

平成22年5月12日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2009
課題番号：19591793
研究課題名（和文） 急性肺傷害に対するリン脂質投与の予防効果に関する研究：カルジオリピンを中心に
研究課題名（英文） Effect of pretreatment with phospholipids on acute lung injury: especially effect of cardiolipin
研究代表者
持田 晋輔 (MOCHIDA SHINSUKE)
鳥取大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：70403433

研究成果の概要（和文）：手術後の敗血症に起因する急性肺傷害をはじめとする臓器障害は、生命予後に大きな影響を及ぼすとされており、これらの予防は重要な課題とされている。本研究では、生体膜に存在するリン脂質のカルジオリピン（CL）を前投与することにより、リポポリサッカライドによりマウスに誘導される急性肺傷害が予防され、マウスの生存率が著明に改善することが明らかになった。この防御機序にはCLによる炎症メディエーター産生抑制が関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we investigated whether cardiolipin (CL) suppresses acute lung injury in mice induced by lipopolysaccharide (LPS). It has been demonstrated that CL prevents LPS-induced acute lung injury via the inhibition of production of proinflammatory mediators such as nitric oxide and tumor necrosis factor- α .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：麻酔・蘇生・集中治療学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：急性肺傷害、カルジオリピン、リポポリサッカライド、マクロファージ、リン脂質、サイトカイン、一酸化窒素

1. 研究開始当初の背景

手術等の侵襲的処置を受ける患者にとって、術後の敗血症に起因する急性肺傷害をはじめとする臓器障害は、生命予後に大きな影響を及ぼすとされており、これらの予防は周術期管理学上の重要な課題とされている。敗

血症の病態には、グラム陰性菌の細胞壁成分であるリポポリサッカライド（LPS）により活性化された単球／マクロファージにより産生される炎症性サイトカインなどの種々の炎症メディエーターの関与が指摘されている。この観点から、抗サイトカイン療法な

どが考案されているが、サイトカインには多くのネットワークが存在し、単一あるいは数種類のサイトカインを抑制するのみでは改善しない症例も多く存在する。LPS によるマクロファージの活性化に関しては、現在以下のような機序が考えられている。LPS は膜の中に存在している時、自然免疫の活性化は極めて弱い。LPS が宿主によって細菌の細胞壁から切り出され、LPS-binding protein (LBP) が LPS に結合し、LPS を CD14 に移行させる。CD14 に結合した LPS はさらに宿主細胞膜表面の Toll-like receptor 4 (TLR4)-MD-2 複合体に渡され、このレセプター複合体の二量体化がおり、シグナルが細胞内に伝達される。我々は、これまでに抗胃潰瘍薬として既に臨床応用されている geranylgeranylacetone (GGA) のマクロファージに対する直接作用を調べた結果、GGA は LPS と LBP の結合には影響を与えず、その下流で LPS のマクロファージ細胞表面への結合を抑制することにより、LPS 刺激後の一酸化窒素 (NO) 産生および腫瘍壊死因子 (TNF) α 産生を有意に抑制することを明らかにした (Mochida S, et al. J Clin Biochem Nutr 41(2): 115-123, 2007)。そこで、LPS 受容体である TLR4 への LPS の結合というシグナル伝達の最上流を阻害する物質を見いだすことが出来れば、より効果的に敗血症およびそれに伴う急性肺傷害を予防することが可能となり、将来有望な予防法 (治療法) になりうる。

2. 研究の目的

近年、*in vitro* の実験で、カルジオリピン (CL) などの負電荷をもつリン脂質が LPS と LBP の結合を抑制することが報告されている (Mueller M et al., J Immunol 174: 1091-1096, 2005)。しかしながら、実際に急性肺傷害の動物モデルを用いてこのようなリン脂質投与の予防効果を検討した報告は見られない。我々の作業仮説は、ある特定のリン脂質を手術等の侵襲的処置前に投与した場合、LPS の TLR4 への結合が抑制され、術後の敗血症に起因する急性肺傷害が予防可能になるというものである。そこで本研究では、CL を中心にマクロファージ活性化を LPS と LBP の結合段階で最も効率的に抑制するリン脂質を見つけだし、将来的な臨床応用の可能性について、動物実験により検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) LPS-LBP 結合解析

各種リン脂質による LPS-LBP 結合に対する阻害効果の検討は、*in vitro* 解析で Endblock LBP ELISA TEST KIT™ (Cell Sciences, Inc.) を用いて行った。CL、ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジルイノシトール (PI)、

ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、スフィンゴミエリン (SM) はエタノールに溶解した。ジミリストイルホスファチジルグリセロール

(DMPG)、ジオレオイルホスファチジルセリン (DOPS) は水に溶解した。溶解した脂質はフェノールレッド不含有ダルベッコ変法必須培地 (DMEM) で 1000 倍希釈し、上記キットのプロトコールに従い解析を行った。

(2) 細胞培養

マウスマクロファージ由来の RAW 264 細胞 (以下 RAW 細胞) は Riken BRC から購入し、非働化した 10% ウシ胎児血清 (FCS)、2 mM glutamine、抗生物質 (100-units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin) を添加した DMEM 培地中に細胞を懸濁し、37°C、95% 空気、5% CO₂ の条件下で培養した。全ての実験にはコンフルエント直前の細胞を用いた。

(3) リン脂質によるマクロファージ活性化の抑制

LPS (1 μ g/ml) を用いて、37°C、5%CO₂ の条件で、10%FCS を含む DMEM 培地中 RAW 細胞を 12 時間あるいは 24 時間刺激し、それぞれ培地中の TNF- α あるいは NO を測定した。リン脂質 (CL, DMPG) は LPS 投与の 2 時間前に投与した。

(4) 実験動物

雄性 ddy 系マウス (5 週齢) を日本 SLC (株) より購入し、プラスチックゲージにて 1 ゲージにつき 5, 6 匹で 1 週間飼育した。飼育は温度 23 \pm 3°C、湿度 55 \pm 5% で明暗 12 時間のサイクルで行った。実験 12 時間前より絶食とし、水の摂取は自由とした。実験プロトコールは鳥取大学医学部動物実験委員会にて承認された。

(5) CL、LPS 投与および生存率の確認と試料の採取

LPS (サルモネラ菌由来、Sigma Chemical より購入) は 10% ジメチルスルホキシド (DMSO) を含む phosphate-buffered saline (PBS) に溶解し、10, 20, 40, 60 mg/kg の用量で投与液量 6ml/kg を腹腔内投与した。CL を 10% DMSO を含む PBS に溶解し、100 mg/kg の用量で投与量 6 ml/kg を LPS 投与 3 時間前にマウスに腹腔内投与した。LPS 投与後、12 時間ごとに 84 時間後までマウスの生死を確認した。対照マウスには同量の溶媒を投与した。試料採取の実験では、LPS 投与 18 時間後 ジェチルエーテル麻酔下、ヘパリン処理したシリンジで右心室より採血した。採血後、肺を摘出し、液体窒素中で凍結保存した。

(6) NO 濃度測定

RAW 細胞における NO 産生の測定は Griess 法を用いて行った。細胞を 5×10^5 cells/well となるように培養用 24 穴プレートに播いた。細胞が完全に接着後、新しい DMEM と交換し、各種リン脂質を添加した。2 時間後、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS を添加し、24 時間保温後、培養上清を採取し冷却遠沈 (1,050 \times g, 5 分, 4°C) した。上清を 96 穴プレートに 80 μl ずつ加え、50 mM リン酸緩衝液を 20 μl 添加し全量を 100 μl にした。そこに Griess 試薬 A (1% sulfanilamide in 5% H_3PO_4) を 50 μl 加え、攪拌後、室温で 5 分間静地した。次に Griess 試薬 B (0.1%

N-[1-naphthyl]ethylenediamide dehydrochloride [NED]) を 50 μl 加え、攪拌後、室温で 10 分間保温した後、マイクロプレートリーダーで 562 nm の吸光度を測定した。

血漿 NO 濃度として NO_2/NO_3 濃度を Griess 法で測定した。 NO_3 還元酵素で NO_3 を NO_2 に還元した後、サンプル 80 μl に 20 μl の 50 mM リン酸緩衝液を加えた。その後、培地中 NO 濃度測定と同様にマイクロプレートリーダーを用いて測定した。

(7) TNF- α 測定

培地中および血漿中 TNF- α 量は BIOSOURCE Immunoassay Kit を用いて ELISA 法で測定した。

(8) 肺組織像

採取した肺は、10%ホルマリンに固定後、切片をヘマトキシリン-エオジン (H-E) 染色し、光学顕微鏡で観察した。

(9) タンパク質量

各試料のタンパク質量は Bradford らの方法に従い、ウシ血清アルブミンを標準液として測定した。

(10) 統計学的処理

各測定値はすべて平均値 \pm 標準誤差 (SE) で示した。平均値の有意差の検定は One-way ANOVA あるいはスチューデントの t 検定で行い、危険率 5% 未満を有意とした。

4. 研究成果

(1) 各種リン脂質による LPS-LBP 結合阻害効果の検討

無細胞系における LPS-LBP 結合を ELISA 法で検出し、CL (7.5 μM), PI (12 μM), PC (50 μM), SM (8.5 μM), PS (8.5 μM), PE (50 μM), DMPG (50 μM), DOPS (50 μM) による結合阻害効果を判定した。その結果、CL, PI, DMPG は結合をそれぞれ 82%, 34%, 30% 有意に抑制した (図 1)。

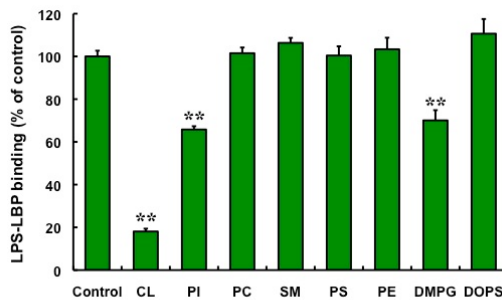


図1. 各種リン脂質によるLPS-LBP結合の抑制効果

** $P < 0.01$ vs Control, $n = 3$, Mean \pm SE

(2) CL による RAW 細胞活性化の抑制

無細胞系で LPS-LBP 結合を最も強力に阻害した CL を用いて、LPS 添加後の RAW 細胞の NO および TNF- α 産生におよぼす影響を調べた。CL (15 μM) および DMPG (50 μM) を LPS 刺激 2 時間前に添加し、LPS 刺激 24 時間後に培地中の NO を測定した。DMPG は NO 産生を抑制しなかったが、CL は NO 産生を 25% 有意に抑制した (図 2)。また、同様に LPS 刺激 12 時間後の TNF- α 産生は CL 前投与により、32% 有意に抑制された (図 3)。

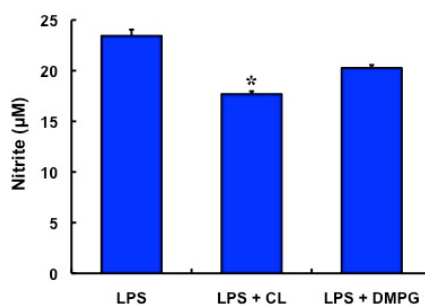


図2. CLによるLPS添加後のRAW細胞におけるNO産生の抑制効果

* $P < 0.05$ vs LPS alone, $n = 3$, Mean \pm SE

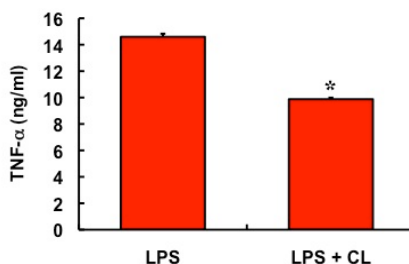


図3. CLによるLPS添加後のRAW細胞におけるTNF- α 産生の抑制効果

* $P < 0.05$ vs LPS alone, $n = 3$, Mean \pm SE

(3) LPS 投与によるマウス急性肺傷害モデルの作製

in vitro の実験系で各種リン脂質の中で CL が最も強力なマクロファージ活性化抑制効果を発揮することが明らかになったので、CL による急性肺傷害の予防効果を検討する

ためにマウス急性肺傷害モデルを作製した。まず、マウスにLPS (10, 20, 40, 60 mg/kg)を腹腔内投与し、投与後の生存率を調べた(図4)。その結果、LPSの用量依存性に生存率が低下することが明らかになった。60 mg/kg LPS投与では投与後36時間で全てのマウスが死亡したため、以後の実験では40 mg/kg LPSを使用することとした。

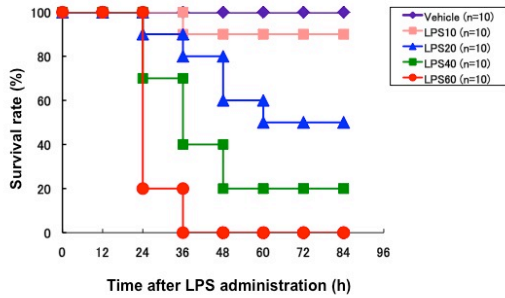


図4. LPS投与後のマウス生存率の変化
LPS10, 20, 40, 60: それぞれ10, 20, 40, 60 mg/kg LPS投与

40 mg/kg LPS投与後のマウス血漿中のNOおよびTNF- α 濃度を測定した。血漿NO濃度はLPS投与24時間後まで経時的に増加した(図5)。

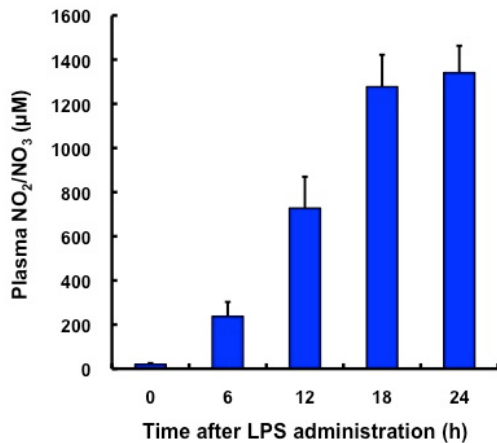


図5. LPS投与マウスにおける血漿NO濃度の経時変化
n = 5, Mean \pm SE

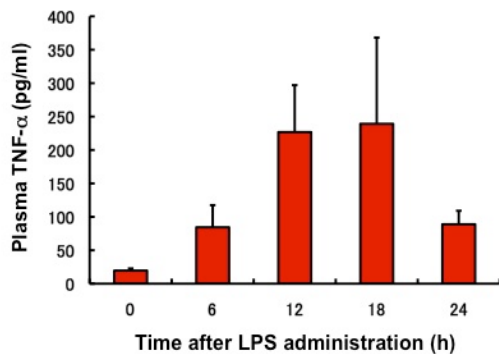


図6. LPS投与マウスにおける血漿TNF- α 濃度の経時変化
n = 5, Mean \pm SE

血漿TNF- α 濃度はLPS投与後経時的に増加し、18時間後に最大値を示した後、低下した(図6)。LPS投与18時間後のマウス肺組織像は血管周囲浮腫および著明な肺胞内出血像を呈し、急性肺傷害に一致する所見を示した(図7)。

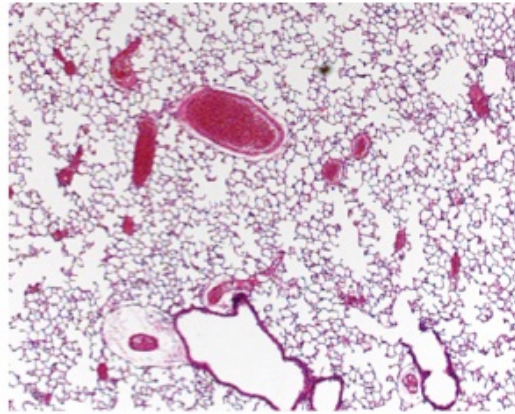


図7. LPS投与18時間後の急性肺傷害
H-E染色(倍率:4倍)

(4) CL前投与のLPS投与後のマウス生存率におよぼす影響

CL (100 mg/kg)をLPS (40 mg/kg)腹腔内投与3時間前にマウスに腹腔内投与し、生存率に対する影響を調べた(図8)。生存率はLPS投与84時間後には40%まで減少した。CLの3時間前投与は84時間後の生存率を90%に改善した。

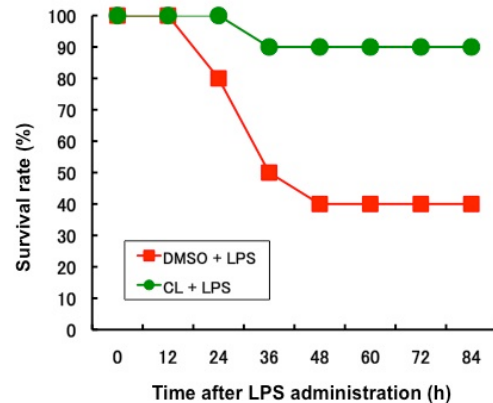


図8. LPSによるマウス死亡に対するCL前投与の効果(n = 10).
CL (10 mg/kg, i.p.)をLPS (40 mg/kg)投与3時間前に投与し、LPS投与後の生存率を調べた。

(5) LPS誘導急性肺傷害に対するCLの予防効果

LPS投与3時間前にCLを投与したマウスでは、LPS単独投与に比べて、肺傷害が著明に改善された(データ未提示)。

(6) LPS投与マウスの血漿NOおよびTNF- α 濃度に対するCL前投与の効果

CL前投与がLPSによるマウス急性肺傷害を予防することが明らかになったので、その抑制機序を探るために血中NOおよびTNF- α 濃度に及ぼすCL前投与の影響について検討した。LPS投与18時間後の血漿NO濃度は、CL前投与によりLPS単独投与に比べて24%有意に抑制された(図9)。また、血漿TNF- α 濃度もCL前投与により63%抑制された(図10)。

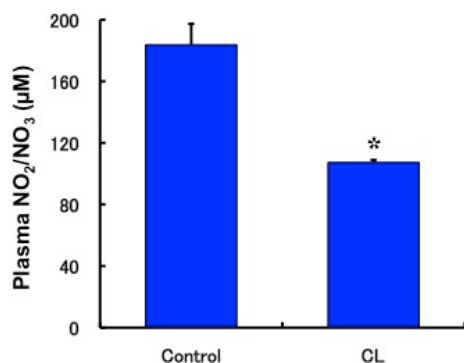


図9. CLのLPS投与18時間後の血漿NO濃度に対する効果。

*P < 0.05 vs Control, n = 5, Mean ± SE

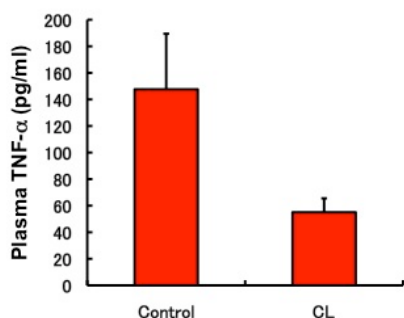


図10. CLのLPS投与18時間後の血漿TNF- α 濃度に対する効果。

n = 5, Mean ± SE

以上の結果より、CLはLPSによって誘導されるNOやTNF- α などの炎症メディエーター産生を抑制することにより、マウス急性肺傷害を防御することが示唆された。

今後は、LPS-LBP結合を弱いながらも抑制したPIとDMPGとCLの組み合わせ投与により、相加的あるいは相乗的效果が見られるかどうか、またCLが後投与でも有効かどうかを検討する予定である。

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1件)

- ① Ohata S, Moriyama C, Yamashita A, Nishida T, Kusumoto C, Mochida S, Minami Y, Nakada J, Shomori K, Inagaki Y, Ohta Y and Matsura T. Polaprezinc protects

mice against endotoxin shock. J. Clin. Biochem. Nutr. 査読有、Vol. 46 (3), 2010, 234-243

[学会発表] (計3件)

- ① 大畑修三、松浦達也、森山千尋、山下 敦、太田好次、山田一夫、ポラプレジンクによるLPS誘導マウスエンドトキシンショックの抑制効果、第16回生体パーオキシド研究会、2008年8月30日、仙台市、勝山館
- ② T. Matsura, C. Moriyama, A. Yamashita, H. Morikawa, T. Nishida, S. Ohata, C. Kusumoto, J. Nakada, K. Yamada, Oral administration of polaprezinc, an anti-ulcer drug, protects mice against endotoxin shock, 47th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Seattle, March 19, 2008
- ③ C. Moriyama, T. Matsura, A. Yamashita, H. Morikawa, T. Nishida, S. Ohata, C. Kusumoto, J. Nakada, K. Yamada, Protection by polaprezinc against lipopolysaccharide-induced macrophage activation and endotoxin shock in mice, 第80回日本生化学会大会、2007年12月14日、パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

持田 晋輔 (MOCHIDA SHINSUKE)
鳥取大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：70403433

(2) 研究分担者

松浦 達也 (MATSURA TATSUYA)
鳥取大学・医学部・教授
研究者番号：00199746
稲垣 喜三 (INAGAKI YOSHIMI)
鳥取大学・医学部・教授
研究者番号：40184717
石部 裕一 (ISHIBE YUICHI)
鳥取大学・名誉教授
研究者番号：40122014
(H19→H20：連携研究者)