

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790341  
 研究課題名（和文） 抗菌ペプチドと炎症収束メディエーターレゾルビンを用いた敗血症性ショックの制御  
 研究課題名（英文） The effect of resolvin D1 on D-galactosamine-primed endotoxin shock model in mice.  
 研究代表者  
 村上 泰介 (MURAKAMI TAISUKE)  
 順天堂大学・医学部・助教  
 研究者番号：40384135

研究成果の概要（和文）：レゾルビンは、魚油に多く含まれる $\omega$ -3系脂肪酸由来の炎症収束性脂質ファミリーであり、強力な抗炎症性作用を示すことから炎症性疾患の治療薬として期待されている。一方、敗血症性ショックはグラム陰性菌エンドトキシン(リポ多糖:LPS)などによって引き起こされる重篤な全身性の炎症疾患である。本実験では、ドコサヘキサエン酸由来の resolvin D1 (RvD1) をエンドトキシンショックモデルに投与し、その病態に与える影響を検討した。

研究成果の概要（英文）：Resolvins are a family of potent anti-inflammatory lipid mediators derived from both eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA). Resolvin D1 (RvD1) is produced physiologically from the sequential oxygenation of DHA by 15- and 5-lipoxygenase. However, it has been unclear whether RvD1 exhibits protective action in endotoxic shock. In this study, to elucidate the effect of RvD1 on septic shock, we investigated the effect of RvD1 on inflammatory mediators, using D-galactosamine-primed endotoxin shock model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000円	450,000円	1,950,000円
2009年度	1,700,000円	510,000円	2,210,000円
総計	3,200,000円	960,000円	4,160,000

研究分野：医歯薬学  
 科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）  
 キーワード：感染免疫

## 1. 研究開始当初の背景

敗血症は、感染によって起こる全身性の炎症反応であり、高度医療の発達した我が国でも致死的な経過を辿ることの多い重篤な病態である。敗血症の多くにグラム陰性菌、陽性菌が関与しており、起因菌がグラム陰性菌の場合、リポ多糖(lipopolysaccharide: LPS)によって敗血症性ショックが引き起こされ、急激な血圧低下、多臓器不全を引き起こす。近年、自然免疫の分野では、これら微生物由来の病原因子 (pathogen associated molecular patterns: PAMPs)が受容体を介してマクロファージなどに炎症性サイトカイン、ケモカインあるいはアナンダミド、HMGB1といった新規の起炎症性メディエーターの産生と放出を誘導することが明らかになってきた。

これに対して、炎症反応の収束期には、炎症を収束させる炎症収束性脂質メディエーターであるレゾルビンが産生されることが近年明らかになり、注目を浴びている。レゾルビンは、エイコサペンタエン酸(EPA)およびドコサヘキサエン酸(DHA)といった $\omega$ -3系多価不飽和脂肪酸から生体内で合成される。特にレゾルビン E1 (RvE1)は EPA を前駆物質とし、血管内皮細胞の COX-2、好中球のリポキシゲナーゼ (LOX)によって生合成され、好中球の遊走阻害、炎症性サイトカインの抑制作用を持ち、種々の炎症性疾患の病態モデルで強力な抗炎症作用、組織保護作用を示す (Arita M, Serhan CN et al. *J Immunol.* 178: 3912-3917. 2007)。しかし、このような炎症収束性物質が実際に敗血症の病態でどのように産生され、作用しているか、これまでにその動態を検討した報告は為されていない。

## 2. 研究の目的

敗血症性ショックの治療には、現在のところ抗生物質による治療の他、活性型プロテイン C の投与、血糖や血圧の維持、ステロイド投与、ポリミキシンカラムを用いた体外循環による LPS の吸着除去などが用いられている。しかし、そのどれもが死亡率の劇的な改善には到っていないのが現状であり、新たな治療法の開発が期待されている。レゾルビンは $\omega$ -3系多価不飽和脂肪酸を前駆物質とする新規の炎症収束性脂質メディエーターである。従って、各種炎症性疾患における動態や外因的に投与した場合の効果などの知見は少ない。また、敗血症性ショックにおける検討は、未だなされていない。本研究では、上記 $\omega$ -3系脂肪酸由来のレゾルビンが、敗血症性ショックの病態においてどのような作用を示す

のか解明するため、マウスマクロファージ様細胞 RAW、D-galactosamine 誘発マウスエンドトキシンショックモデルを用いて *in vitro*、*in vivo*の両面からレゾルビン D1 の敗血症性ショックへの治療応用に必要な知見を得ることを目的に実験を行う。

## 3. 研究の方法

(1)マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 をレゾルビン D1 の存在下あるいは非存在下に LPS で刺激し、①上清中に産生される炎症性サイトカインを Cytokine bead array 法で測定した。②また、同様に放出される High mobility group box-1 (HMGB1)を、ELISA 法で測定した。

(2)D-Galactosamine 誘発マウスエンドトキシンショックモデル

C57B/6 Cr マウス (♂, 7 週齢) に D-galactosamine (D-GalN; 18 mg)、LPS (25 ng) を腹腔内投与し、エンドトキシンショックモデルとし、レゾルビン D1 を D-GalN、LPS と同時に腹腔内に投与した。

①血中サイトカイン、HMGB1 の測定

LPS 投与後 1 時間または 5 時間で心臓採血を行った。血中のサイトカインは、BD 社の Cytometric beads array (CBA) キットを用いて測定した。HMGB1 はシノテスト社の ELISA キットを用いて測定した。

②腹腔内への好中球浸潤に対する影響

LPS 投与後 5 時間で腹腔内を 5 ml の水冷 PBS で洗浄し、腹腔内細胞を回収した。回収した細胞数をチュルク染色により算定した。また、Cytospin 4 を用いて塗沫標本を作成した後、メイグリュンワルド-ギムザ染色を行い、マクロファージ・リンパ球、好中球の割合を調べた。

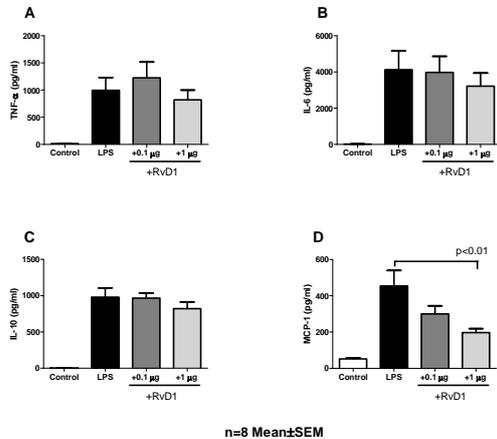
③肝細胞アポトーシスに対する影響

LPS 投与後 5 時間で肝臓を摘出し、4% paraformaldehyde で一晩浸漬固定した後、10%、20%、30% sucrose-PBS で段階的に置換し、凍結切片を作成した。切片を TUNEL 染色し、視野中のアポトーシス細胞数を算定した。

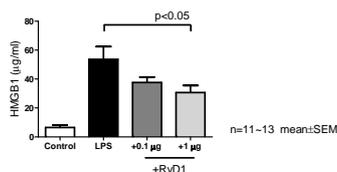
## 4. 研究成果

(1)レゾルビンの抗炎症作用を評価するために、マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 をレゾルビン D1 の存在下、非存在下に LPS で刺激し、産生されるサイトカインに対する影響を調べた。LPS 刺激により TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10、MCP-1 が産生されたが、レゾルビンは 0.01-1 $\mu$ g/ml の濃度において、そのいずれに対しても明確な抑制作用は示さなかった。

(2) マウスエンドトキシンショックモデルでは LPS 投与により血中サイトカイン(TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, MCP-1)、HMGB1 濃度の著しい上昇が見られ、レゾルビン D1 はそのうち MCP-1 および HMGB1 濃度の上昇を有意に抑制した。

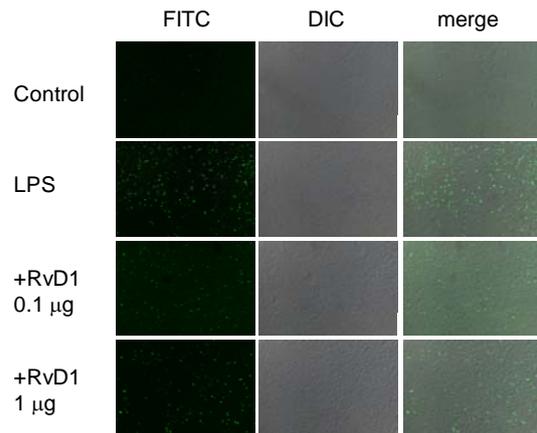


血中サイトカインに対するレゾルビン D1 の効果



血中 HMGB1 に対するレゾルビン D1 の効果

また、レゾルビン D1 は、LPS 投与後の腹腔内の好中球の増加を弱いながらも抑制する傾向にあった。さらに、LPS 投与後 5 時間で顕著に肝細胞アポトーシスが観察されたが、RvD1 はこれを抑制する傾向にあった。従って、RvD1 は本モデルにおいて、ケモカインである MCP-1 と臓器障害メディエーターである HMGB1 の血中濃度を抑制し、また、炎症局所への好中球の集積や、肝細胞のアポトーシスに対しても抑制的に働くことによって、エンドトキシンショックに対して保護的に働く可能性が示唆された。



肝細胞アポトーシスに対するレゾルビン D1 の効果 (TUNEL 染色)

## 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)

[学会発表] (計 1 件)

村上泰介、田村弘志、長岡功

「抗炎症脂質 resolvin D1 のエンドトキシンショック血中メディエーターに及ぼす影響」  
第 83 回日本細菌学会総会、2010 年 3 月 29 日、  
パシフィコ横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村上 泰介 (MURAKAMI TAISUKE)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：40384135

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

小幡 徹 (OBATA TORU )

東京慈恵会医科大学・DNA 医学研究所・准教授

研究者番号：80119776