

令和元年9月4日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10958

研究課題名(和文)ベンゾジアゼピンによる感染症予後悪化機構の解明

研究課題名(英文)The mechanism of worsening effects of benzodiazepine on immune defense

研究代表者

大田 典之(OHTA, Noriyuki)

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号：60379162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：免疫系への作用メカニズムをマクロファージTHP-1を用いてミダゾラムの作用メカニズムを検討した。ベンゾジアゼピンの作用分子の一つとしてTranslocator protein (TSPO)が知られている。THP-1をLPSで刺激すると炎症メディエーターと表面抗原の発現増加が起こり、ベンゾジアゼピンがこれを抑制するという系を用いて解析した。TSPOリガンドはベンゾジアゼピンと同様の抑制作用を示した。またミダゾラムはTHP-1のNF- κ BとMAPKの活性化を抑制していた。TSPOを過剰発現した細胞とTSPOの発現を抑制した細胞を用いた解析からミダゾラムの作用にTSPOの関与があることが示された

研究成果の学術的意義や社会的意義

ベンゾジアゼピン系薬物は鎮静薬、麻酔薬として広く使用されている。近年ベンゾジアゼピンの使用がICUのなかに限らず、一般患者の感染症の予後に影響を与える可能性が示されてきた。この根底に潜むメカニズムについては様々なし探されてきたが分子論的な検討は少なかった。私たちの本検討はベンゾジアゼピン系薬物の免疫抑制メカニズムの一部を明らかにしたものととして価値が高いと考える

研究成果の概要(英文)：We examined the immunomodulatory effects of the benzodiazepine midazolam on human macrophages and associated molecular mechanisms. We analyzed effects of midazolam pretreatment on LPS-induced upregulation of the costimulatory molecule and the pro-inflammatory factors in THP-1 and in PMDMs. The effects of midazolam on NF- κ B, and MAPK activation were analyzed in THP-1 cells. The role of TSPO was investigated using THP-1 cells overexpressing TSPO and with TSPO knockdown through transfection with small interfering RNA for TSPO. Results Midazolam suppressed upregulation of CD80 and release of IL-6 and NO in THP-1 cells and PMDMs. Midazolam suppressed the activation of NF- κ B/AP-1 and MAPKs in human THP-1 cells. Macrophages overexpressing TSPO exhibited enhanced susceptibility to immunosuppression by midazolam, and macrophages lacking TSPO expression exhibited reduced effects of midazolam. Midazolam inhibits LPS-stimulated immune responses in human macrophages by activating TSPO signaling.

研究分野：周術期管理医学

キーワード：ベンゾジアゼピン TSPO GABA サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

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が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。

3. 研究の方法

A. ヒトのマクロファージ細胞株である THP-1 を対象に用いる。THP-1 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。ミダゾラムに酔う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 THP-1 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- κ B の活性化の状況の評価する。この目的で NF- κ B のプロモーター活性を測定する。NF- κ B のプロモーターに発色色素の酵素をつけた遺伝子を THP-1 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(THP-1-blue)。LPS を作用させると NF- κ 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 THP-1 の活性化がおこるときに NF- κ 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 THP-1 の活性化の抑制過程に NF- κ 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 THP-1 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 THP-1 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 THP-1 の TSPO の発現が低減しているのかを確認する。TSPO の発現を低減させることのできた THP-1 細胞(TSPO 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 THP-1)

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

E. 次に THP-1 に TSP0 の cDNA をレンチウイルスベクターによって導入する。TSP0 に対する siRNA を導入した THP-1 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 TSP0 の mRNA の発現量を測定し siRNA を導入した THP-1 の TSP0 の発現が増加しているのかを確認する。TSP0 の発現を増加させることのできた TSP0 高発現 THP-1 細胞 (を用いて以下の実験をおこなう。さらにコントロールの cDNA を導入した実験群も作成する (control THP-1)

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

4. 研究成果

A. THP-1 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 THP-1 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 THP-1 の LPS による活性化の過程を NF- κ B プロモーター活性ののリポーター細胞を用いて NF- κ B の活性化の評価をおこなった。LPS で刺激した THP-1 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- κ 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- κ 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- κ 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シシンと FG1N1-27 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 THP-1 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 THP-1 に導入した細胞を作成した。TSP0 の siRNA を導入した THP-1 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

E. また実験群 1 と 2 の比較を行うと、TSP0 を高発現した THP-1 細胞はコントロール cDNA を導入した THP-1 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より抑制されていた。

遺伝子操作した THP-1 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。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Int Immunopharmacol. 2019 Jan;66:373-382.
doi: 10.1016/j.intimp.2018.11.050. Epub 2018 Dec 5. 査読あり
Midazolam suppresses the lipopolysaccharide-stimulated immune responses of human macrophages via translocator protein signaling.
Horiguchi Y, Ohta N, Yamamoto S, Koide M, Fujino Y.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 堀口 佑、大田 典之、古出 萌、山本 俊介、内山 昭則、藤野 裕士
TSP0 リガンド Etifoxine による炎症疾患の制御の可能性
日本麻酔科学会 2018
2. 堀口 佑、大田 典之、古出 萌、山本 俊介、海老島 宏典、平松 大典、内山 昭則、藤野 裕士
ミダゾラムは TSP0 シグナルを介してマクロファージの免疫応答を抑制する
日本集中治療医学会学 2018

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 : 藤野裕士
ローマ字氏名 : FUJINO, yuji
所属研究機関名 : 大阪大学
部局名 : 大学院医学系研究科
職名 : 教授
研究者番号 : 50252672

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。