

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：24303
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K11094
研究課題名(和文) 2型糖尿病易感染性病態の解明と治療に向けた白血球遺伝子及びcfDNAの網羅的解析

研究課題名(英文) Elucidation the susceptibility in type 2 diabetes including comprehensive analysis of leukocyte genes and cfDNA

研究代表者
前田 祥子 (Maeda, Sachiko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90529512
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：耐糖能異常を有する病態では、白血球機能低下から感染防御能の低下に発展することが知られている。近年、小胞体ストレスとグルコースホメオスタシスの関連が示唆されるようになったことから、我々は、白血球の中でも感染制御に重要な役割を占めるマクロファージに着眼した。研究の結果、敗血症高血糖ストレス状況下では、小胞体ストレスの増強がCHOP経路を介し、マクロファージの機能障害の一因となることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症高血糖ストレス病態は集中治療および周術期に遭遇する頻度が高く、それらの病態は易感染性から手術創部感染を引き起こすことが問題である。本研究では、その易感染性メカニズムの一因が、CHOP経路を介した小胞体ストレスの誘導がトリガーとなっておこるマクロファージの機能障害の可能性を明らかにしたことに学術的意義があると考えている。そして、これらのメカニズムをターゲットとした治療に展開する可能性を秘めていることに社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It is known that a patient having impaired glucose tolerance develops a decrease the ability for protecting infection due to leukocyte dysfunction. In recent years, the relationship between endoplasmic reticulum stress and glucose homeostasis has been suggested, so we have focused on macrophages, which play an important role in controlling infection. The present study revealed that induction of endoplasmic reticulum stress contributes to macrophage dysfunction through the CHOP pathway under septic hyperglycemic stress.

研究分野：集中治療

キーワード：高血糖 敗血症 マクロファージ

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者の術後感染と白血球機能

本邦でも2型糖尿病（DM）罹患患者が700万人を超え、それらの患者が手術をうける頻度も非常に高くなっている。2型DM患者の周術期では、代謝亢進に伴うインスリン抵抗性の増大^{1,2}や、それに伴って引き起されるストレス性高血糖から予後が悪化することが明らかにされている³。その大きな原因の1つとして、2型DM患者の易感染性が挙げられている。2型DM患者では白血球数の減少や多核白血球の粘着能⁴、走化能⁵、貪食能⁶、殺菌能の低下⁶といった機能低下が認められ、感染防御能の低下から手術創部感染（SSI: Surgical Site Infection）の引き金になることが指摘されている。

ストレス状態下における白血球の遺伝子損傷および発現変化

末梢血中に存在する白血球は、様々なストレス負荷によって遺伝子発現が変化するだけでなく、遺伝子損傷を引き起こすことが報告されている。これまで、睡眠時無呼吸症候群による低酸素血症が酸化ストレスを増大させ、循環血液中の白血球テロメアの短縮（白血球寿命の短縮）を引き起す可能性や⁷、急激な運動負荷による急性炎症反応によって、末梢白血球内の遺伝子発現が変化することが明らかとなっている⁸。高血糖下ではミトコンドリア電子伝達系に生じた電位差から細胞内反応系O₂（ROS）が産生されることが判明している。実際に、1型DMでは、HbA1cや血糖値の上昇に伴って、末梢血中白血球の抗酸化防御機能の低下とDNAの二重鎖損傷（Double strand breakage）が認められることが報告されている⁹。下流のmicro RNA（miRNA）レベルでは、白血球分化過程に複数のmiRNAが関与し、miRNA-132が顆粒球の炎症惹起に関係している可能性が高いことが示唆され¹⁰、好中球タンパク発現にmiRNA-130aが強く関係していることも報告されている¹¹。これらのことから、我々は、高血糖状態に伴う酸化ストレス負荷等からDNA損傷やその修復過程で何らかのゲノム変異が起り、下流のmRNAやmiRNAレベルにも影響が及んでいることが2型DMにおける易感染性の大きな原因であるとの仮説を立てている。

cell-free DNAの意義と白血球の遺伝子解析法

近年、血中循環中DNA（circulating cell-free DNA: ccfDNA）が腫瘍の進行度のモニタリング、薬効評価、予後評価および分子標的治療のためのスクリーニングなどに対する低侵襲のバイオマーカーとして注目されている。ccfDNAの多くは、血球系細胞のアポトーシスなどの細胞死の際に血中に放出されたDNAであり、健常人においても認められるものである。しかし、従来のセルソーター等では、末梢循環細胞を正確に分離かつ必要細胞数を得ること、また、それと平行して、ccfDNAを同時に解析することは大変困難であった。

しかし、昨年度後半より、単一血液検体からIsolation Flow Cell技術を用いて、末梢循環細胞・ccfDNAを高回収率かつ高精製率で得ることを可能とした新しい血球回収解析装置研究応用できるようになった。そして、得られた末梢循環細胞DNA・ccfDNAを次世代型シーケンサーで網羅的に解析し、遺伝子情報を相補的に組み合わせることで様々な病態の全体像の解明が促進されることが期待されている。

2. 研究の目的

当初の研究の主軸としていたIsolation Flow Cell使用を用いた解析は、検体採取の倫理的問題やシステム構築の問題などのために、実現に非常に時間を有していた。したがって、本研究の根本的な目的や意義を振り返り、感染、高血糖ストレスおよび白血球機能障害に関して究明していくという“学術的問い”の中で、ccfDNA以外の側面にも目を向けることとした。未だ明らかにされ

ていないメカニズムにも focus をあて、それを並行して究明していく方針とした。その中でも、近年 Endoplasmic reticulum (ER) stress とグルコースホメオスタシスの関連¹²⁻¹⁴が示唆されるようになったことから、我々は、白血球の中でも感染制御に重要な役割を占めるマクロファージに着眼し、敗血症高血糖ストレス状況下において、ER stress がマクロファージの機能障害に関与するメカニズムについて探求することとした。特に ER stress ではアポトーシス誘導に C/EBP homologous protein (CHOP)が key (図1) となることから、マクロファージの機能低下 (アポトーシス誘導) には、CHOP の上昇が関連しているという仮説を立て、その役割解明を研究の主目的とした。

3. 研究の方法

ラット腹腔マクロファージの分離と培養

コンカナバリン A (0.2 mg/ml 1) 注射の3日後、オス Wistar ラット (400-500 g) に挿管し、大腿動脈および静脈に 2.5%セポフルランでカニューレを挿入した。LPS (100 ug/kg/h) 持続投与/非投与下に次の血糖値とターゲットとして、グルコース輸液を行った: normal glucose (NG) 群 (80-150 mg/dl)、high glucose (HG) 群 (150-300 mg/dl)、NG+LPS 群、HG+LPS 群 (各群 n=8) .それらの投与 24 時間後、滅菌温リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 40 ml を腹腔内に投与し、腹腔内洗浄液を回収した。

フローサイトメトリー法による Phagocytosis の評価 (ラット)

Zyosan pHrodo™ Green BioParticles® conjugates (Molecular Probes, Eugene, OR, US) に対する Phagocytosis をフローサイトメトリー法で評価した。腹腔内洗浄液から得られたラットマクロファージ 10⁶ 個を培養液にいれ、37 度インキュベータ内で 1 時間静置し、細胞を接着させた。その後、pHrodo BioParticles を投与し、さらに 2 時間インキュベートした。Accutase® solution (Innovative Cell Technologies, San Diego, CA, USA) にて、マクロファージを剥離し、フローサイトメトリーにて蛍光強度を計測した。

ヒトマクロファージの分離と分化

30 ml の全血から Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich) を用い、末梢単核細胞を採取した。洗浄後、10% human serum, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 50 mM 1-mercaptoethanol, streptomycin 1%, penicillin 1%, 5.5 mM glucose を含有する endotoxin-free Roswell Park Memorial Institute 1640 (Gibco) に 5×10⁶ cell/ml となるように再懸濁し、2 時間インキュベートした。接着した単球を 5 ng/ml macrophage-colony stimulating factor (R&D Systems, Minneapolis) を含む培養液中で 7 日間培養し、マクロファージを得た。

ヒトマクロファージの Phagocytosis の評価

高血糖および LPS のヒトマクロファージの Phagocytosis に与える影響については、NG 群 (5.5 mM glucose) , mannitol (M) 群 (9.5 mM M + 5.5 mM glucose), HG 群 (15 mM glucose) の 3 群に各々 100 ng/ml の LPS を添加した合計 6 群で評価を行った。上記の培養液に 72 時間インキュベートしたのちに、fluorescein-isothiocyanate で標識した大腸菌を摂取させ、Vybrant™ Phagocytosis Assay Kit (Molecular Probes) を使用して Phagocytosis を解析した。

アポトーシス好中球の Phagocytosis については、a fluorescence celltracker reagent (CellTracker™ Green 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA); Molecular Probes) で標識された Mono-Poly® resolving medium (DS Pharma Biomedical) を用いて、全血から好中球を単離した。単離した好中球を 24 時間培養し、Spontaneous apoptosis を誘導した後、ヒトマクロファージと一時間共培養した。(好中球:マクロファージ=10:1)

4. 研究成果

[Animal study]

高血糖は LPS 誘発性の phagocytosis 抑制を増強する

HG 群は NG 群と比較して、処置開始後 24 時間後における Zymosam 食作用が減少しなかったが、持続的な LPS 投与では Zymosam 食作用を減少させた (図 2 : NG+LPS, HG+LPS 群 $P < 0.0001$.) 図 3 に代表的なフローサイトメトリーヒストグラムを示す。

高血糖は CHOP pathway を介して LPS 誘発性の ER stress を増強させる

HG 群では、ラット腹腔内マクロファージ中の CHOP 発現を増加させなかった: 1.0 ± 0.2 fold change vs. NG, $p = 0.99$. それに対し、NG+LPS 群では CHOP 発現が上昇し (2.1 ± 0.3 vs. NG, $p = 0.002$.)、HG+LPS では、相乗的に発現が上昇した: 4.0 ± 1.0 vs. NG, $p < 0.001$ (図 4).

高血糖+LPS は細胞内 Akt のリン酸化を阻害する

HG 群は、ラット腹腔内マクロファージ中の Akt のリン酸化を抑制しなかった: 1.0 ± 0.2 fold change vs. NG, $p = 0.99$. それに対し、NG+LPS 群では Akt のリン酸化が抑制され (0.8 ± 0.1 vs. NG, $p < 0.001$.)、HG+LPS では、相乗的に発現が抑制された: 0.6 ± 0.1 vs. NG, $p < 0.001$ (図 5)

[Human study]

高血糖は LPS 誘発性のヒトマクロファージの E. coli phagocytosis および apoptotic neutrophil efferocytosis の低下を増強する

HG 群では、ヒトマクロファージの E. coli phagocytosis および apoptotic neutrophil efferocytosis を低下しなかったが、NG+LPS 群 (72 時間後) では NG 群に比して、それらを約 3 分の 2 程度まで減少した。HG+LPS 群では NG 群に比して、24, 48, 72 時間後それぞれにおいて相乗的に低下させた。(図 6 : 各々, $P < 0.001$)

高血糖は CHOP 経路を介し LPS 誘発性 ER ストレスを増強した

HG 群では CHOP mRNA の発現上昇を認めなかったが、NG+LPS 群では CHOP mRNA およびタンパクの発現上昇が見られ、HG+LPS 群ではそれらが最も上昇していた。(図 7 : mRNA; 11.0 ± 6.4 fold change vs NG, $P < 0.001$; protein 2.9 ± 0.3 fold change vs NG, $P < 0.001$.)

高血糖+LPS は細胞内 Akt リン酸化を抑制する

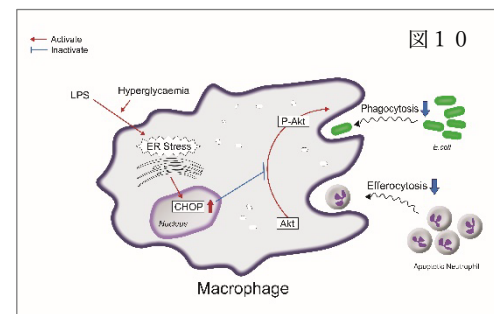
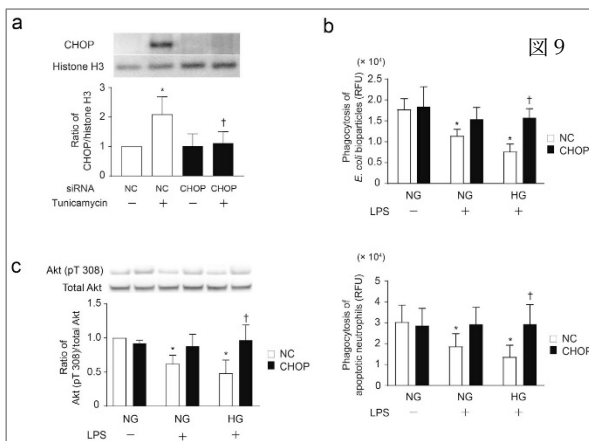
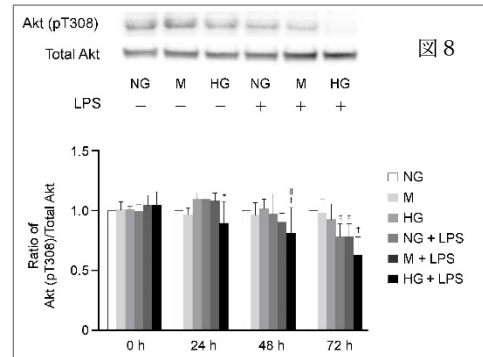
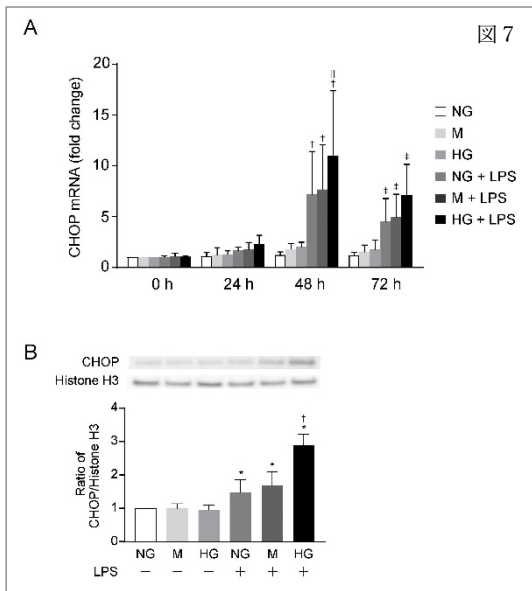
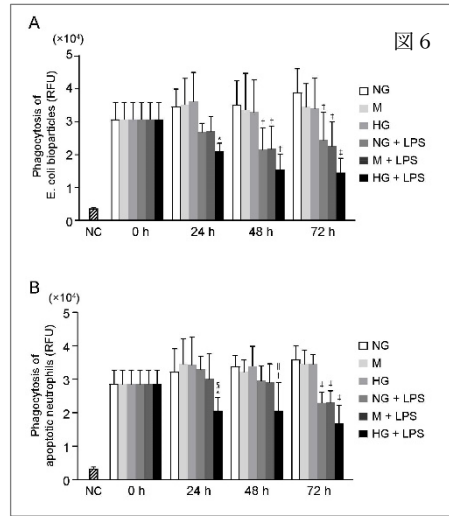
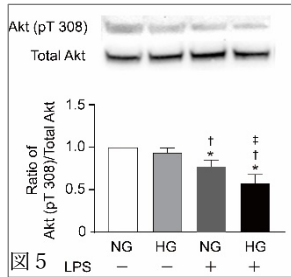
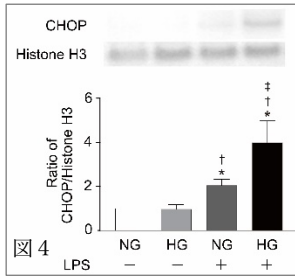
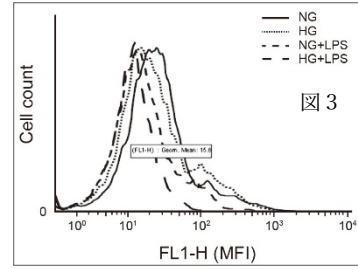
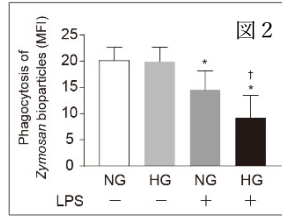
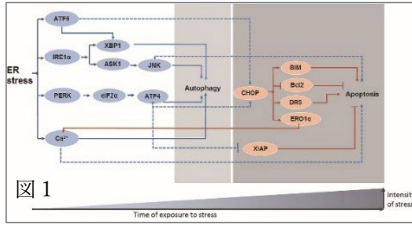
HG 群は、Akt のリン酸化 (Thr308) を抑制しなかった。NG+LPS 群では、Akt のリン酸化が抑制され、HG+LPS 群では最も抑制が認められた。(図 8 : 0.6 ± 0.2 fold change vs NG, $P < 0.001$)

CHOP 経路を介した ER stress の増強は Akt のリン酸化および phagocytosis を抑制する

SiRNA を使用した CHOP knock down では、ツニカマイシンによる ER stress 誘導が抑制されることを確認した。そして、CHOP knock down では、E. coli particles および apoptotic neutrophils の phagocytic activity が回復した。さらには、Akt のリン酸化抑制も認められなかった。(図 9) これらのことから、ラットモデルの敗血症高血糖ストレス状況下において、C/EBP homologous protein (CHOP) がマクロファージのアポトーシス誘導の key である可能性が示唆された。(図 10) 今後は遅れている cfDNA についても開始のめどがついたため、順次開始していく。

参考文献

- 1) AACN Clin Issues. 2004;15:45-62.
- 2) Curr Opin Clin Nutr Metab. 1999;2:79-82.
- 3) Crit Care Clin. 2001;17:107-24.
- 4) Diabetes. 1978;27:677-81.
- 5) N Engl J Med. 1971;284:621-7.
- 6) Diabetes. 1988;37:544-49.
- 7) Aging Dis. 2016;7:604-613.
- 8) J Appl Physiol 2007;102:26-36.
- 9) Mutat Res. 2003;527:49-55.
- 10) Plos one. 2013;8:e58454.
- 11) BMC immunology. 2015;16:70.
- 12) Cell 2010;140:900-917.
- 13) Trends Mol. Med. 2012;18:59-68.
- 14) Trends Endocrinol. Metab. 2012;23:381-390.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Iida J., Ishii S., Nakajima Y., Sessler D.I., Teramae H., Kageyama K., Maeda S., Anada N., Shibasaki M., Sawa T., Nakayama Y.	4. 巻 123
2. 論文標題 Hyperglycaemia augments lipopolysaccharide-induced reduction in rat and human macrophage phagocytosis via the endoplasmic stress-C/EBP homologous protein pathway	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 British Journal of Anaesthesia	6. 最初と最後の頁 51 ~ 59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bja.2019.03.040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	石井 祥代 (Ishii Sachiyo) (40457958)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	
研究分担者	小川 寛 (Ogawa Satoru) (50636131)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師 (24303)	
研究分担者	中嶋 康文 (Nakajima Yasufumi) (70326239)	関西医科大学・医学部・教授 (34417)	
研究分担者	中山 力恒 (Nakayama Yoshinobu) (90568198)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	