

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 1日現在

機関番号：24303  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23792079  
 研究課題名（和文）単球系細胞の PPAR $\gamma$  活性化による敗血症病態の解明と治療法の開発  
 研究課題名（英文）Investigation concerning the pathogenesis of septic condition, and development of new therapy by PPAR $\gamma$  activation in monocytic cells.  
 研究代表者  
 深澤 まどか（FUKAZAWA MADOKA）  
 京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医  
 研究者番号：30530357

研究成果の概要（和文）：健康被験者より単球を採取し、マクロファージに分化後、LPS を投与し糖濃度の異なる培養液で 72 時間培養を行った。高糖環境下においてマクロファージの小胞体ストレス系が活性化することで、食食能が低下し細胞死が亢進した。また、グレリンを投与することでこれらの現象が抑制されたが、その作用に PPAR $\gamma$  を介する経路が関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We obtained macrophage from healthy volunteers. After the differentiation into macrophage, they were cultured in different glucose concentrations of cell culture liquid for 72 hours after lipopolysaccharide administration. High glucose conditions reduced phagocytic ability and exaggerated cell death in macrophage by the activation of endoplasmic reticulum stress. Ghrelin administration reversed these effects through peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR $\gamma$ ) activation.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：遺伝子治療、敗血症

## 1. 研究開始当初の背景

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。一方で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。このようなことから、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や、炎症部位における死細胞のクリアランス低下等が原因とされる。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報告が増えつつある。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 $\omega$ 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。

グレリンは1999年にラットおよびヒトの胃に存在するオーファン受容体GHS-R(growth hormone secretagogue receptor: 成長ホルモン放出促進因子受容体)の内因性リガンドとして発見されたペプチドである。グレリンは、下垂体からの成長ホルモン分泌促進だけでなく摂食亢進、エネルギー代謝、抗炎症、抗アポトーシス、交感神経抑制、心血管保護など多彩な生体調節機能を有していることが解明され、臨床応用が期待される。最近グレリン投与により、敗血症動物モデルにおいて予後が改善する研究が報告された。(J Immunol 2008, 180: 8369-77) 我々は、特にグレリンのPPAR $\gamma$ 増強作用を介した細胞死抑制効果に注目している。(PLOSone 2009, 4(11):e7728) 核内レセプターファミリーの一員であるPPAR $\gamma$ は主として脂肪細胞やマクロファージに発現し、そのアゴニストであるチアゾリジン誘導体は2型糖尿病薬として広く用いられている。PPAR $\gamma$ アゴニストに抗炎症、抗サイトカイン作用があることは周知であるが、細胞死を促進するか抑制するかは報告により異なる。これらの原因はPPAR $\gamma$ アゴニストの使用濃度と使用細胞腫の違いに原因があると考えている。(J Cell Physiol 2009, 220:58-71)

また、新しい細胞死の概念として提唱

されているオートファジーがアポトーシスと密にクロストークすることが知られているが、オートファジーが細胞保護に働くのか、細胞死に働くのかはストレスの種類と強弱等によるとされる。栄養損失の際、プロサバイバルメカニズムとしてオートファジーは機能する。しかし過剰なオートファジーは、形態的にはアポトーシスと区別されるオートファジー様細胞死へと至るとされているが、双方の形態の細胞死が同時に起こることもあり、また敗血症におけるオートファジー発現の役割は明らかでない。最新の報告によると、敗血症患者の筋生検において、生存患者の方が非生存患者に比べ有意にPPAR $\gamma$  coactivator1- $\alpha$  (Mitochondrial Autophagy 阻害物質)が高かった。(Am J Respir Crit Care Med. 2010 15;182:745-51) これは生存患者では細胞内で過度のオートファジー発現による細胞死が抑制されていることを意味する。

我々はTHP-1(単球系培養細胞)またはヒトMonocyte/Macrophageを用いた細胞培養実験において、PPAR $\gamma$ アゴニストのロジグリタゾン5 $\mu$ M投与によりLPSによる細胞死を抑制(Caspase3の発現低下、LC3 IIの発現軽度上昇)したが、25 $\mu$ M投与により逆に細胞死が促進された(Caspase3の発現上昇、LC3 IIの発現上昇)。また、グレリン投与によりPPAR $\gamma$ 活性が上昇し、細胞死が抑制された。これらは、PPAR $\gamma$ 活性の適度な上昇が炎症治癒期において単球・マクロファージ系を介して、免疫提示機能を賦活したり、細胞死を起こした細胞を貪食する事(Phagocytosis)で治癒過程を促進する可能性があると考えられる。

## 2. 研究の目的

細胞培養実験にて、THP-1, Monocyte/Macrophage における LPS 投与後のサイトカイン、アポトーシス、オートファジーの発現解析、及びその上流の細胞内情報伝達の関係と、PPAR $\gamma$  活性の関係を遺伝子ノックダウン手法を用いて解析すること。

(*In Vitro* 系) THP-1 細胞、ヒト Monocyte/Macrophage に LPS を投与後 72 時間培養した時の細胞死に関連する変化と、PPAR $\gamma$  アゴニスト、グレリンによる効果を解析する。

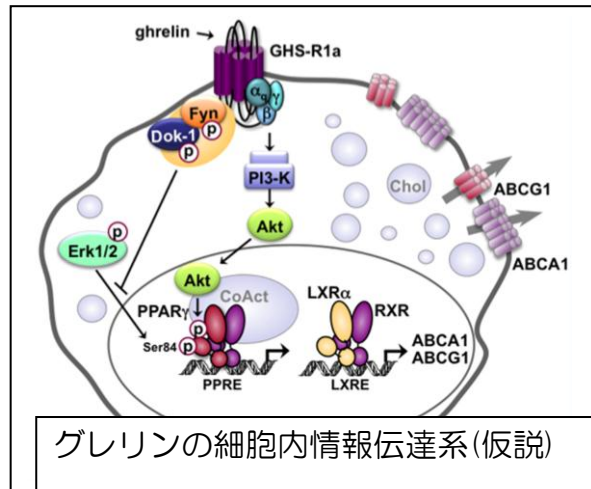
(*In Vitro* 系) PPAR $\gamma$  に対する siRNA を細胞に遺伝子導入することで、1. で観察した PPAR $\gamma$  アゴニスト、グレリンにおける細胞死抑制効果の変化を解析すること。

### 3. 研究の方法

細胞培養実験において、単球系 THP-1 培養細胞またはヒト Monocyte/Macrophage における LPS 投与後の細胞内及び培養液のサイトカイン、HMGB-1、HSP70 濃度、アポトーシス、オートファジーの発現、及びその上流の細胞内シグナル変化と細胞死の関係を明らかにし、PPAR $\gamma$  アゴニスト、グレリンによる効果を解析すること。

- 培養液内及び細胞内 IL1b, IL6, IL8, IL10, TNF $\alpha$ , HSP70, HMGB 1 濃度測定 (ELISA、フローサイトメトリー (FCM) 法)
- 細胞内 Akt, p38MAPK リン酸化/Total (比) 変化の定量 (WesternBlot 法、FCM 法)。
- 細胞内ミトコンドリア膜電位変化の定量 (JC-1 染色、FCM 法)
- 細胞内 Bcl-2 ファミリータンパク質の発現の変化 Bcl-x1, Bcl-2/Bax, Bak 発現比の解析 (Western Blotting 法、FCM 法)
- 細胞内カスパーゼ発現の変化 Caspase 3, 9 (FCM、WesternBlot 法、免疫染色法)
- 細胞内 LC3-2/1 比, Beclin1 発現の変化 (Western Blotting 法、免疫染色法)

- 細胞内 PI3K, mTOR activity (ELISA 法)、mTOR のリン酸化/Total (比) 変化定量 (Western Blotting 法)



- 細胞死の形態学的変化及び核染色 (ヘキスト 33342, PI) (光学顕微鏡、FCM 法)
- Phagocytosis Assay E. coli, S. aureus Alexa488-conjugated bioparticle を用いて、単位時間当たりの食能を見る。(FCM 法)

### 4. 研究成果

LPS 及び生理的な高糖濃度負荷により、単球系細胞内の Akt のリン酸化が抑制されることで、細胞死変化が促進されると共に、ファゴサイトーシスが抑制されたが、グレリン投与により細胞内 PPAR $\gamma$  活性が上昇し、その変化が抑制された。

次に、細胞内情報伝達系の PI3K/Akt 経路を抑制する目的で Akt1 に対する siRNA を単球系 THP-1 細胞、ヒト Monocyte/Macrophage に Nucleofection 法により遺伝子導入することで、先に観察したグレリンにおける細胞死抑制効果がどのように変化するかを観察した。実験結果として、Akt1、PPAR $\gamma$  をノックダウンすることでグレリンの効果が消失した。従って、グレリンは、PI3K/Akt 経路及びその下流にある PPAR $\gamma$  の発現

を介して細胞死抑制及びファゴサイトーシスを抑制していることが分かった。その詳細に関しては今後の研究課題である。これらの実験結果の一部は学術集会で報告したが、今後も、学術集会、研究会等で発表予定である。

#### 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0件)

[学会発表] (計1件) 敗血症病態の高糖環境におけるマクロファージ貪食能低下に寄与する細胞内情報伝達機序と炎症消退脂質による抑制効果 石井祥代, 中嶋康文, 飯田淳, 村瀬百子, 深澤まどか, 佐和貞治 日本麻酔科学会第60回学術集会 2013. 5. 23-25 札幌

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

#### 5. 研究組織

(1) 研究代表者

深澤まどか (FUKAZAWA MADOKA)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：30530357

(2) 研究分担者  
該当無し

(3) 連携研究者  
該当無し