

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 9 月 7 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08611

研究課題名(和文) ピオグリタゾンによる貪食細胞機能増強作用の機序解明

研究課題名(英文) Mechanism of augmented phagocytic activity in liver by pioglitazone treatment

研究代表者

中島 正裕 (NAKASHIMA, Masahiro)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・免疫・微生物学・助教)

研究者番号：70738103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：マウスにピオグリタゾンを予防投与すると、敗血症における予後が改善した。特に高齢マウスにおいて認められるこの傾向は、静脈血中における炎症性サイトカインの減少だけでなく、肝臓貪食細胞の殺菌能増強効果を伴っていた。つまり、ピオグリタゾンの投与に伴い、肝臓の好中球や遊走マクロファージのスカベンジャー受容体(CD206)発現は増強し、大腸菌の取込みも改善していた。こうした貪食細胞の機能増強は、解糖系酵素の阻害に伴い減弱したことから、ピオグリタゾン投与に伴う解糖反応の亢進に依存しているものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多剤耐性菌の脅威が深刻さを増しつつある我が国の医療機関において、細菌感染に対する新たな治療法の確立は急務といえる。本研究は、糖尿病治療薬ピオグリタゾンを予め腹腔内投与したマウスでは、その後に大腸菌を経静脈投与することで誘発される敗血症の予後を改善させることができることを示したものである。現在、細菌感染に対する抗生剤の開発は減少傾向にあると報告されている。そうした状況において、ピオグリタゾン投与による糖代謝の改善が細菌感染に対する防御能を向上させるとの知見は、社会的にも貢献できる知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Pioglitazone significantly prevented from septic death and improved bacterial elimination in the peripheral blood. Pioglitazone lowered serum proinflammatory cytokines and enhanced bacterial elimination in the liver, by increasing the phagocytic and bactericidal activities of liver F4/80+CD11b+ recruited macrophages (M₁). Of note, CD206 expression and reactive oxygen species production in F4/80+CD11b+ recruited M₁ were enhanced. Quantitative PCR revealed that hepatic CD11b+ cells (including Gr-1+CD11b+ neutrophils and recruited M₁) augmented gene expression of rate-limiting enzymes for glycolysis by pioglitazone, and their improved phagocytic and bactericidal activities were abolished by glycolysis inhibiting reagents. Pioglitazone might strengthen the phagocytic and bactericidal activities of liver recruited M₁ and that these immunological activities are closely associated with their glucose catabolism.

研究分野：免疫学

キーワード：ピオグリタゾン 肝臓 貪食細胞 解糖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ピオグリタゾンがマクロファージに及ぼす薬理作用

2 型糖尿病患者の脂肪組織では、マクロファージやリンパ球などの炎症・免疫細胞の浸潤がみられ、tumor necrosis factor (TNF)- α や interleukin (IL)-6 などの炎症性サイトカイン産生や macrophage chemoattractant protein (MCP)-1 などのケモカイン産生が増加し、慢性炎症が生じることが報告されている。糖尿病治療薬ピオグリタゾンは peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ を有したマクロファージにも作用し、脂肪組織の慢性炎症を軽減させるとともに、炎症性サイトカインやケモカインの産生も低下させ、生体のインスリン抵抗性を軽減させると考えられている。ピオグリタゾン投与が盲腸結紮穿刺 (CLP) にて作成した敗血症モデルマウスにおいて生命予後を改善させることが報告されているが、これはピオグリタゾンのこうした抗炎症効果に起因するものと考えられてきた (Gao, JSR, 2014, Ferreira, JI, 2014)。一方、細菌排除に関する影響については殆ど議論されてこなかった。

(2) ピオグリタゾンの敗血症モデルの予後改善作用

我々は、糖尿病モデル (db/db^{-/-}) マウスにおける血糖コントロールと好中球の殺菌能の関連において、血糖コントロールが末梢血好中球の貪食・殺菌能を改善することを報告した。これは、db/db^{-/-} マウスでは好中球の貪食・殺菌能が減弱するため、ブドウ球菌による皮膚局所感染がコントロールよりも悪化するものの、インスリンによる血糖コントロール改善により病巣が縮小するというものである (Yano, Infect Immunity, 2012)。

本研究の予備実験において、我々は老齢マウスに致死量の大腸菌を経静脈投与することで敗血症モデルを作成した。その際にピオグリタゾンを大腸菌投与前に腹腔内投与しておく、生命予後が大幅に改善するとともに (図 1)、大腸菌投与 1 時間後に末梢血から検出される大腸菌数が減少していることを見出した (図 2)。

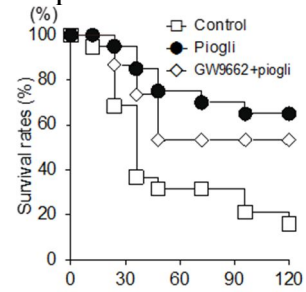


図1 大腸菌投与による生命予後

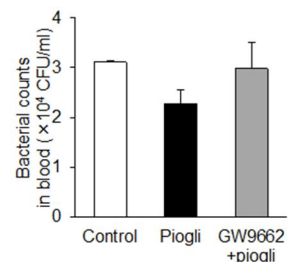


図2 静脈血中から検出された大腸菌数

2. 研究の目的

多剤耐性菌の脅威が深刻さを増しつつある我が国の医療機関において、細菌感染に対する新たな治療法の確立は急務といえる。本研究に先立ち、我々はインスリン抵抗性改善薬であるピオグリタゾンのマウスへの投与が血液中からの細菌排除を促し、敗血症の予後を改善させることを見出した。

従来、ピオグリタゾンの薬理的効果は主に脂肪組織や肝臓などでの抗炎症効果や代謝効果が着目されてきた。本研究はこうした既存の報告とは異なるピオグリタゾンの免疫学的効果を明らかにするものである。

3. 研究の方法

末梢血中に取り込まれた細菌は大部分が肝臓にて処理されることを考慮すると、肝臓における細菌排除が重要になると考えられるため、本研究においては肝臓の好中球やマクロファージにおける解析を中心に行うこととした。

(1) マウス敗血症モデルの作成と肝臓貪食細胞の採取

マウスは雄性的 C57BL/6 マウスを用いた。老齢マウス (50~60 週齢) と若齢マウス (7 週齢) に分けて検討した。老齢マウスと若齢マウスには、それぞれ 8×10^8 CFU と 6×10^8 CFU の *Escherichia coli B* (*E. coli B*) を経静脈投与した。ピオグリタゾン (10mg/kg) は、大腸菌投与 3 時間前に腹腔内投与した。ピオグリタゾンを投与すると末梢血の血糖値は約 3~4 時間後に低下したため、肝単核球の採取はピオグリタゾン投与 3 時間後に行った。肝臓の好中球や遊走マクロファージは貪食能を有しており、CD11b を発現している。こうした貪食細胞の採取にあたっては磁気的に CD11b⁺細胞を採取することとした。

(2) 肝臓貪食細胞における貪食・殺菌能の評価

肝臓の貪食細胞には、少なくとも (Gr-1⁺CD11b^{bright}) 好中球と (F4/80^{high}CD11b^{low}) 固有クッパー細胞 (KC) (F4/80^{low}CD11b^{high}) 遊走マクロファージ (M ϕ) が存在する。ピオグリタゾンを投与したマウスから採取した肝単核球を pHrodo 標識大腸菌 (pHrodo *E. coli*) や FITC 標識大腸菌 (FITC-*E. coli*) と 1 時間培養し、フローサイトメトリーを用いて貪食細胞数と大腸菌を結合または貪食した細胞をそれぞれ測定した。または、肝単核球と大腸菌生菌を培養して gentamicin protection assay にて細胞内殺菌を検証した。特に肝臓 CD11b⁺細胞を分取した後は、本細胞と一定数の大腸菌生菌を抗生剤無添加の培地にて 1 時間共培養し、培養液中に残存している菌数を測定した。

(3) ピオグリタゾンによる肝臓貪食細胞の変化

ピオグリタゾン投与後の肝臓貪食細胞について、scavenger receptor (CD206 と MARCO、CD204、CD36) の発現を調べた。肝臓単核球と大腸菌死菌を培養した際に産生されている活性酸素量も Fc OxyBURST を用いてフローサイトメトリーで調べた。

またピオグリタゾンが肝臓貪食細胞に及ぼす代謝変化を検証するため、CD11b⁺細胞の解糖、酸

化的リン酸化、β酸化に関する酵素遺伝子の発現を調べた。

(4) 肝臓貪食細胞機能と解糖との関連について

ピオグリタゾン投与マウスから採取した肝単核球を予め解糖阻害剤(2-DG)と培養した後、上記の(2)と(3)にしたがい、貪食・殺菌能や scavenger receptor 発現、活性酸素産生能を測定した。

4. 研究成果

(1) ピオグリタゾン投与による抗炎症効果

マウスの週齢にかかわらず、ピオグリタゾンを腹腔内投与したマウスでは大腸菌投与時の血中炎症性サイトカイン濃度増加が抑制された(図3)。本効果はPPAR-γ阻害剤を投与したマウスにおいても残存したことからPPAR-γ非依存的と考えられる。

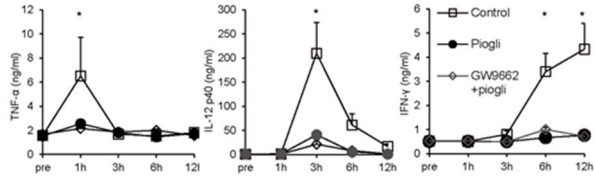


図3 老齢マウスに大腸菌を投与した際の血中炎症性サイトカイン濃度

(2) ピオグリタゾン投与による貪食・殺菌能の増強効果

ピオグリタゾンを投与したマウスでは、肝単核球(図4A)と肝臓CD11b⁺細胞(図4B)の貪食・殺菌能が増強した。これはピオグリタゾン投与に伴い、肝単核球における好中球の増加、遊走Mφにおける scavenger receptor CD206発現の増強、遊走Mφにおける活性酸素産生の増強、が原因として考えられた。

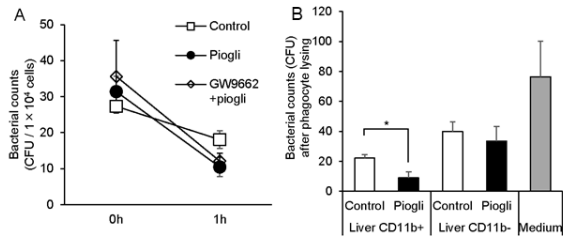


図4 ピオグリタゾン投与による肝単核球とCD11b⁺cellsの貪食・殺菌能の変化

(3) ピオグリタゾン投与による肝臓CD11b⁺細胞の代謝変化と貪食機能への影響

ピオグリタゾンが投与されたマウスのCD11b⁺細胞の代謝変化として、解糖反応の律速段階となる酵素(phosphofructokinase, pyruvate kinase, hexokinase-1)の遺伝子発現が増強していた(図5)。

我々は、解糖反応の増強が肝臓貪食細胞の機能に及ぼす可能性を調べるため、ピオグリタゾンを投与したマウスの肝臓単核球に対して予め2DGを添加して解糖反応を阻害し、その貪食機能への影響を調べた。肝単核球の細胞内殺菌能は2DG添加により明らかに低下し(図6A)、フローサイトメトリー上では遊走Mφの貪食能低下が認められた(図6B)。

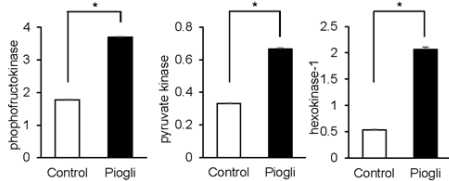


図5 ピオグリタゾン投与による肝臓CD11b⁺細胞の解糖反応を制御する遺伝子発現の変化

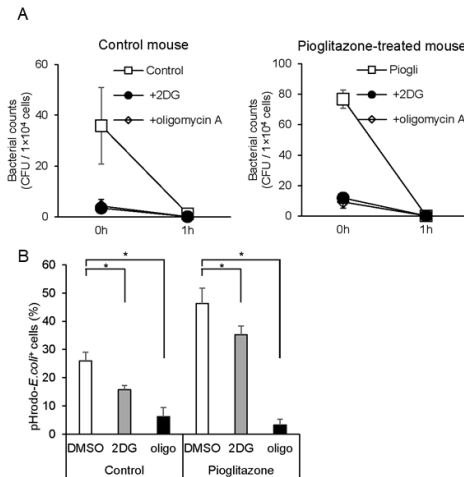


図6 代謝阻害剤を肝臓貪食細胞に添加した際に認められた貪食機能の変化 (A) 肝臓単核球におけるgentamicin protection assay (B) 遊走MφのpHrodo-*E.coli*に対する貪食能

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kinoshita Manabu, Miyazaki Hiromi, Nakashima Hiroyuki, Nakashima Masahiro, Nishikawa Makoto, Ishikiriyama Takuya, Kato Shoichiro, Iwaya Keiichi, Hiroi Sadayuki, Shinomiya Nariyoshi, Seki Shuhji	4. 巻 9
2. 論文標題 In vivo Lipopolysaccharide Tolerance Recruits CD11b ⁺ Macrophages to the Liver with Enhanced Bactericidal Activity and Low Tumor Necrosis Factor-Releasing Capability, Resulting in Drastic Resistance to Lethal Septicemia	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Innate Immunity	6. 最初と最後の頁 493 ~ 510
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000475931	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Uchida Takahiro, Nakashima Hiroyuki, Yamagata Akira, Ito Seigo, Ishikiriyama Takuya, Nakashima Masahiro, Seki Shuhji, Kumagai Hiroo, Oshima Naoki	4. 巻 8
2. 論文標題 Repeated administration of alpha-galactosylceramide ameliorates experimental lupus nephritis in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-26470-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Uchida Takahiro, Nakashima Hiroyuki, Ito Seigo, Ishikiriyama Takuya, Nakashima Masahiro, Seki Shuhji, Kumagai Hiroo, Oshima Naoki	4. 巻 315
2. 論文標題 Activated natural killer T cells in mice induce acute kidney injury with hematuria through possibly common mechanisms shared by human CD56 ⁺ T cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Renal Physiology	6. 最初と最後の頁 F618 ~ F627
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajprenal.00160.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kinoshita Manabu, Nakashima Hiroyuki, Nakashima Masahiro, Koga Minori, Toda Hiroyuki, Koiwai Kazuki, Morimoto Yuji, Miyazaki Hiromi, Saitoh Daizoh, Suzuki Hiroaki, Seki Shuhji	4. 巻 9
2. 論文標題 The reduced bactericidal activity of neutrophils as an incisive indicator of water-immersion restraint stress and impaired exercise performance in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-41077-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakashima Masahiro, Kinoshita Manabu, Nakashima Hiroyuki, Kotani Aya, Ishikiriyama Takuya, Kato Shoichiro, Hiroi Sadayuki, Seki Shuhji	4. 巻 25
2. 論文標題 Pioglitazone improves phagocytic activity of liver recruited macrophages in elderly mice possibly by promoting glucose catabolism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Innate Immunity	6. 最初と最後の頁 356 ~ 368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1753425919849620	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Nakashima Masahiro, Kinoshita Manabu, Nakashima Hiroyuki, Ishikiriyama Takuya, Kato shoichiro, Koikai kazuki, Seki Shuhji
2. 発表標題 Pioglitazone prevents sepsis in old mice by enhancing liver innate immunity
3. 学会等名 第47回日本免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakashima Masahiro, Kinoshita Manabu, Nakashima Hiroyuki, Seki Shuhji
2. 発表標題 Pioglitazone reinforces liver innate immunity against bacterial infection in aged mice.
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

[図書] 計0件

[産業財産権]

[その他]

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中島 弘幸 (NAKASHIMA Hiroyuki) (10574064)	防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・免疫・微生物学・助教 (82406)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石塚 俊晶 (ISHIZUKA Toshiaki) (30399117)	防衛医科大学校（医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・薬理学・教授 (82406)	
研究分担者	木下 学 (KINOSHITA Manabu) (70531391)	防衛医科大学校（医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・免疫・微生物学・准教授 (82406)	
研究分担者	関 修司 (SEKI Shuhji) (80531392)	防衛医科大学校（医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・免疫・微生物学・教授 (82406)	
研究協力者	中西 邦昭 (NAKANISHI Kuniaki) (60523115)	防衛医科大学校（医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・検査部・教授 (82406)	