

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462434

研究課題名(和文)ミダゾラムの樹状細胞に対する分子免疫学的作用メカニズムの解明

研究課題名(英文)The molecular mechanism of effects of midazolam on dendritic cells and immune response

研究代表者

大田 典之(Ohta, Noriyuki)

大阪大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60379162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：免疫細胞に対する代表的な鎮静薬であるベンゾジアゼピン系薬物の影響を解析する過程でヒトとマウスの細胞に対する影響を評価した。ヒトのマクロファージの細胞株であるTHP-1とマウスの単球マクロファージ細胞株であるRAW264を用いた解析を進めた。ベンゾジアゼピンの代表として水溶性の鎮静薬であるミダゾラムを用いた。ミダゾラムはLPSによってTHP-1、RAW264に生じる炎症性サイトカインの分泌と副刺激分子の発現が抑制された。ミダゾラムの作用分子であるGABA受容体ともう一つの作用分子であるTSPOの関与を解析した。TSPOの分子を欠損させた細胞株を作成してTSPOの関与を分子レベルで明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Benzodiazepine shows sedative effect that suppresses central nerve system via GABA receptor. On the other hand benzodiazepine has another functional molecule as translocator protein (TSPO). Benzodiazepine was reported that affects function of immune cells, but it is not uncertain about those of functional mechanism. We report that we found the mechanism of midazolam on immune cells. Using a murine macrophage cell line, RAW264 cells, we analyzed the effect of midazolam on the expression of CD80 and CD86 and the secretion of IL-6. Midazolam suppressed the expression of costimulatory molecules and IL-6. The activation of RAW264 was inhibited by TSPO ligand but not by GABA legends. Finally we analyzed the contribution of TSPO by analysis of using knockdown RAW264 cells by siRNA for TSPO. The effect of midazolam was inhibited by knockdown of TSPO. These results showed that midazolam has an inhibitory action of immune response on murine macrophages via TSPO.

研究分野：周術期管理医学

キーワード：樹状細胞 Translocator protein 免疫

### 1. 研究開始当初の背景

麻酔薬と免疫系との関係は古くからある研究分野であり、様々な形で麻酔薬が免疫系に与える影響は追求されてきた。従来行われてきた研究は試験管内での研究が多数を占めているために、麻酔薬の生体個体レベルへの影響は疑問視する意見も多かった。申請者らは近年、麻酔薬と免疫系の関係を樹状細胞という細胞の観点から見直して研究してきた。特にミダゾラムの樹状細胞に対する影響に関しては非常に詳細な解析を行い、ミダゾラムが樹状細胞によって惹起される個体レベルの免疫応答に影響を与えること、さらにこの作用が末梢性ベンゾジアゼピン受容体への作用をかいしていることを示唆する結果を得た。しかしながらベンゾジアゼピン系薬物の中枢神経系への作用機序に関しては詳細に研究されてきたが、免疫細胞に対してどのように作用するのかは詳細には研究されておらず、中枢神経系と同様に GABA 受容体を介した作用が中心ではないかと考えられてきた。ベンゾジアゼピンの作用分子として TSPO(Translocator protein) (以前は末梢組織に存在するベンゾジアゼピンの受容体ということで末梢性ベンゾジアゼピン受容体と呼ばれた) が知られてきたが免疫細胞での作用メカニズムにおいてこの分子の関与を報告した研究は無かった。

### 2. 研究の目的

申請者らは近年、麻酔薬と免疫系の関係を樹状細胞という細胞の観点から見直して研究してきた。特にミダゾラムの樹状細胞に対する影響に関しては非常に詳細な解析を行い、ミダゾラムが樹状細胞によって惹起される個体レベルの免疫応答に影響を与えること、さらにこの作用が末梢性ベンゾジアゼピン受容体への作用をかいしていることを示唆する結果を得た。すなわち樹状細胞の LPS による成熟分化の抑制は GABA 受容体リガンドでは起こらないのに対して、末梢性ベンゾジアゼピン受容体リガンドを作用させると再現されることが今までの申請者らの研究で示されてきた

本研究では免疫細胞に対するミダゾラムの作用の検討を更に進めて、ミダゾラムの免疫細胞への作用メカニズムの解明を目指す。マクロファージ細胞株を用いて分子論的メカニズム解析を行うこととした。GABA 受容体と、末梢性ベンゾジアゼピン受容体(TSPO)に焦点を合わせどちらのメカニズムを介して作用するのかを解明することを目指した。また RNA 干渉法を用いて受容体分子ノックダウン細胞を作成し標的分子の関与を分子レベルで明らかにする手法を用いることとした。加えてマウスに限らず種を超えて人でも同じ事実が成立するのかを人のマクロファージ単球細胞株を用いて同様に解析する。人とマウスの同様の現象があるのかを同様の解析法を用いて探求する。

### 3. 研究の方法

A. マウスのマクロファージ細胞株である RAW264 を対象に用いる。RAW264 を LPS(リポ多糖)で刺激すると CD80, CD86 といった副刺激分子の発現が上昇する。さらにインターロイキン 6, 12(IL-6, IL-12)といった炎症性サイトカインの発現分泌も亢進する。まずここにベンゾジアゼピンの代表としてミダゾラムを添加する。ミダゾラムによって副刺激分子の発現の上昇が抑制されるのかを評価する。また IL-6, IL-12 といった炎症性サイトカインの発現増加が抑制されるのかを解析する。

B. 次に RAW264 の LPS の活性化過程における細胞内シグナル伝達で重要な役割を果たしている NF- $\kappa$ B の活性化の状況を確認する。この目的で NF- $\kappa$ B のプロモーター活性を測定する。NF- $\kappa$ B のプロモーターに発色色素の酵素をつけた遺伝子を RAW264 にトランスフェクションし発現するようにしたレポーター細胞をこの解析に用いる(RAW264-blue)。LPS を作用させると NF- $\kappa$ B のプロモーター酵素が転写されるため発色基質をくわえると発色しプロモーターの活性化が検出されるという検出系である。

まずこの系で RAW264 の活性化がおこるときに NF- $\kappa$ B の活性化のおこることを確認する。次にミダゾラムによる RAW264 の活性化の抑制過程に NF- $\kappa$ B の活性化がどのように関係しているのかを解析する。

C. 次にベンゾジアゼピンの作用する対象となる分子で、最もよく知られているのは GABA 受容体であり、中枢神経系への作用はこの GABA 受容体を介するものが中心である。免疫細胞で GABA 受容体を介する作用が主張されているが未だ議論の余地のあるところである。そこで GABA 関連のリガンドと末梢性ベンゾジアゼピン受容体(TSPO)関連のリガンドを RAW264 の活性化過程に作用させて、ミダゾラムと同様の効果をもたらすものを検索する。

GABA 関連リガンドとしてクロナゼパム、ピガバトリン、ムシモル、GABA、TSPO 関連リガンドとしてエチフォキサイン、FGIN1-27 を用いる。

これらを LPS の活性化過程にくわえて副刺激分子の発現上昇、炎症性サイトカイン(IL-6, IL-12)の発現上昇、の変化を解析する

D. ここまでで免疫細胞におけるベンゾジアゼピンの作用分子のひとつとして TSPO がクローズアップされてくるので、TSPO を念頭に置いてこれから後の解析を行う。

まず RAW264 に TSPO に対する siRNA をエレクトロポレーションによって導入する。TSPO に対する siRNA を導入した RAW264 から mRNA を抽出して cDNA を合成する。この cDNA を用いて定量的 PCR 法によって TSPO の mRNA の発現量を測定し siRNA を導入した RAW264 の TSPO

の発現が低減しているのかを確認する。TSP0の発現を低減させることのできた RAW264 細胞(TSP0 ノックダウン細胞：以下 KD と略)を用いて以下の実験をおこなう。さらにコントロールの siRNA を導入した実験群も作成する (control RAW264)

1. control RAW264 を LPS で刺激する
2. TSP0-KD RAW264 を LPS で刺激する
3. control RAW264 を LPS で刺激する。  
ミダゾラム添加
4. TSP0-KD RAW264 を LPS で刺激する。  
ミダゾラム添加

これらの実験群を作成し CD80, CD86 といった副刺激分子の発現、IL-6 の分泌で評価する

D. 最後にミダゾラムの免疫細胞に対する影響が動物個体レベルで検出できるのかを検討する。この目的でエンドトキシン投与による敗血症モデルを用いて評価を行う。マウスに1週間 4mg/kg のミダゾラムを腹腔内投与した後 20mg/kg の LPS を投与する。この LPS 投与による敗血症モデルで LPS 投与後の血清中の IL-6 の濃度を ELISA 法で測定し比較する

#### 4. 研究成果

A. RAW264 を LPS で刺激すると CD80, CD86 といった副刺激分子の発現は増加した。LPS に対して濃度依存性の増加を観察できた。さらに LPS で刺激すると培養液中の IL-6, IL-12 の発現も上昇した。

この系にミダゾラムを添加すると CD80, CD86 の発現増加は抑制された。さらに IL-6, IL-12 の発現も抑制された

またミダゾラムによって引き起こされる RAW264 に対する副刺激分子と炎症性サイトカインの発現抑制はどちらも容量依存性を示していた。

これらの事実からミダゾラムはマクロファージにおける LPS の活性化を抑制することがわかった。

B. 先ず RAW264 の LPS による活性化の過程を NF- $\kappa$ B プロモーター活性のリポーター細胞を用いて NF- $\kappa$ B の活性化の評価をおこなった。LPS で刺激した RAW264 細胞は上述のように副刺激分子と炎症性サイトカインの発現上昇をおこしていた。同時に測定された NF- $\kappa$ B のプロモーター活性は活性化がなされていた。これは今までの知見と同じ結果である。

この活性化過程にミダゾラムを作用させると NF- $\kappa$ B のプロモーター活性の活性は低下していた

ミダゾラムのマクロファージの活性化抑制は NF- $\kappa$ B の活性化の抑制を介していることが示唆された。

C. 中枢性ベンゾジアゼピン受容体(GABA 受容体)と関連するリガンドと末梢性ベンゾジ

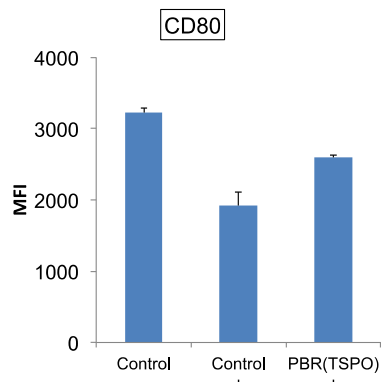
アゼピン受容体 (TSP0)の関連するリガンドの RAW264 の活性化過程に対する影響を調べた。

GABA 受容体に関連するリガンドであるピガバトリン、ムシモル、GABA、クロナゼパムは LPS による活性化を抑制することができなかった。これに対して TSP0 に関連するリガンドであるエチフォキサインと FGIN1-27 を添加しておく副刺激分子(CD80, CD86)の発現低下と炎症性サイトカイン(IL-6, IL-12)の発現上昇の抑制が認められた。

この結果から少なくともミダゾラムは TSP0 を介してマクロファージに作用していることが示唆された。GABA 受容体の関与は否定できないがその関与は小さい可能性が示唆された

D. TSP0 に対する siRNA を導入して TSP0 ノックダウン RAW264 細胞を作成して解析する実験を行った。まずコントロール siRNA と TSP0 に対する siRNA を RAW264 に導入した細胞を作成した。TSP0 の siRNA を導入した RAW264 では確かに TSP0 の発現が低下していることが mRNA より作成した cDNA を用いて行う定量的 PCT 法によって示された。

次に上述のごとく作成した実験群 3 と 4 の比較で、TSP0 をノックダウンした細胞ではミダゾラムによる副刺激分子の発現抑制と、ミダゾラムによる炎症性サイトカインの発現抑制は、どちらも軽減していることが示された (図 1)



(図 2)

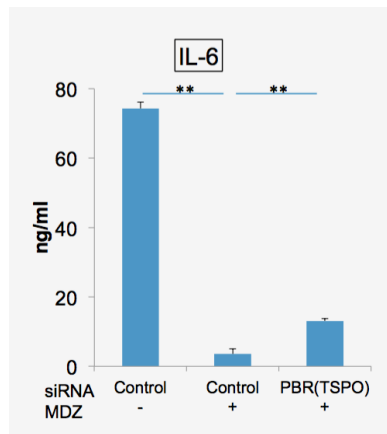


図 1 は CD80 の図 2 は IL-6 の結果を示す。

またとても興味深いことに実験群 1 と 2 の比較を行うと、RAW264 の TSP0 のノックダウンを行うとコントロール siRNA を導入した RAW264 と比較して LPS に対する CD80, CD86 の副刺激分子の発現と、炎症性サイトカインの発現上昇は増強されていた。

この事実 TSP0 はミダゾラムのような外因性のベンゾジアゼピンの刺激がなくとも LPS に対する活性化に対して負のシグナルを入れている可能性を示唆している。

SiRNA の導入によるノックダウン細胞を作成した解析から、少なくともマクロファージにおいてベンゾジアゼピン系薬物は末梢性ベンゾジアゼピン受容体(TSP0)を介して作用を発揮することが示された。おそらく GABA 受容体をかいた作用は小さいことが示唆されている。

興味深いことに TSP0 はベンゾジアゼピンの作用はなくとも LPS による活性化過程に対して negative regulator として働いている可能性も示唆された。

#### 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 )

Haloperidol suppresses murine dendritic cell maturation and priming of the T helper 1-type immune response.

Matsumoto A, Ohta N, Goto Y, Kashiwa Y, Yamamoto S, Fujino Y.

Anesth Analg. 2015 ;120:895-902.

Haloperidol Suppresses NF-kappaB to Inhibit Lipopolysaccharide-Induced Pro-Inflammatory Response in RAW 264 Cells.

Yamamoto S, Ohta N, Matsumoto A, Horiguchi Y, Koide M, Fujino Y.

Med Sci Monit. 2016 4;22:367-72.

[ 学会発表 ] ( 計 3 件 )

ミダゾラムは TSP0 を介してマクロファージに作用する

日本麻酔科学会 第 6 2 回学術集会

2015 年 5 月 29 日

大田典之

麻酔科医がコマンダーとして活躍するために

日本麻酔科学会 第 6 2 回学術集会

2015 年 5 月 30 日

大田典之

n3/n6 不飽和脂肪酸を主成分とする脂肪製剤の樹状細胞を介する免疫応答に与える影響

第 41 回日本集中治療医学会学術集会

2014 年 2 月 27 日

大田典之

#### 6 . 研究組織

##### (1) 研究代表者

大田典之 (OHTA, Noriyuki)

大阪大学医学部付属病院 助教

研究者番号 : 60379162

##### (2) 研究分担者

藤野裕士 (FUJINO, Yuji)

大阪大学大学院医学系研究科 ( 研究院 ) 教授

研究者番号 : 50252672

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :