

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 6 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791752

研究課題名（和文）敗血症病態における高血糖による単球系細胞の貪食能低下及び細胞死変化とその細胞内情報伝達系の解明

研究課題名（英文）Effect of lipopolysaccharide and hyperglycemia on monocytic cell phagocytosis and cell death and its associated intracellular pathway.

研究代表者

中山 力恒（NAKAYAMA YOSHINOBU）

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：90568198

研究成果の概要（和文）：LPS を用いた単球系細胞敗血症モデルにおいて、高糖培養液下ではアポトーシスの促進および炎症性サイトカインの抑制が認められ、また貪食能の低下を認めた。そのメカニズムとして今回、小胞体ストレスおよび Akt のリン酸化の関与が示唆された。また、炎症消退脂質として知られるレゾルビン D2 を投与することによってアポトーシスの抑制、貪食能の改善を認め、今後の敗血症時の治療法として応用できる可能性があると考ええる。

研究成果の概要（英文）：To make a *in vitro* model of septic condition, monocytic cells were exposed with lipopolysaccharide and hyperglycemia, which induced apoptosis, inhibited secretion of proinflammatory cytokine, and phagocytosis. Our results suggest that ER stress and Akt phosphorylation are primary involved as the upstream modulator. Furthermore, Resolvin D2, known as a lipid mediator in resolution of inflammation, suppressed apoptosis and improved phagocytosis, which results indicate that Resolvin D2 have the potential lipid mediator for treating sepsis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,300,000 円	690,000 円	2,990,000 円
2011 年度	800,000 円	240,000 円	1,040,000 円
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000 円	930,000 円	4,030,000 円

研究分野：集中治療医学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：敗血症、高血糖、単球系細胞、炎症消退脂質

1. 研究開始当初の背景

重症敗血症患者ではインスリン抵抗性の増大などによるストレス性高血糖状態を引き起こす。高血糖は患者の重症度を反映し、感染などの合併症を引き起こすとともに生命予後の決定因子の 1 つと考えられている。1995 年に Malmberg K らが報告した DIGAMI study (J Am Coll Cardiol1995; 26: 57-65) では AMI 患者に対し 126-

196mg/dl の範囲に血糖管理した群が従来の血糖管理と比較し 1 年死亡率が有意に低下し (P=0.027)、2001 年に Van den Bergher らが報告した Luven I study (N Engl J Med 2001; 345: 1359-67) では外科系 ICU 患者において 70-110mg/dl に血糖管理を行う強化インスリン療法 (IIT) によって ICU および院内死亡率が有意に低下し (P<0.04)、その有効性が報告された。しかし、その後報告

された VISEP trial (N Engl J Med 2008 ; 358 : 125-39)、Glucontrol study (Intensive Care Med 2009 ; 35 : 1738-48)、NICE-SUGAR study (N Engl J Med 2009 ; 360 : 1283-97)といった多施設 RCT では IIT によって低血糖が有意に増加し、死亡率が上昇すると示唆された。これらの相反する結果は、血糖管理に関する別の要素が死亡率を規定する可能性を示唆している。2006 年の江木らの報告では ICU の重症患者の血糖値変動と予後に関する研究では ICU 死亡者と生存者と比較して変動が有意に大きく (P<0.001)、血糖値変動が死亡率に影響を及ぼすとされている (Anesthesiology 2006 ; 105 : 244-52)。

このように血糖値が重症患者において死亡率と密接に関係していると考えられるが、そのメカニズムとしてこれまで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数々の治療の有効性を調べる臨床研究が行われてきたが、その結果は悲観的なものであった。

近年、敗血症患者において免疫抑制状態になることが予後悪化に繋がる可能性があるといわれてきた。単球系細胞は重要な免疫担当細胞の 1 種であるが、単球系細胞の細胞死や食食能の低下は死細胞クリアランスの低下を招き、炎症の持続や予後悪化を引き起こすと考えられる。また、新しい細胞死の概念として、オートファジーが注目されており、細胞へのストレス、ダメージによって細胞死もしくは細胞保護へと進んでいくとされている。その方向性はストレス、ダメージの程度によって様々で、その細胞内伝達系におけるメカニズムについての報告はまだ少ない。

今回我々は、細胞内情報伝達系を解明するに当たり、小胞体ストレスおよび PI3K-AKT 経路に着目した。

細胞がタンパク質分泌機能を正常に保つためには、タンパク質を正常に折りたたみ、また異常に折りたたまれたタンパク質は除去しなければならないが、この機能を有しているのが小胞体である。異常に折りたたまれたタンパク質や過剰なタンパク質が蓄積され、小胞体ストレスと呼ばれる状態になると、小胞体ストレス応答(UPR)というタンパク質の恒常性を維持する機構が働き細胞生存へと機能するが、そのバランスが崩れるとアポトーシスが促進される。これまで小胞体ストレスと神経性疾患、糖尿病、癌などの疾患の関係は多く報告されているが、敗血症時の高血糖状態における小胞体ストレスの変化は知られていない。

PI3K-AKT 経路は膜リン脂質の働きを介し、細胞増殖と細胞死を制御する重要な役割を担っている。敗血症病態における免疫能低

下に関与していると推測されており、過剰に AKT をリンパ球に発現させたところ、アポトーシスを抑制したという報告もあり (J Immunol 2004 ; 172 : 7583-91)、更なるメカニズムの解明が求められている

2. 研究の目的

糖濃度の異なる培養液を用いて培養し、単球系培養細胞 THP-1 細胞およびヒト Monocyte/Macrophage における LPS 投与後のサイトカインおよびアポトーシス、オートファジーの発現と細胞内情報伝達系の変化およびそれらの関係などへの糖濃度による影響を観察する。

RNAi 法を用いて、アポトーシスおよびオートファジーを制御する遺伝子をターゲットとした遺伝子抑制を THP-1 細胞もしくはヒト Monocyte/Macrophage に行い、それぞれの変化を観察することで、将来に繋がる遺伝子治療への応用を考える。

3. 研究の方法

5.5mM(normal glucose NG 群)、15mM (high glucose HG 群) グルコースの糖濃度の培養液および浸透圧コントロールとして 5.5mM グルコース培養液に 9.5mM マンニトールを加えた培養液を用い、72 時間培養を行う。LPS 負荷および糖濃度による細胞内サイトカイン、アポトーシス、オートファジー発現、細胞内情報伝達系として小胞体ストレスおよび Akt のリン酸化 (p308) の変化を観察し、それぞれの糖濃度による変化を比較検討した。

ヒトマクロファージの分離は、健常成人より静脈血を採血し、Histopaque1077 を用いた比重による分離を行った。プロトコールに従い、分離された単球細胞の層を取り出し、PBS(-)にて洗浄後、自己血清の入った培養液にて培養した。2 時間後、浮遊細胞を取り除き、M-CSF を加えた培養液に交換後 7 日間培養し、それぞれの実験を行った。

(1) アポトーシス：フローサイトメトリー法を用い、ミトコンドリア膜電位、Caspase9、Caspase3、PI の変化を観察した。

(2) サイトカイン：培養液上清を採取し、ELISA 法もしくはフローサイトメトリー法 (Flowcytomix Pro : Bender Medsystems) を用いて測定した。

(3) 食食能の変化：Vybrant Phagocytosis Assay kit を用いて測定した。200nM の Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) を 2 日間負荷してマクロファージ様細胞に変化させた THP-1 細胞、およびヒトマクロファージ細胞に、蛍光標識された大腸菌の Particle を蛍光プレートリーダーで測定し、食食能の変化を観察した。

(4) 細胞内情報伝達系として、炎症時に発現が増加するといわれている小胞体ストレス (CHOP) の発現の変化を Real-Time PCR (7300

Applied Biosystems を使用)および Western blot 法を用いて測定した。

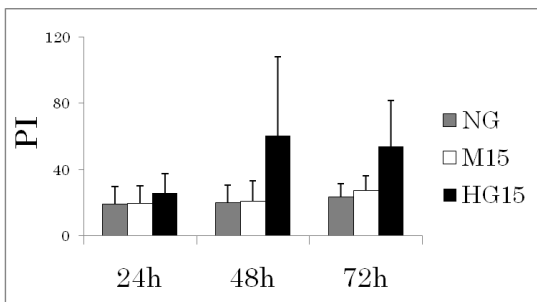
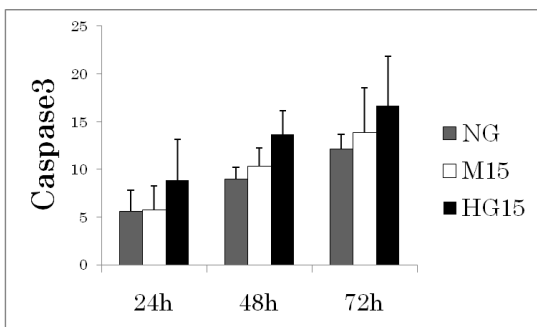
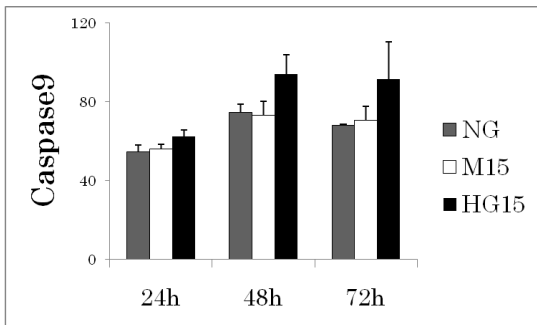
(5) 細胞保護に働くとされる Akt のリン酸化の変化についてフローサイトメトリー法を用いて測定した。

(6) 炎症消退脂質として注目されている、レゾルビン D2 を HG 群に投与することによって、アポトーシスや食食能および細胞内情報伝達系の変化がどのように影響されるかについても検討した。

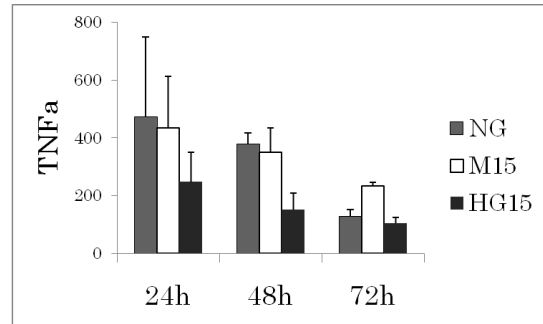
(7) siRNA は Amaxa siRNA Nucleofection Program に従い、THP-1 細胞およびヒトマクロファージに対し、CHOP、Akt および Negative control (NC) の siRNA 導入を行った。導入後 24 時間、37 度の CO2 インキュベーターにて培養後に細胞を回収し、ノックダウンの効果を Real-Time PCR により、mRNA レベルの定量評価を行い、遺伝子発現が抑制されていることを確認した後、アポトーシスおよび食食能の変化を観察した。

4. 研究成果

(1) アポトーシス：ミトコンドリア膜電位は 72h において HG 群が NG 群に比べ有意に低下し、Caspase9、3 は 48 および 72h、PI は 72h において HG 群で有意に上昇し、HG 群においてアポトーシスが有意に生じた。

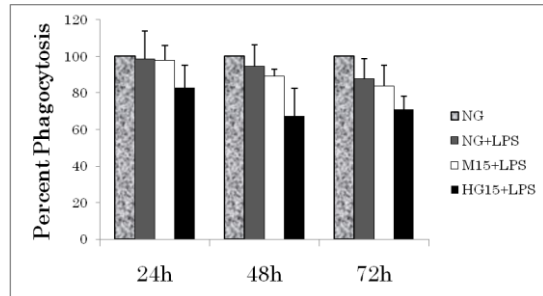


②サイトカイン：細胞培養液上清中の TNFa は 24、48h において有意に HG 群において減少し、IL6、IL1b においても同様の傾向があった。HG 群において炎症性サイトカインの上昇抑制傾向が認められた。

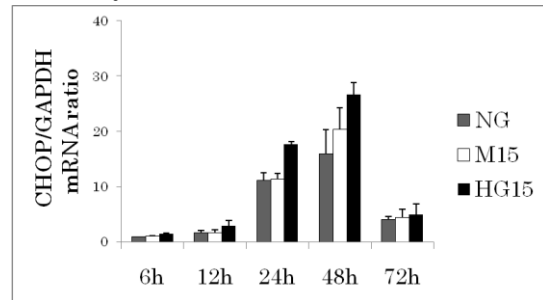


③食食能：HG 群で有意に食食能が抑制された。

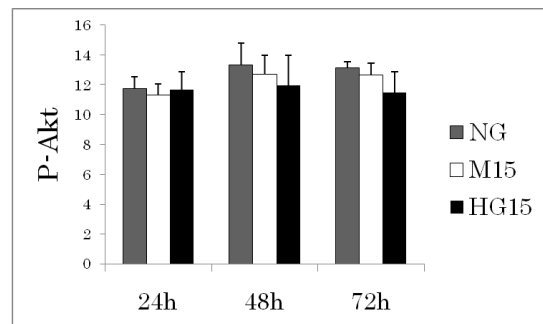
④小胞体ストレス：mRNA レベルでは CHOP の



発現が 24h、48h において HG 群で有意に抑制された。蛋白レベルでは有意ではないが、48h において HG 群で CHOP の発現が増加する傾向があった。

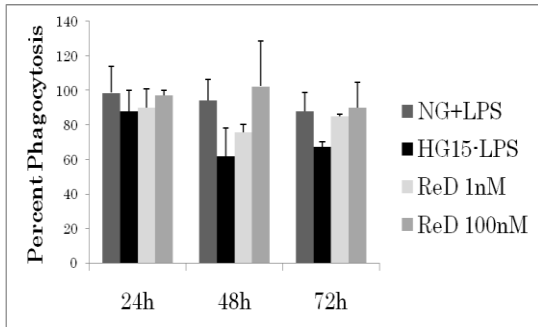


⑤Akt リン酸化：72h で HG 群において Akt リン酸化(p308)が抑制された。



⑥レゾルビン D2 投与により、Caspase9 およ

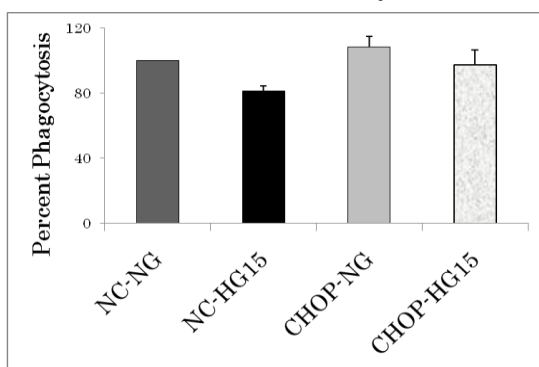
びPIのHG群での上昇抑制効果を求めた。また、食食能に関しても、48h、72hにおいてHG群での食食能低下に対し抑制効果を求めた。



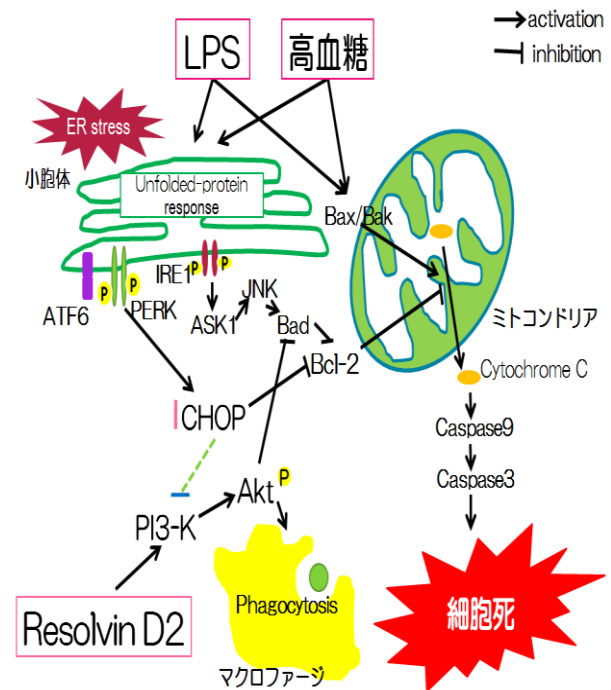
レゾルビン D2 投与により、CHOP の発現上昇を抑制する傾向を認め、Akt リン酸化に関しても HG によるリン酸化抑制を改善する傾向を認めた。

⑦CHOP の siRNA により、Caspase9、Caspase3、PI はいずれも抑制され、食食能に関しては HG による食食能低下の改善を認めた。Akt の siRNA により、NG 群、HG 群共に食食能は低下し、Negative control 時の HG による食食能低下は有意に認めなかった。また、レゾルビンによる食食能の改善効果は低下したものの、食食増加傾向は認められた。

以上より、LPS を用いた単球系細胞敗血症モデルにおいて、高糖培養液下ではアポトーシスが促進され、炎症性サイトカインの抑制が認められ、また食食能の低下を認めた。高糖環境下ではこのように細胞死が促進される一方、炎症性サイトカインが十分に放出されないことで、免疫細胞の活性化が抑制され、免疫細胞の遊走や活性が抑制される可能性がある。また食食能の低下から、死細胞のクリアランスが低下し、さらなる炎症の遷延に繋がると考えられる。また、そのメカニズムとして今回、小胞体ストレスおよび Akt のリン酸化に着目した。高糖環境下において小胞体ストレスのうち、炎症を促進するとされる CHOP の発現の増加を認め、Akt に関してもリン酸化の有意な抑制を認めた。siRNA によってこれらアポトーシスの抑制や食食への影響を観察でき、今後の遺伝子治療への可能性が示唆された。また、炎症消退脂質として注目されている、レゾルビン D2 を投与することによってアポトーシスの抑制、食食能の改善を認めたことから、今後敗血症時の治療法として応用できる可能性がある。レゾルビン



D2 の食食能改善へのメカニズムにおいては今回 Akt のリン酸化が関与することがわかったが、Akt の siRNA を行ったにもかかわらず、食食能の改善が維持されていたことから、Akt のリン酸化以外のメカニズムが組み合わ



さっている可能性が示唆され、今後更なる細胞内情報伝達の解明が期待される。

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 2 件)

1. 中山力恒 中嶋康文 他
心膜横洞の限局性血腫による血行動態の悪化を経食道心エコーにて診断し得た 1 症例
日本心臓血管麻酔学会誌 2011, 15: P195-198

2. 竹下淳、中嶋康文、中山力恒 他
人工心肺離脱時の僧帽弁前尖収縮期前方運動 (SAM) にたいし異なった治療を施行した 2 症例
日本心臓血管麻酔学会誌 2011, 15: P199-202

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 石井祥代、中嶋康文、中山力恒 他
敗血症病態における単球系細胞死と炎症消退脂質による細胞死抑制機序の解明、日本麻酔科学会第 58 回学術集会、2011 年 5 月 20 日、神戸

2. 村瀬百子、中嶋康文、中山力恒 他 人工心肺手術周術期の血小板機能低下に関連する細胞内情報伝達系の経時的変化 日本心臓血管麻酔学会 2011年10月8日、旭川

3. 中山力恒他 巨大左心房粘液腫により、重症僧帽弁狭窄を呈し緊急腫瘍切除手術となった1症例 日本心臓血管麻酔学会 2011年10月8日、旭川

〔図書〕(計1件)

翻訳 溝部俊樹、中嶋康文、中山力恒他 周術期経食道心エコー図 真興交易医書出版部, 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 力恒 (NAKAYAMA YOSHINOBU)
京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医
研究者番号：90568198

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：