

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09309

研究課題名(和文) 中毒および外傷に起因する生体侵襲の基礎的研究

研究課題名(英文) The study of systemic response to intoxication and traumatic injury

研究代表者

伊関 憲 (Iseki, Ken)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：70332921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：中毒に続く炎症応答は生体防御機構のみならず組織再生の起点になる。細胞内情報伝達に関わる酵素ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)ファミリーのうちイプシロン型DGK(DGK $\epsilon$ )は、炎症応答において細菌内毒素LPS刺激に反応して一過性に転写亢進を起こす。本研究では、TLR受容体を介する自然免疫におけるDGK $\epsilon$ の機能的役割を追求するため、LPS内毒素ショック細胞および動物実験モデルを解析した。その結果、LPS投与24時間後の生存率は、野生型マウスで60%であったが、DGK $\epsilon$ -KOマウスは100%が生存した。以上より、LPS内毒素ショックのシグナル応答には、DGK $\epsilon$ が関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DGK $\epsilon$ 欠損がLPS受容体として働くTLR4シグナルと全身性炎症応答に及ぼす影響を、細胞培養と動物モデルを用いて解析した。DGK $\epsilon$ 欠損MEFでは、LPS刺激後15分におけるAktとNF- $\kappa$ B p65サブユニットのリン酸化レベルが減少した。腹腔内LPS投与による内毒素ショックの動物モデル実験において、DGK $\epsilon$ -KOマウスでは肝臓におけるiNOS発現が低下した。以上のことから、DGK $\epsilon$ 欠損によってNF- $\kappa$ B転写制御によるiNOS発現誘導が低下し、その結果NO産生が減少し、肝障害が抑制されたのではないかと考えられた。DGK $\epsilon$ 抑制剤は内毒素ショックの治療薬となる可能性を持つことが示唆される。

研究成果の概要(英文)：Inflammatory response after intoxication is essential for not only biological defense mechanism but also tissue repair. The diacylglycerol kinase (DGK) family is involved in intracellular signal transduction. Of those, DGK $\epsilon$  mRNA is transiently increased in response to bacterial endotoxin LPS. In this study, we investigated functional implications of DGK $\epsilon$  in TLR-mediated innate immunity using LPS-induced endotoxin shock models of cell and animal. We found that DGK $\epsilon$ -KO mice show resistance to LPS-induced endotoxin shock, suggesting that DGK $\epsilon$  regulates LPS-mediated innate immunity.

研究分野：Emergency medicine

キーワード：炎症応答 細胞内情報伝達 LPS エンドトキシンショック 自然免疫

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

救急診療における中毒症例は、医薬品や一酸化炭素、有機リンなどの農薬、炭化水素等の工業品による死亡事例が多い。これら中毒に続く炎症応答は、生体防御機構のみならず、組織再生機構の起点になるもので、この炎症応答をコントロールすることが、救急症例の対応に重要である。申請者等は長年、細胞内情報伝達に関わる酵素ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)ファミリーの生理機能の解析に従事し、様々な疾患モデルを用いて病態との関連性を追求してきた。これまで、DGK アイソザイムのうちイプシロン型 DGK(DGK $\epsilon$ )は、炎症応答においてリポポリサッカライド(LPS)投与によるエンドトキシン刺激に反応して一過性に転写亢進を起こすことを明らかにしてきたが、TLR 受容体を介する自然免疫における DGK $\epsilon$  の機能的役割は未だ不明である。

とりわけ、薬物の多くや細菌性内毒素は肝臓で代謝・解毒され、胆道あるいは腎臓から排泄される。中毒性肝障害の多くは、肝臓の代謝能力を上回る量の薬物や毒素に起因するものであり、これらが肝障害を惹起し、炎症応答が生じる。しかしながら、肝障害の組織・細胞応答メカニズムについては、臨床現場での解析は困難であり、動物実験による解析が必要と考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、炎症応答モデルとして、グラム陰性菌の lipopolysaccharide (LPS) 投与による内毒素ショック細胞および動物モデル実験を施行し、DGK ファミリーの関与を検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) LPS 投与マウス敗血症モデル

野生型 (WT) マウス (C57BL6J)、DGK 欠損 (DGK -KO) マウスに対して、LPS (25 mg/kg) を腹腔内に投与し敗血症モデルマウスを作製した。コントロールとして、同量の生理食塩液を腹腔内投与した。LPS 投与 3 時間、6 時間、24 時間後に、麻酔下にマウスから肺、肝臓、腎臓を採材した。各臓器の一部は、ウエスタンブロット解析用として 80 で凍結保存し、残りは免疫組織化学解析用として、4% パラホルムアルデヒドで浸漬固定した。固定組織は、凍結切片作製用にホルトの高張ガムシヨ糖液で置換し、20 で凍結後、10  $\mu$ m 厚の凍結切片を作製した。

#### (2) 細胞培養と刺激実験

マウス胎児線維芽細胞 (MEF) は、WT マウス、DGK -KO マウスから採取し、SV40 により不死化されたものを実験に用いた。MEF は 37、CO<sub>2</sub> 5%環境で、10% ウシ胎児血清とペニシリン/ストレプトマイシンを添加した Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) で培養した。各 MEF は、1 時間の血清飢餓で処理後、LPS (1  $\mu$ g/ml) で刺激し、継時的に解析した。

### 4. 研究成果

DGK の欠損が自然免疫に与える影響について検討するために、まず細胞レベルの実験を行った。WT MEF と DGK -KO MEF を LPS で刺激し、経時的に解析したところ、WT MEF では Akt (Ser473) のリン酸化が刺激後早期の 5 分から 15 分にかけて増加するのに対し、DGK -KO MEF では刺激後 15 分までの Akt のリン酸化が抑制されていた。また DGK -KO MEF では、LPS 刺激による Akt のリン酸化は 30 分後に増加するが、60 分後には減少する傾向が認められた。以上より、LPS 刺激による Akt 活性化は、DGK -KO において抑制されることが示唆された。

次に、TLR4 を介する Akt シグナルの下流経路を検討するため、細胞を LPS で刺激し NF- $\kappa$ B シグナルの変化を解析した。WT MEF では、IKK  $\gamma$  (Ser176/180) と I $\kappa$ B (Ser32) のリン酸化が刺激後 5 分から 15 分にかけて増加するのに対し、DGK -KO MEF では両者のリン酸化は抑制されていた。

NF- $\kappa$ B p65 サブユニットは核移行シグナルを持ち、核内で NF- $\kappa$ B 依存性遺伝子の転写を行う。そこで、p65 サブユニットの核移行について免疫細胞化学の手法を用いて検討した。WT MEF では、LPS 刺激後 15 分で核内優位に p65 サブユニットが強く認められる細胞が半数以上を占め、刺激後 60 分、120 分においても p65 サブユニットの核局在が持続する様子が観察された。一方、DGK -KO MEF では、刺激後 15 分で核内優位に p65 サブユニットが認められる細胞は WT MEF と比較して少なく、刺激後 60 分、120 分においては核内に p65 サブユニットが局在する細胞はほとんど認められなかった。以上より、DGK の欠損は、p65 サブユニットのリン酸化と核移行を減少させ、NF- $\kappa$ B 経路を抑制することが示唆された。

次に自然免疫に対する個体レベルでの影響を検討するため、敗血症モデルマウスを作製し解析した。LPS を腹腔内に投与し、生存率を解析した。LPS 投与マウスの 24 時間生存率は、WT マウスでは 53%であるのに対して、DGK -KO マウスでは 100%であった。また、生理食塩液を投与

したコントロール群ならびに LPS 投与後 3 時間群、6 時間群の生存率は 100%であった。以上より、DGK<sup>-</sup>KO マウスは WT マウスに比較して内毒素ショックに対する抵抗性を示すことが明らかになった。

自然免疫において炎症応答の結果として誘導される一酸化窒素合成酵素 (iNOS) は NF- $\kappa$ B の制御下であり、一酸化窒素 (NO) 産生を介して炎症を誘導する。iNOS は、WT マウス肝臓において強く発現誘導されるが、DGK<sup>-</sup>KO マウスにおける誘導はほとんど認められなかった。次に、NO 産生による酸化ストレスの程度を検討するために、活性酸素種によりダメージを受けた DNA のマーカーである 8-OHdG の発現を免疫組織化学的に解析した。生理食塩液投与によるコントロール群の肝臓において、8-OHdG 陽性像は WT および DGK<sup>-</sup>KO マウスの両者にほとんど検出されないが、LPS 投与 24 時間後、iNOS 誘導のみられる WT マウス肝臓において 8-OHdG の陽性像が認められた。一方、LPS に対して iNOS 誘導のみられない DGK<sup>-</sup>KO マウスでは、8-OHdG 陽性像はほとんど検出されなかった。以上より、DGK<sup>-</sup>KO マウスでは、肝臓での iNOS 発現は上昇せず、その結果 NO 産生による酸化ストレスを介する肝細胞障害が抑えられていると推測された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Seino Keiko, Nakano Tomoyuki, Tanaka Toshiaki, Hozumi Yasukazu, Topham K. Matthew, Goto Kaoru, Iseki Ken	4. 巻 14
2. 論文標題 Ablation of DGK facilitates smooth muscle actin expression via the Smad and PKC signaling pathways during the acute phase of CCl4 induced hepatic injury.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 300-308
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.13749	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小澤 昌子, 中野 知之, 伊関 憲, 後藤 薫
2. 発表標題 DGK 欠損はNF-k経路を抑制しエンドトキシンへの耐性をもたらす
3. 学会等名 第127回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小澤 昌子, 中野 知之, 伊関 憲, 後藤 薫
2. 発表標題 DGK 欠損はNF-kB経路を抑制しエンドトキシンへの耐性をもたらす
3. 学会等名 第127回 日本解剖学会総会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Akiko Ozawa, Tomoyuki Nakano, Ken Iseki and Kaoru Goto
2. 発表標題 DGK 欠失マウスは、エンドトキシンショックに対して抵抗性を獲得する
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年～2021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	後藤 薫  (Goto Kaoru)  (30234975)	山形大学・医学部・教授    (11501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	ユタ大学			