群に鍵穴式盲腸結紮穿孔 (cecal ligation and puncture : CLP) を施行し、敗血症病態を誘導し、体温変化と生存率を比較した。対照群は、腹膜を切開し、虫垂を一度剖出したのみの Sham 群とした。また、本マウスにおける iNOS 作用の補助的検討として、選択的 iNOS 阻害剤である 1400W を CLP 施行時と CLP 施行後 6 時間後に尾静脈より静脈内投与したモデルの検討を加えた。さらに、CLP 後の野生型マウスの脳、肺、肝臓、腎臓における iNOS の mRNA の発現を、リアルタイム PCR 法で解析した。血中 NO 濃度は、左心室から心臓血を採取し、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>と NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の濃度をグリース法で測定することで間接的に評価した。一方、組織に遊走する骨髄由来細胞を評価する目的として、GFP トランスジェニックマウスの骨髄を、4 日前および 2 日前にそれぞれ 150 mg/kg、75 mg/kg の 5-FU を腹腔内投与した野生型マウスと iNOS KO マウスに移植した。移植後 12 日目に尾静脈からの採血によりキメラ率を確認し、13 日目に Sham または CLP を行い、その 24 時間後の組織における GFP 陽性骨髄由来細胞の特徴を免疫組織化学染色により解析した。

## 【結果】

CLP 後、野生型は全例が 48 時間以内で死亡したのに対して、1400W を投与すると約 40%が 7 日以上生存した。さらに iNOS KO マウスでは約 78%が 7 日以上生存した (Figure 1-A)。また、野生型では CLP 直後から 3 時間後の初期と、CLP 施行後 6 時間以降の後期の 2 相性に体温低下が見られたのに対し、iNOS KO マウスでは後期の体温低下が抑制された (Figure 2-A)。7 日以上生存した群と 7 日以内に死亡した群に分け

て、体温を比較すると、CLP 施行 6 時間後の体温低下は死亡率と相関しなかったが (Figure 2-B)、24 時間後の体温低下 (Figure 2-C) と 6 時間後から 24 時間後への体温変化 (Figure 2-D) が死亡率と相関していた。血中 NO 濃度は野生型では CLP24 時間後に有意に上昇し、iNOS KO マウスでは上昇しなかった (Figure 3-A)。CLP6 時間後 (Figure 3-B) および 24 時間後 (Figure 3-C) のいずれにおいても、体温低下と血中 NO 濃度が相関していた。また、臓器での iNOS 発現は、CLP 施行 6 時間後と 24 時間後では、肺でのみ増強していた (Figure 4)。

一方、骨髄移植実験では、骨髄を移植せずに CLP を行った野生型は全例 24 時間以内に死亡したが、骨髄を移植した後に CLP を行った野生型や iNOS KO マウスでは有意に生存率が改善した (Figure 1-B)。血中 NO 濃度は、野生型では CLP24 時間後に有意な増加を認めたが、iNOS KO マウスでは増加しなかった (Figure 3-A)。また、CLP を行った野生型では、GFP 陽性骨髄由来細胞の肺への遊走が高められたが、iNOS KO マウスでは抑制されていた (Figure 5-A)。この CLP 後の骨髄由来細胞は、野生型では主に CD11b 陽性 iNOS 陰性の細胞であり、iNOS KO マウスでは主に Gr-1 陽性細胞であり、一部が iNOS を発現していた (Figure 5-B、5-C)。

### 【考察】

当教室では、敗血症マウスにおいて iNOS の転写に関与する転写因子 nuclear factor- $\kappa$ B の活性を抑制することで生存率が改善することを報告したが、本研究では iNOS の阻害により生存率が改善しており、過去の結果と矛盾しなかった。その上で、本研究では、敗血症における iNOS 発現増加が敗血症後期の低体温に関与しており、NO の過剰産生により病態を増悪させている可能性が示された。体温は熱の産生と放散のバランスによって規定されるが、本研究に用いた鍵穴式 CLP マウスモデルでは、NO の血管拡張作用による末梢からの熱放散が増加し、低体温となる可能性が考えられた。

また、敗血症進行期における主要臓器の iNOS 発現は、肺でのみ増強していたが、これは敗血症に随伴する急性肺障害の病態を反映していると考えられた。左心室から採血した血中 NO 濃度が CLP24 時間後に増加していた結果と合わせると、肺で iNOS の発現が高まり NO が過剰産生された後、血中に入って全身に運ばれる可能性が示唆された。

さらに、本研究における骨髄移植実験で、骨髄由来細胞の遊走能を iNOS が調節していることが示された。野生型マウスでは肺に遊走する骨髄由来細胞のほとんどが、マクロファージなどの CD11b 陽性細胞であり、iNOS を発現していない特徴があった。骨髄移植をしなかった敗血症マウスに比べて、骨髄移植した敗血症マウスにおいて生存率が改善した結果より、骨髄由来細胞は保護的な M2 型マクロファージであり、急性肺障害を修復している可能性が考えられた。また、iNOS を発現しているのは肺に遊走する細胞ではなく、肺に常在する細胞であることが示唆された。

### 【結論】

iNOS は、敗血症病態における、特に後期の低体温の進行に関わっている。さらに iNOS は、肺への骨髄由来細胞の遊走性や細胞型 (cell type) を調整し、敗血症における急性肺障害の病態に深く関与していることが示された。敗血症は、感染症により急性肺障害、ショック、体温変調などを誘導する臓器障害の病態である。iNOS は、敗血症の有効な治療ターゲットとして注目すべきであり、選択的 iNOS 阻害薬を使用した臨床研究の必要性を確認した。