

機関番号：37116

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592132

研究課題名 (和文) Septic shock の感受性を規定する因子の解析

- プロスタグランジンとの関連

研究課題名 (英文) Analysis of biomarker for septic shock

研究代表者

山下 優毅 (YAMASHITA UKI)

産業医科大学・医学部・名誉教授

研究者番号：00028680

研究成果の概要 (和文)：

急性炎症反応誘発時や免疫応答誘導時におけるプロスタグランジン (PG) の役割を検討した結果、LPS 刺激によるマクロファージからのサイトカイン類の産生は野生型 (WT) マウスに比べて、PG 合成酵素ノックアウト (KO) マウスで低下していた。一方、LPS 投与後のマウスの血清中サイトカイン産生では、PG-KO マウスが高い傾向を示し、in vitro の結果とは様相が異なっていた。炎症反応の指標として血清中の GPT、GOT を測定した結果、GPT は、PG-KO および WT マウス間で差を認めなかったが、GOT は、PG-KO マウスで WT マウスに比べ著しく低下していた。タンパク質抗原免疫後の PG-KO マウスの抗体産生の傾向を比較すると、PG-KO マウスでヘルパー T 細胞の活性型が異なっていた。以上の結果より PG-KO マウスでは、サイトカイン産生、免疫応答パターンが異なっており、これらの調節機構に PG が重要な役割を果たしていると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

We analyzed the role of prostaglandin (PG) in acute inflammatory reactions and the following immune responses using PG synthetase knockout (KO) mice. The production of cytokine from LPS-stimulated macrophages was decreased in PG-KO mice in comparison with wild type (WT) mice. On the other hand, the serum cytokine level from LPS-treated mice was higher in PG-KO mice than WT mice. In the LPS-challenged mice, serum GOT level was decreased in PG-KO mice. However, GPT level was equal between PG-KO and WT mice. The function of helper T cells after immunization with protein antigens in PG-KO mice was different from that of WT mice. Taken together, these results suggest that PG played an important role for the regulation of inflammatory and immune responses such as cytokine productions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬系

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 救急医学

キーワード：① Septic shock ② プロスタグランジン ③ PG 合成酵素ノックアウトマウス

④ エンドトキシン ⑤ マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

Septic Shock (敗血症性ショック) は、細菌によって引き起こされる全身性炎症反応症候群 (SIRS、 Systemic inflammatory response syndrome) であり、細菌感染症が全身に波及したもので、非常に重篤な状態をいう。無治療ではショック、播種性血管内凝固症候群 (DIC)、多臓器不全などから死に至る。プロスタグランジン (PG) 生成の初発酵素であるシクロオキシゲナーゼ (COX) が、アスピリンなどの抗炎症・解熱・鎮痛薬で阻害されることから、PG は急性炎症の症状発現に関与すると共に免疫反応・炎症の様々なステップでサイトカイン・シグナルと協調して調節作用を発揮しているものと考えられる。我々は今日まで自然免疫系の代表であるマクロファージの活性化機構を解析し、PG 産生にマウスの系統差があること、また PG 産生の低いマウスではマクロファージによるサイトカイン産生が高いことを見出している。従って、その発症にマクロファージの関与が考えられる septic shock の病態にも、マウスの系統差があるのではないかと考えられる。

2. 研究の目的

自然免疫系におけるマクロファージの活性化機構について、サイトカイン産生、化学伝達物質の産生等について解析を行ってきた。マクロファージの関与が考えられる Septic Shock 発症にマウスの系統差、PG 産生能による差があると考えた。Septic Shock の感受性を規定する因子を同定する目的で、PG 合成酵素ノックアウト (KO) マウスを用いて、エンドトキシン (LPS) 投与後のマクロファージからのサイトカイン産生及び Shock の程度、肝機能の程度等を比較し、その発症を

規定、修飾する因子を同定し、また PG 系の薬剤を用いて、septic shock の発現を制御することにより septic shock の発症機構の解明及び予防、治療法の開発を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

PG合成酵素ノックアウトマウス

[Membrane-bound glutathione-dependent PGE₂ synthase (mPGES、BALB/cもしくはC57BL/6N由来)ノックアウトマウスおよび、hematopoietic PGD synthase (hPGDS、BALB/c由来)ノックアウトマウス]および、それぞれの野生型マウスを用いた。

(1) in vitro 実験 8~10 週令の各マウスの腹腔に 4%チオグリコレート培地を注射し、3 日後の腹腔浸出細胞を回収、Dish 吸着能を利用して精製しマクロファージとして用いた。各マウス由来のマクロファージは in vitro での培養時に、LPS (1 μg/ml) を添加、刺激後に培養上清を回収し、特異的な抗体を使用した ELISA 法によって各サイトカイン類の産生量を測定した。活性酸素種の生成は、発光基質として L-012 を使用しルミノメーターで測定した。

(2) in vivo 実験 高濃度 LPS 投与 (100 μg/20g マウス体重) および、Propionibacterium acnes (P. Acnes、1mg/20g マウス体重) 前処理後、低濃度 LPS 投与 (300 ng/20g マウス体重) 後の血清中のサイトカイン産生量を ELISA 法にて測定した。また、GOT (AST、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ)、GPT (ALT、アラニンアミノトランスフェラーゼ) などの炎症性反応の指標となる血清中の酵素類の変動について、富士ドライケムを使用して測定した。

免疫実験は、抗原として卵白アルブミン (OVA、

100 μ g/マウス) をフロイド完全アジュバントと共に足蹠に免疫、3週後に同一条件で追加免疫を行い2週後に採血し血清を得た。抗原を固相化したプレートによるELISA法によって、血清中のIgGサブクラス抗体等の含量を各サブクラスに特異的な抗体を使用し、抗原に特異的な抗体として検出した。吸光度2.0以下となるように試料血清を一定に希釈して測定し、結果は吸光度で示した。IgE抗体は、標準血清を利用し総IgE量で表した。

4. 研究成果

(1) *in vitro* 実験 ① LPS 刺激によるマクロファージからの活性酸素種 (ROS)、一酸化窒素生成能 (NO) は WT マウスに比べ mPGES-KO、hPGDS-KO マウスで亢進していた。図1に示したように、マクロファージからの ROS 産生は、一般的に使用されている他の刺激物質 (ホルボールミリステートアセテート: PMA、オプソニン化ザイモサン: OZ) に対しても KO マウスで高い傾向であった。

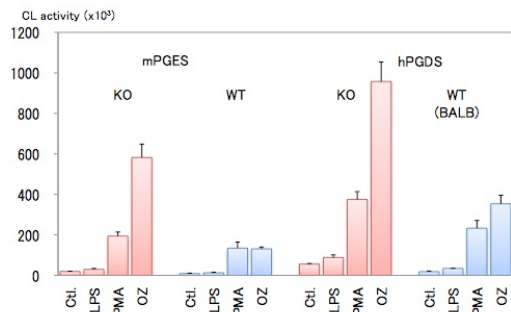


図1 マクロファージからの活性酸素種産生

ROS 産生が KO マウスで高い傾向にあったので、LPS によるアポトーシス誘導について検討を加えた結果、予想に反して KO マウス由来のマクロファージは抵抗性であった。② LPS 刺激によるマクロファージからのサイトカイン産生は、IL-1 β 、IFN- γ で KO マウスが低い傾向を示したが、IL-6、TNF- α 、IL-10、

IL-12 などは KO-WT マウス間で産生量に有意な差を認めなかった。(図2)

(2) *in vivo* 実験 ① LPS 腹腔投与

(100 μ g/20g 体重) 4時間後に採血し、炎症反応の指標として GPT、GOT を測定した。GPT は、mPGES-KO、hPGDS-KO マウスおよび WT マウス間で差を認めなかったが、GOT は、mPGES-KO、hPGDS-KO マウス共に WT マウスで著明に上昇した(図3)。② 100 μ g/20g マウス体重で LPS 投与後のマウス血清中の IL-1 β 、IL-6、TNF- α などの炎症性サイトカイン類の産生は、mPGES-KO マウスで WT マウスと同等かやや高い産生を示した。対照的に、hPGDS-KO マウスでは、WT マウスに比べ IL-6、TNF- α 、IFN- γ などの産生は著しく低下していた。

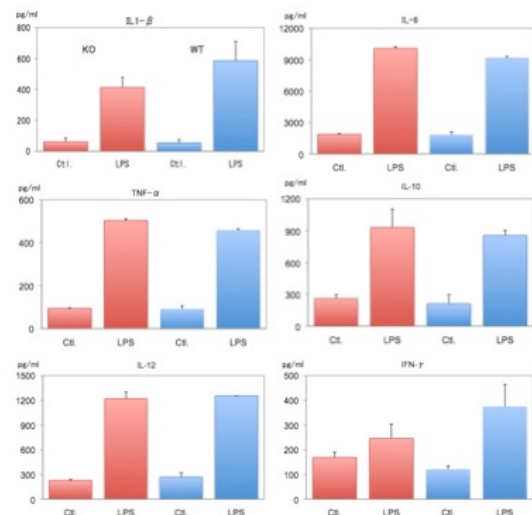


図2 マクロファージからのサイトカイン産生

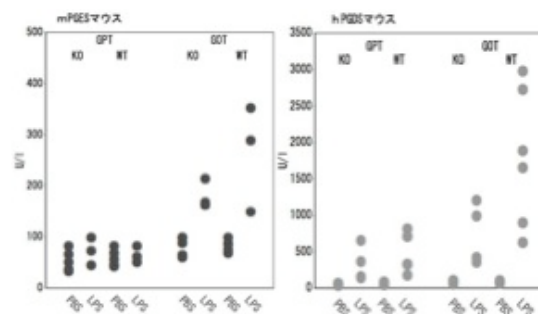


図3 LPS 投与マウスの血清 GPT、GOT 値

③ OVA 免疫後の抗 OVA 抗体産生は、IgG1 および、IgG2c では WT マウスとの比較で mPGES-KO マウスで低く、hPGDS-KO マウスでは高い傾向を示した。IgG2a は mPGES-KO、-WT マウスの系統では有意な差は見られず、hPGDS-KO マウスに比べ応答性、産生の低下が認められた。総 IgE は、mPGES-KO マウスでは、WT マウスに比べ著しい産生量の増加を示したが、hPGDS-KO マウスでは低下していた。抗体およびサイトカイン類産生のパターンから、mPGES-KO マウスは Th2 型、hPGDS-KO マウスは Th1 型の傾向にシフトしていることが分かった。(図 4)

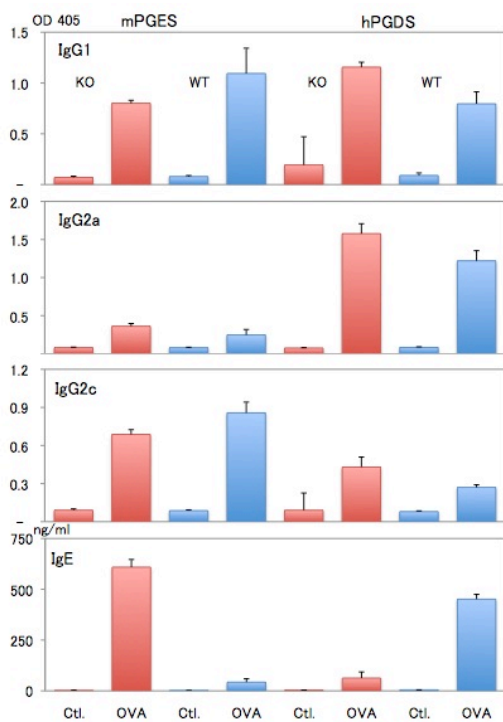


図 4 OVA 免疫マウス血清中の抗体産生パターン

PGD₂ はアレルギー性炎症に関与する重要な因子であることが知られているが、これをノックアウトすることにより Th1 型に偏向したものであると思われる。炎症反応時に誘導・合成される PGE₂ および PGD₂ を欠損させると、炎症反応の程度、サイトカイン類の産生、免疫応答などのパターンに著しい変化が見られ、これ

らの調節機構に PG が重要な役割を果たしていると考えられた。

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 10 件)

(1) Ding, N., Yamashita, U., Matsuoka, H., Sugiura, T., Tsukada, J., Noguchi, J. and Yoshida Y.: Apoptosis induction through proteasome inhibitory activity of cucurbitacin D in human T-cell leukemia. Cancer, in press, 2011. (査読有)

(2) Dong, Q., Sugiura, T., Toyohira, Y., Yoshida, Y., Yanagihara, N. and Karasaki, Y.: Stimulation of IFN-gamma production by garlic lectin in mouse spleen cells: Involvement of IL-12 via activation of p38 MAPK and ERK in macrophages. Phytomedicine, 18 : 309-316, 2011. (査読有)

(3) Liu, JQ., Yoshida Y., Kunugita, N., Noguchi, J., Sugiura, T., Ding, N., Arashidani, K., Fujimaki, H. and Yamashita, U.: Thymocytes are activated by toluene inhalation through the transcription factors NF-κB, STAT5 and NF-AT. Journal of Applied Toxicology, 30 :656-660, 2010. (査読有)

(4) Yoshida, Y., Liu, J.Q., Sugiura, T., Ishidao, T., Ueno, S., Yanagita, H., Fueta, Y., Kunugita, N., Hori, H. and Yamashita, U.: An indoor air pollutant 2-ethyl-hexanol activates CD4 cells. Chemo-Bio Intera, 177 :137-141, 2009. (査読有)

(5) Takahashi, N., Yoshida, Y., Sugiura, T., Matsuno K., Fujino, A and Yamashita, U.: Cucurbitacin D isolated from *Trichosanthes kirilowii* induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells *in vitro*. International Immunopharmacology, 9, 508-513, 2009. (査読有)

(6) Yoshida, Y., Ding, N., Liu, JQ., Noguchi, J., Sugiura, T., Kunugita, N.: Formaldehyde inhalation activates signal transducer and activator of transcription 5 in immune cells.

European Immunology Conference, 39, S1, S555, 2009. (査読有)

(7) Omata, S., Kuroda, E., Sugiura, T., Yamashita, U.: The NF-kappaB RelA subunit confers resistance to Leishmania major by inducing nitric oxide synthase 2 and Fas expression but not Th1 differentiation. J Immunol, 182, 4910-4916, 2009. (査読有)

(8) Yoshida, Y., Nakano, Y., Ueno, S., Liu, JQ., Fueta, Y., Ishidao, T., Kunugita, N., Yanagihara, N., Sugiura, T., Yamashita, U., Hori, H.: Effects of 1-bromopropane, a substitute for chlorofluorocarbons, on brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression Int ImmPharma, 9, 433-438, 2009. (査読有)

(9) Nakano, Y., Kuroda, E., Kito, T., Uematsu, S., Akira, S., Yokota, A., Nishizawa, S. and Yamashita, U.: Induction of prostaglandin E2 synthesis and microsomal prosta-glandin E synthase-1 expression in microglia by glioma-derived soluble factors. J. Neurosurgery 108. 311-319, 2008. (査読有)

(10) Mori, T, Kabashima, K., Yoshiki, R., Sugita, K., Shiraiishi, N., Onoue, A., Kuroda, E., Kobayashi, M. and Yamashita, U.: Cutaneous hypersensitivities to hapten are controlled by IFN-gamma-upregulated keratinocyte Th1 chemokines and IFN-gamma-downregulated langerhans cell Th2 chemokines." J. Invest. Dermatol. 128. 1719-1727, 2008. (査読有)

[学会発表] (計 11 件)

(1) Yoshida, Y. and Tsukada, J.: BDNF produced by leukemia cells attenuates cytokine production in macrophages and induced Foxp3 positive cells through NF-AT, Smad and RhoA. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, 25 Aug 2010.

(2) Ding, N. Yamashita, U. and Yoshida, Y.: Anti-proliferative activity of cucurbitacin D on T-cell leukemia through proteasome inhibition. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, 25 Aug 2010.

(3) Sugiura, T. and Yamashita, U. :

Oxidative stress and apoptotic changes in mouse macrophages exposed to cadmium. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, 25 Aug 2010.

(4) Yoshida, Y.: Analysis of mechanism of the IL -1 induction by new proteasome inhibitor Cucurbitacin D. Bit' s 3rd. Annual World Cancer Congress 2010 Singapore, 23 Jun 2010.

(5) Yoshida, Y.: BDNF produced by leukemia cells modulates immune responses. 1st. World Congress of Immunodiseases and Therapy. Beijing, 16 May 2010.

(6) Yoshida, Y., Ding, N. and Yamashita, U.: Induction of apoptosis in T-cell leukemia by new drug which targeted a proteasome inhibition. World Congress of Gene-2009, 中国・佛山, 6 Dec 2009.

(7) 丁 寧, 吉田 安宏, 山下 優毅: Cucurbitacin Dの転写および転写後修飾によるIL-1 β 産生の調節機構. 第39回日本免疫学会, 大阪, 12月3日2009.

(8) 吉田 安宏, 丁 寧, 山下 優毅: BDNF produced by leukemia cells activates AP1 and NF-AT, which resulted in induction of Foxp3. 第39回日本免疫学会, 大阪, 12月3日2009.

(9) 杉浦 勉, 山下 優毅: カドミウムにより誘導される酸化傷害に対するレドックス制御におけるメタロチオネインの役割 第39回日本免疫学会, 大阪, 12月3日2009.

(10) Yoshida, Y., Ding, N. and Yamashita, U.: Triterpenoids cucurbitacin D isolated from cucurbitaceae induces apoptosis in adult T-cell leukemia through proteasome inhibition. 2009 4th Medical Biotech Forum, International experts symposium. 大連, 8 Aug, 2009.

(11) 山下 優毅, 丁 寧, 吉田 安宏: プロスタグランジンD2による免疫反応の調節” 第26回産業医科大学学会総会, 北九州市, 10月30日2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 優毅 (YAMASHITA UKI)

産業医科大学・医学部・名誉教授

研究者番号：00028680

(2)研究分担者

吉田 安宏 (YOSHIDA YASUHIRO)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10309958

(3)研究分担者

杉浦 勉 (SUGIURA TSUTOMU)

産業医科大学・産業医学研究支援施設・

准教授

研究者番号：40131924