

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：33920

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20999

研究課題名(和文) Regulation of inflammatory response by autonomic nervous system in macrophages

研究課題名(英文) Suppression of LPS-induced TNF alpha production in macrophages by catecholamines is mediated through the beta2-adrenergic receptor

研究代表者

馮 国剛 (FENG, GUOGANG)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：70351111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：RAW264.7細胞においてアドレナリン(Ad)などのカテコラミンはLPSによって誘導されたTNF $\alpha$ の発現を抑制した。RAW264.7細胞において $\beta_2$ などのAd受容体サブタイプのmRNA発現を同定できた。PropranololとICI118.551(選択的な $\beta_2$ 受容体拮抗剤)の前処理はLPSによる誘導したTNF $\alpha$ 発現増加に対するこれらのカテコラミンの抑制作用を減少させた。これに対してIsoproterenolとfenoterolはアドレナリンと同様に、LPSによる誘導したTNF $\alpha$ 発現増加を抑制した。さらにRAW264.7細胞においてLPSは $\beta_2$ 受容体の発現を時間依存的に抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マクロファージであるRAW264.7細胞においてカテコラミンは $\beta_2$ 受容体の活性化を介してLPSによる誘導された炎症反応を制御することを解明でき、敗血症発生機序の解明や新しい治療法の開発には新たな手がかりが得られた。

研究成果の概要(英文)：Catecholamines such as adrenaline (Ad) suppressed the expression of TNF $\alpha$  induced by LPS in RAW264.7 cells. We had identified the mRNA expression of Ad receptor subtypes such as  $\beta_2$  in RAW264.7 cells. Pretreatment with propranolol and ICI118.551 (a selective  $\beta_2$  receptor antagonist) attenuated the inhibitory effects of these catecholamines on LPS-induced increase of TNF $\alpha$  expression. In contrast, isoproterenol and fenoterol, like adrenaline, suppressed LPS-induced increase of TNF $\alpha$  expression. Furthermore, LPS suppressed the expression of  $\beta_2$  receptors in RAW264.7 cells in a time-dependent manner.

研究分野：救急医学

キーワード：LPS 炎症反応 TNF $\alpha$  カテコラミン  $\beta_2$ 受容体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

敗血症は感染症によって生じる全身の炎症反応であり、40～60%は30日以内に死亡し、集中治療領域で非常に重要な位置を占める病態である。近年、自律神経系は炎症性サイトカインの発現を抑制し、敗血症の病態生理を制御することが報告されてきたが、不明なところが多いである。本研究では我々はマウスのマクロファージである RAW264.7 細胞を用いて細菌の細胞壁多糖である Lipopolysaccharides(LPS)によって誘導された TNF 発現に対するカテコラミンの影響を調べ、その作用に関与する受容体を同定した。

### 2. 研究の目的

#### (1) マクロファージ細胞において LPS の炎症反応誘導作用を解析する

RAW264.7 細胞に LPS を投与し、TNF など炎症性サイトカインの発現を経時的に調べ、炎症反応の誘導作用を解析する。

#### (2) マクロファージ細胞において LPS によって誘導された炎症反応に対して自律神経系伝達物質は影響を解明する

RAW264.7 細胞にアドレナリン (AD)、ノルアドレナリン (NAD)、ドパミン (DOA) 及び acetylcholine (ACh) の投与は LPS によって誘導された TNF の発現変化に対する影響を調べ、LPS によって誘導された炎症反応に対する自律神経系伝達物質の制御作用を解明する。

#### (3) アドレナリンによって制御された炎症反応に関わる受容体を検討する

マクロファージ細胞において自律神経系伝達物質受容体発現を同定する

RT-PCR や western blot 法を用いて、培養した RAW264.7 細胞に adrenaline 受容体サブタイプの発現を同定する。

アドレナリン受容体の阻害薬を用いて前処置した RAW264.7 細胞に adrenaline などのカテコラミンを投与し、LPS によって誘導された炎症反応に対する影響を調べ、LPS による誘導した炎症反応の制御に関わるアドレナリン受容体のサブタイプを検討する。さらに、同定した受容体の作動薬を用いてその作用を再確認する。

### 3. 研究の方法

#### (1) RAW264.7 細胞において LPS による TNF 発現の誘導

LPS を添加し、1～12 時間培養したマウスのマクロファージである RAW264.7 細胞から mRNA と蛋白質を抽出した。TaqMan Gene Expression assays for TNF (ID Mm|\_00443258\_m1, Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific)を用いて、real-time PCR(qPCR)によって TNF mRNA の発現を確認した。さらに抗 TNF 抗体 (Cell Signaling Technology, Inc.) を用いてウエスタンブロッティング (WB) によって蛋白質の発現も検討した。

#### (2) LPS による誘導された TNF 発現に対してカテコラミンの影響

RAW264.7 細胞に LPS の投与と同時にアドレナリン (AD)、ノルアドレナリン (NAD) あるいはドパミン (DOA) を添加し、2h 培養した。細胞から mRNA と蛋白質を抽出し、qPCR と WB を用いて TNF の mRNA と protein の発現を調べた。

#### (3) RAW264.7 細胞においてアドレナリン受容体サブタイプ発現の同定

アドレナリンは LPS によって誘導された TNF 発現を制御する機序を検討するため、まず TaqMan Gene Expression assays for 1a ID:Mm\_00442668\_m1; 1b ID:Mm\_00431685\_m1; 1d ID:Mm\_01328600\_m1; 2a ID:Mm\_00845383\_s1; 2b ID:Mm\_00477390\_s1; 2c

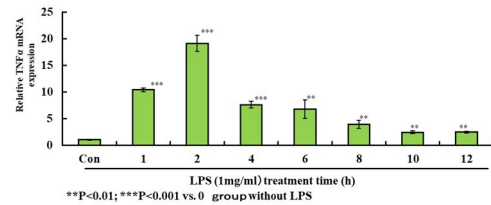
ID:Mm\_00431686\_s1; 1 ID:Mm\_00431701\_s1; or 2 ID:Mm\_02524224\_s1; 3  
 ID:Mm\_02601819\_g1 を用いて、細胞においてアドレナリンサブタイプの発現を同定した。

(4) カテコラミンによって制御される LPS の TNF 発現誘導作用に関わる受容体の解析

RAW264.7 に LPS やカテコラミンを投与する 1 時間前に各種のアドレナリン受容体阻害剤である phentolamine ( 受容体遮断薬 ) propranolol ( 受容体遮断薬 )、metoprolol ( 1 受容体遮断薬 ) あるいは IC1118.551 ( 2 受容体拮抗剤 ) を前処理したことによって LPS による誘導した TNF の発現に対する影響を解析した。さらに LPS の投与と同時に metaraminol ( 受容体作動薬 ) isoproterenol ( 受容体作動薬 ) fenoterol ( 2 受容体作動薬 ) を添加したことによって LPS による誘導した TNF 発現に対する影響を調べ、カテコラミンによって制御される LPS の TNF 発現誘導作用に関わる受容体を再確認した。(5) アドレナリン 2 受容体の発現に対して LPS の影響 TaqMan Gene Expression assays for TNF と抗 TNF 抗体を用いて、qPCR と WB 法を行い、2 受容体の発現に対して LPS の影響を経時的に解析した。4 . 研究成果

(1) RAW264.7 細胞において TNF 発現に対する LPS の影響

RAW264.7 細胞において LPS は時間依存的に TNF 発現を有意に増加させました。LPS 投与 2 時間後に TNF mRNA の増加は最大になったことに対して、タンパク質は 6 時間後に最大になった。

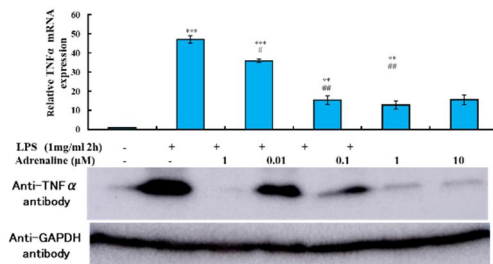


(2) LPS によって誘導された TNF 発現に対するカテコラミンの影響

LPS と同時にアドレナリン(AD)を投与し、2 時間を培養した RAW264.7 細胞においてアドレナリンは濃度依存的に LPS によって誘導された TNF 発現を mRNA とタンパク質のレベルに抑制した。アドレナリンの作用と同様にノルアドレナリン(NAD)あるいはドパミン(DOA)も濃度依存的に LPS によって誘導された TNF 発現を抑制した。以上の実験結果からは RAW264.7 細胞において LPS は時間依存的に TNF 発現を誘導した。これに対してカテコラミンは濃度依存的に

LPS によって誘導された TNF 発現を抑制した。

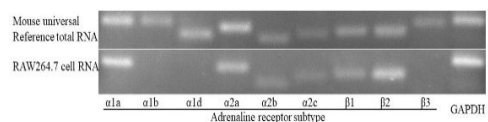
Acetylcholine の投与は LPS によって誘導された TNF 発現に対する影響は認められなかった。



(3) RAW264.7 細胞においてアドレナリン受容体サブタイプの発現

RAW264.7 細胞においてアドレナリンの 2 受容体をはじめ、1a、2a、2b、2c、1 などの多くサブタイプ受容体 mRNA の発現を同定できたが、1b、1d と 3 受容体の発現が認められなかった。特に 1a と 2 サブタイプ受容体は他の受容体より多

く発現されていることから重要な役割を果たしていることが示唆された。



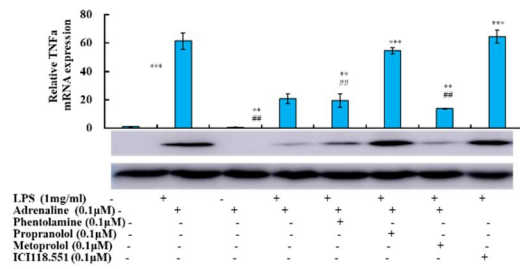
(4) LPS によって誘導された TNF 発現に対するアドレナリン受容体遮断薬の影響

非選択的 受容体拮抗薬である

propranolol と選択的 2 受容体拮抗剤で

ある ICI118.551 の前処理は LPS によって誘導された TNF 発現に対するアドレナリンの抑制作用を有意にブロックしたことに  
 対して、非選択的 受容体拮抗薬である phentolamine と選択的 1 受容体拮抗薬である metoprolol の影響を認められな  
 かった。LPS と同時にノルアドレナリンあるいはドパミンを投与した細胞においても上記

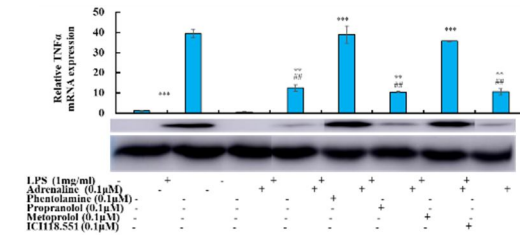
した薬剤の前処理は同様の実験結果を得られた。



(5) LPS によって誘導された TNF 発現に対するアドレナリン受容体作動薬の影響

RAW264.7 細胞において LPS 投与と同時に、非選択的 受容体作動薬である isoproterenol や選択的 2 受容体作動薬である fenoterol の添加は LPS によって誘導された TNF の発現を mRNA とタンパク質のレベルに抑制し、アドレナリンと同様な作用を得られた。これに対して、非選択的

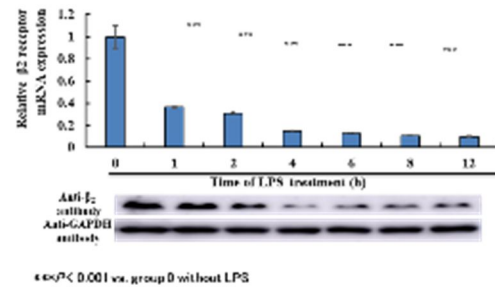
受容体作動薬である metaraminol の影響は認められなかった。



(6) アドレナリン 2 受容体の発現に対して LPS の影響

RAW264.7 細胞において LPS の投与は観察した 12 時間までに持続的に 2 受容体の発現を mRNA とタンパク質のレベルに抑制した。

以上の研究結果からは RAW264.7 細胞においてカテコラミンはアドレナリン 2 受容体の活化を介して LPS による誘導された TNF



の発現を抑制することを示唆された。敗血症発生機序の解析や新しい治療法の開発には新たな手掛かりが得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 馮 国剛、石原 亮太、藤田 義人
2. 発表標題 ブピバカインによるT型カルシウムチャネルCa <sub>v</sub> 3.1の発現を抑制し、神経細胞死を誘導する
3. 学会等名 第69回麻酔学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 馮 国剛、石原 亮太、梶浦 貴裕、奥田 尚未、伊藤 洋、藤田 義人
2. 発表標題 マクロファージにおいてカテコラミンはアドレナリン 2受体を介してLPSによって誘導されたTNF 発現を抑制する
3. 学会等名 日本麻酔科学会 第70回学術集会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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