

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17843

研究課題名（和文）単球系細胞の小胞体ストレスによる貪食能低下に対し鎮静薬投与は保護的に作用するのか

研究課題名（英文）Does sedative administration have a protective effect against monocytic cell phagocytic dysfunction caused by endoplasmic reticulum stress?

研究代表者

飯田 淳（IIIDA, JUN）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：20515283

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：麻酔薬によって敗血症状態での単球系細胞の小胞体ストレスを軽減する効果を示すことはできなかった。単球系細胞の機能低下は小胞体ストレスに誘導されたアポトーシスに由来することから小胞体ストレスとglucose response geneについて探求することを目指した。glucose response geneであるTXNIPが小胞体ストレスと関連があることが分かっており、細胞膜上に存在しTXNIPと最も高い配列相同性があるARRDC4に着目した。これまでにARRDC4とGLUT1のタンパク相互作用が阻害されれば、ARRDC4の上昇に伴う小胞体ストレスの上昇が軽減する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

単球系細胞は自然免疫と獲得免疫をつなぐ重要な働きを担い炎症消退において大きな役割を果たしている。この働きについて近年分子細胞学的に明らかとなった アレスチンファミリーがどのように影響しているか、またそれを制御してゆくかについて明らかにしている。

研究成果の概要（英文）：The administration of anesthetic drugs did not demonstrate an effect in reducing endoplasmic reticulum stress in monocytic cells during sepsis. Monocytic cell dysfunction is associated with apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress, prompting further investigation into glucose response genes. TXNIP, a glucose response gene, has been found to be related to endoplasmic reticulum stress, and we focused on ARRDC4, which shares the highest sequence similarity with TXNIP and is primarily located on the cell membrane. Previous findings suggest that inhibiting protein interactions between ARRDC4 and GLUT1 may mitigate the increase in endoplasmic reticulum stress associated with ARRDC4 elevation.

研究分野：分子細胞学

キーワード：小胞体ストレス 単球 ARRDC4

## 1. 研究開始当初の背景

21 世紀に入って炎症研究の焦点は炎症の消退反応とそれを誘導する分子の関わりに注目されている。(炎症消退に関わる脂質メディエーター 佐和貞治 日本集中治療医学誌 2010; 17:269-78.) 従来、受動的な反応としてとらえられてきた炎症の消退反応は、生命現象においてプログラムされた能動的な過程である事が分かってきた。これらの原点となる研究は 1984 年の Serhan らによる好中球で産生される 6 脂肪酸であるアラキドン酸由来の生理活性物質リポキシンの発見に遡る。21 世紀に入り、疾患の治癒期、回復期を統合的に調整する消炎ネットワーク内で酵素的に 3 多価不飽和脂肪酸のドコサヘキサエン酸(DHA)やエイコサペンタエン酸 (EPA)などからレゾルビンやプロテクチン等の炎症消退に関わる強い生理活性を持つ脂質分子が産生されることが報告され、グレリンまたはアドレノメデュリン等の生理活性ペプチド等と共に炎症性疾患への応用が期待される。

敗血症患者における死亡率を規定する大きな要因として急性期の高サイトカイン血症が注目され、サイトカインを抑制する 30 以上もの種々の治療の有効性を調べる臨床研究が施行されたがその結果は、悲観的なものであった。近年、敗血症の死亡要因は免疫担当細胞の細胞死に伴う免疫抑制が原因とされる。さらに敗血症時に細胞死に伴い産出する HMGB-1 や HSP70 が、周囲の免疫担当細胞の異常な活性化を促し、その結果として臓器障害を引き起こす事が知られている。このような臓器へのストレスから変性タンパクが産生され小胞体ストレスを生じ、細胞は恒常性を保つことができなくなりアポトーシスが誘導されると考えられている。我々は LPS 投与下高糖濃度負荷により敗血症状態を模した環境で、小胞体ストレスによってアポトーシスが誘導され食欲能の低下をきたすことを THP-1(単球系培養細胞)またはヒト Monocyte/Macrophage 及びラットで確認した。またレゾルビン D2 を用いることで小胞体ストレスを軽減し食欲能低下を抑えることができることを示した。過去の報告には、鎮静薬は通常食欲能を低下させるがデクスメトミジンは投与により食欲作用を増強する作用が述べられており、敗血症時の鎮静薬の選択によって、免疫能を損なうことなく治療を行うことができるのか、小胞体ストレスの観点から検討を行う。

## 2. 研究の目的

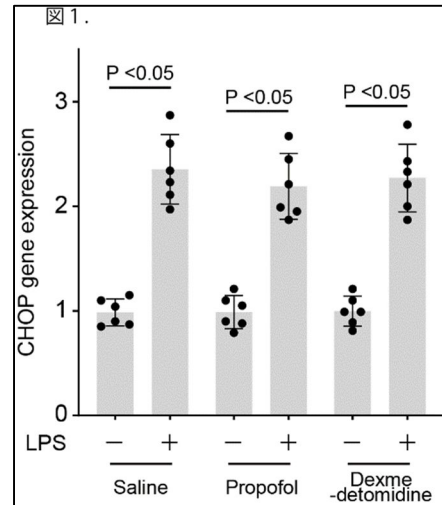
単球系は自然免疫と獲得免疫をつなぐ重要な働きを担い、炎症の消退に関わりが深い。麻酔領域では吸入麻酔薬による自然免疫の低下が解明されており、担癌患者では静脈麻酔が有利であるとの報告も存在する。今後は鎮静を行う際に病態に応じて薬剤を選択する必然性が生じることが予想され、重篤な疾患である敗血症治療に頻用される鎮静薬の選択は臨床上重要となる。個々の鎮静薬についての小胞体ストレスによる食欲能への修飾効果は評価されておらず、今回解明を行う。

## 3. 研究の方法

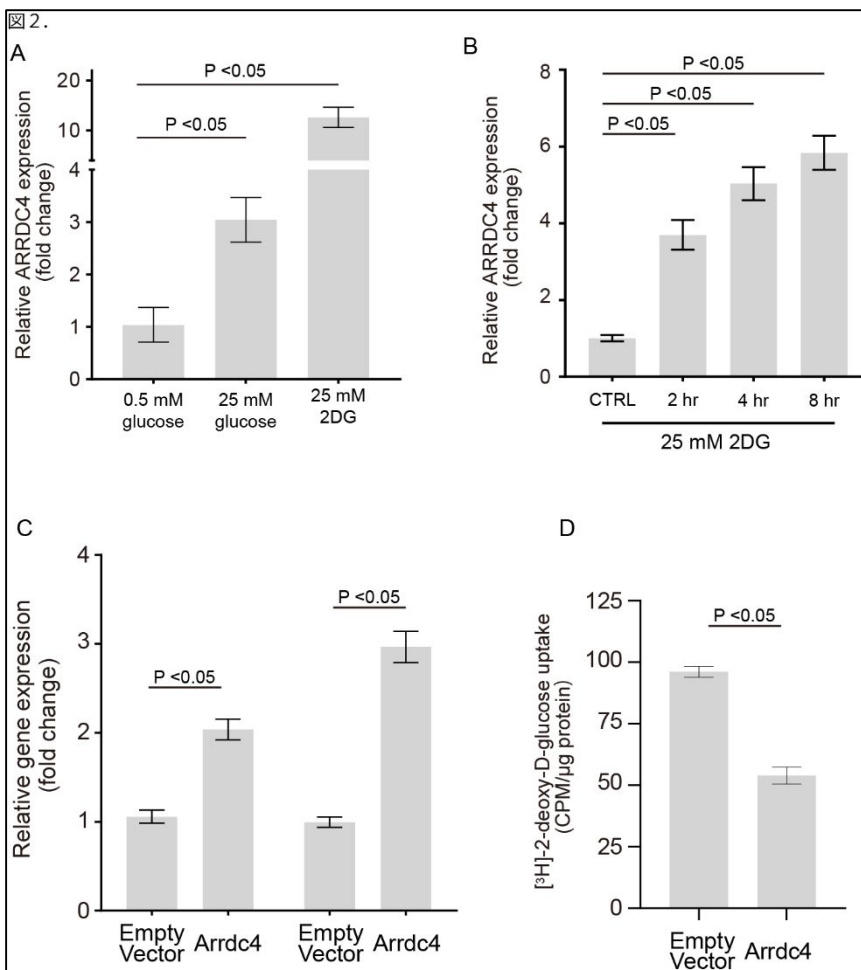
培養液を用いた細胞培養実験において、プロポフォル・デクスメトミジン・ミダゾラム投与群で、単球系 THP-1 細胞またはヒト Monocyte/Macrophage における LPS 投与後の小胞体ストレスの誘導と、小胞体ストレスが認められた場合の詳細な細胞内及び培養液のサイトカイン濃度、アポトーシスの発現、及びその上流の細胞内情報伝達系変化と、食欲能との関係を解析することを第一段階とする。そして、食欲能力に変化が認められた場合に、動物実験へと展開する。

#### 4. 研究成果

まず初めに、プロポフォル・デクスメドミジン投与群で、単球系 THP-1 細胞またはヒト Monocyte/Macrophage における LPS 投与後の小胞体ストレスの誘導を確認した。図 1 に THP-1 細胞における実験結果を示す。プロポフォル・デクスメドミジン投与は、LPS 誘導性の小胞体ストレスを有意に軽減しなかった。CHOP 以外の ATF4、ATF6 などの小胞体ストレス関連遺伝子についても同様であった。また、Monocyte/Macrophage においても同様の結果であった。これらの結果を踏まえて、我々のこれまでの研究 - 敗血症では高血糖状態が認められ、誘導された小胞体ストレスによってアポトーシスが誘導され貪食能の低下をきたすこと - に立ち返り、glucose response gene と小胞体ストレスについて、探求することとなった。この 10 年間で、アレスチンと相同性を有し分子機能が類似すると考えられている、アレスチンファミリーが新たに発見され、その中でも Txnip が glucose response gene であり、小胞体ストレスと関連することが示されている。そこで我々は、研究協力者とともに、TXNIP と最も高い配列相同性があり主に細胞膜上に存在する ARRDC4 もその働きを share している可能性を考え、研究を行った。



THP-1 細胞においては、ARRDC4 は glucose 刺激に対して Dose/Time dependent に発現の上昇が見られることを qPCR で確認した。(図 2 A、B) また、それは、細胞内グルコースセンサーである MondoA (basic helix-loop-helix 型転写因子) による調節であることが判明した(データ



未公表)。興味深いことに、プラスミドを用いて 293 細胞系に ARRDC4 を強発現させると、小胞体ストレスが誘導された。(図 2 C)これは、Arrdc4 が GLUT1 と相互作用し、細胞への糖取り込みを減少させることに関連する可能性が考えられた。(図 2 D)

これらのことから、我々は ARRDC4 と GLUT1 のタンパク相互作用が阻害されれば、ARRDC4 の上昇に伴う小胞体ストレスの上昇が軽減する可能性を考えた。

まず、ARRDC4 と

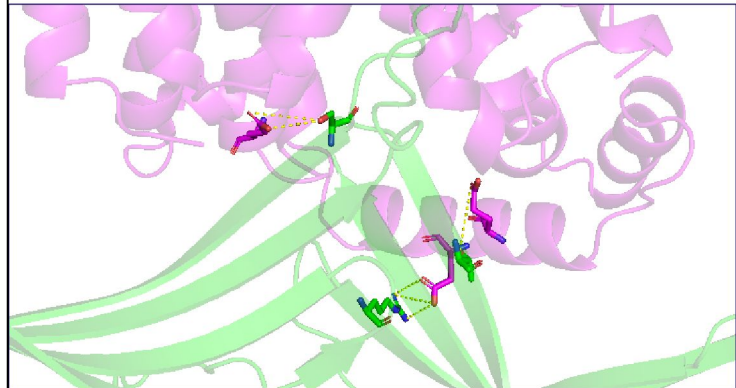
GLUT1 の相互作用部位の解析は、GLUT1 (PDB ID: 4PYP) と ARRDC4 (AlphaFold Protein Structure Database: Q8NCT1) の分子ドッキングシミュレーション HDOCK サーバーを用いて行った。

その結果、3つの部位が相互作用部位として候補に挙げられた。そして、研究協力者が行った静的解析の結果と統合して、

ARRDC4 の6か所をアラニン置換した変異体が GLUT1 との相互作用が消失する ARRDC4 変異体として候補となった。

研究協力者とともに、現在、アラニン置換をした ARRDC4 変異体で小胞体ストレスの誘導が消失するか否かを確認中である。

図3.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------