

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590535

研究課題名(和文)敗血症における新規ターゲット分子サーチユインの解析

研究課題名(英文)Evaluation of sirtuin roles in septic shock

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、LPS刺激した単球系細胞と、敗血症モデルマウスを用いて、サーチユイン(SIRT1)活性調節の及ぼす影響を検討した。

RAW264.7細胞をLPS刺激する際にSIRT1選択的活性化剤を添加すると、IL-6の産生が抑制された。また、敗血症モデルマウスにおいても活性化剤はIL-6、MCP-1、IL-10産生を抑制する傾向にあり、生存率を改善した。一方、SIRT1阻害剤は細胞レベルでは炎症応答を抑制しないが、動物モデルにおいてTNF- α 産生を抑制し、生存率を改善する傾向にあることから、生体では単球系細胞からの炎症性サイトカインを介さない経路で敗血症に対する保護作用を示すと考えられた。

研究成果の概要(英文)：SIRT1 epigenetically regulates multiple physiological systems such as senescence, metabolism, and inflammation by acetylating their regulatory factors. In this study, we evaluated the effect of SIRT1 regulation on sepsis.

SIRT1 selective activator was found to suppress the release of IL-6 from LPS-stimulated mouse macrophage-like RAW264.7 cells, while selective inhibitor not affected the release. Intraperitoneal injection of SIRT1 activator suppressed and increased serum inflammatory cytokines and survival rate, respectively in cecal ligation and puncture (CLP) induced septic mice. Unlike in vitro results, SIRT1 inhibitor also suppressed the inflammatory cytokine, and slightly increased the survival rate of CLP mice.

Taken together, our results suggest that modulation of SIRT1 can potentially regulate the production of inflammatory cytokine, which is involved in the pathogenesis of septic shock.

研究分野：細菌学(含真菌学)

キーワード：敗血症 サーチユイン Lipopolysaccharide

1. 研究開始当初の背景

サーチュイン(Sirtuin)は、当初、酵母の遺伝子サイレンシング調節因子として発見された脱アセチル化酵素であり、ヒストンを脱アセチル化することで老化の原因となるゲノム不安定性を抑制している。ヒトではそのホモログである SIRT1 から SIRT7 までの7種類の仲間が発見され、それぞれ異なる細胞内局在を示して代謝、老化、ストレス応答、アポトーシスといった多くの生理的プロセスに参与する。サーチュインの活性化は細胞の寿命を延長することから、サーチュイン研究はこれまで主に糖尿病、癌、アルツハイマーといった老化関連疾患の分野が主であった。しかし、最近、SIRT1 および SIRT6 が、自然免疫において重要な役割を果たす転写因子 NF-κB の活性化を制御し、炎症反応を抑制することが見出された。さらに、SIRT1 アゴニスト作用のある植物性ポリフェノール、レスベラトロール(Resveratrol)が LPS (lipopolysaccharide; リポ多糖) による TNF-α の産生を抑制することなどが報告され、サーチュインが炎症性疾患の病態形成にも密接に関与している可能性が示唆されている。

一方、敗血症は感染によって起こる全身性の炎症反応であり、致死的な経過を辿ることの多い重篤な病態である。免疫担当細胞がパターン認識受容体を介して LPS などの微生物由来の病原因子によって活性化されると、細胞内へシグナルが伝わり、転写因子 NF-κB の活性化と、続く TNF-α をはじめとした多彩な炎症性メディエーターの産生が敗血症性ショックの引き金となることが知られている。サーチュインは NF-κB の活性化、TNF-α の産生を抑制することから敗血症治療におけるターゲットとして重要な価値を持つ可能性がある。しかしながら、現在までに敗血症においてサーチュイン分子が実際にどのような役割を果たしているのか、詳細な検討は為されていないのが実際である。

2. 研究の目的

本研究では脱アセチル化酵素であるサーチュインが敗血症においてどのような役割を果たすのか、さらにサーチュインを調節することが敗血症の病態にどのような影響を与えるのかに焦点を絞り、解明する。そのために、免疫担当細胞に菌体成分を作用させた際に、レスベラトロールやそのアナログのようなサーチュインアゴニストを作用させた場合や、阻害剤によりサーチュイン活性を抑制した場合に細胞の炎症応答がどのように変化するかを *in vitro* で評価する。

また、盲腸結紮穿孔(CLP)による敗血症モデルマウスにサーチュイン活性化剤、阻害剤を投与して、生存率や炎症性サイトカイン制御を受けるタンパク質の変化を解析する。

3. 研究の方法

(1) マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 は 10%FBS を添加した DMEM 培地で継代した。5x10⁴ cells/well で 96-well plate に播種した細胞を、一晚培養後、SIRT1 選択的活性化剤、阻害剤の存在下に 10 ng/ml の LPS(*E. coli* O111:B4 由来) で刺激し、一定時間後に回収した上清中の TNF-α および IL-6 産生を ELISA により測定して未刺激と比較した。また、同条件で刺激後に回収した細胞を protease inhibitor を含む RIPA buffer の添加によって lysate とし、抗 NF-κB 抗体を用いて免疫沈降し、さらに pan-acetyl 抗体によって p65 のアセチル化レベルを解析した。また、刺激後の細胞を核と細胞質に分画し、SIRT1 阻害剤、活性化剤存在下での NF-κB p65 の核内移行への影響を解析した。

(2) 敗血症モデル、すなわち Balb/c マウスを用いて盲腸結紮穿孔モデル(cecal ligation and puncture: CLP)を作製した。CLP 処置 2 時間前に腹腔内に Ex-527、SRT2104 を 10 mg/kg で投与し、24 時間後の血中サイトカイン濃度を Cytometric beads array 法によって測定した。また、72 時間後までの生存率を比較した。

4. 研究成果

(1) Ex-527 処理は RAW264.7 細胞の TNF-α、

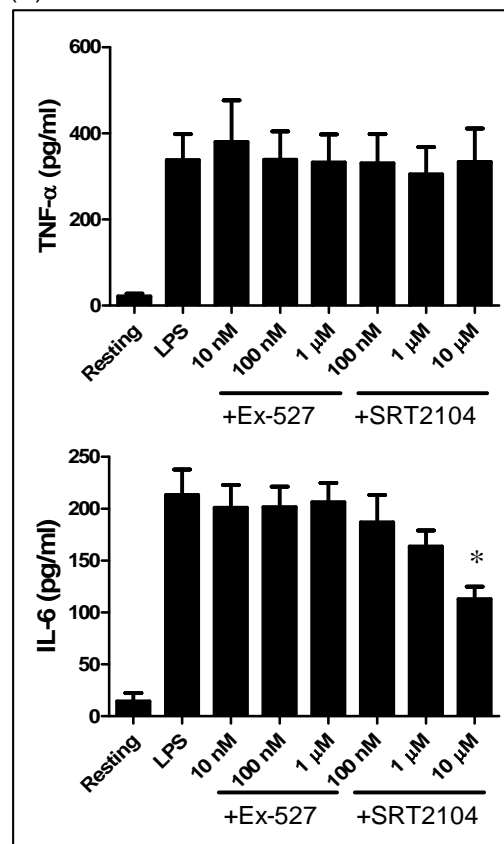


図 1

IL-6 産生に対して有意な変化をもたらさなかった。一方、SRT2104 処理は TNF- α の産生には影響しなかったが、IL-6 の産生を有意に抑制した(図 1)。また、LPS 刺激 30 分後の NF- κ B p65 の核内移行を Western blot によって解析したところ、Ex-527、あるいは SRT2104 存在下においても control と比較して有意な変化は見られなかった。また、その際 p65 の 310 番目のリシン残基を認識する抗体を用いて p65 のアセチル化レベルを解析したところ、本条件では有意な変化は見られなかった。

(2) *In vivo*での SIRT1 阻害剤、活性化剤の影響を調べるために、雄性、10 週令の Balb/c マウス(各群 18~20 匹)を用いて腸管結紮穿孔(CLP)による敗血症モデルを作成した。対照群として、Sham 手術群を置いた。本条件での CLP 処置群の生存率は、処置後 24 時間で 38%、72 時間で 17%であった。CLP 処置の 2 時間前に 10 mg/kg の投与量で Ex-527 あるいは SRT2104 を i.p. 投与し、生存率を解析した。興味深いことに、Ex-527 と SRT2104 はいずれも生存率を改善する傾向にあり、特に SRT2104 は、24 時間後の生存率が 84%、72 時間後の生存率が 47%と有意な改善を示した(図 2、 $p < 0.05$)

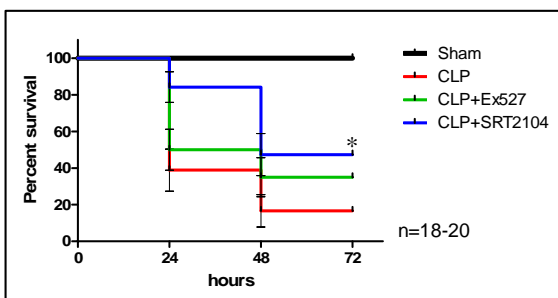


図 2

次に、血中サイトカイン濃度を BDTM Cytometric beads array を用いて測定した。炎症性関連サイトカインとして、TNF- α 、IL-6、MCP-1、IL-10、IL-12p70 および IFN- γ を測定した。CLP 処置により、これらのサイトカインのうち、TNF- α 、IL-6、MCP-1、IL-10 が有意に上昇した。IL-12p70 および IFN- γ は本条件では産生されなかった。Ex-527 投与群では、TNF- α の産生が有意に抑制された ($p < 0.05$)。また、IL-6、IL-10 の産生も有意ではないものの抑制傾向にあった。一方、SRT2104 投与群では IL-6 および IL-10 の産生が抑制される傾向にあり、特に IL-10 の抑制は有意であった ($p < 0.05$ 、図 3)

以上の結果から、SIRT1 活阻害剤、阻害剤の敗血症性ショックの病態への改善作用が明らかとなった。阻害剤 Ex-527 はマクロファージ系細胞に対しては炎症性サイトカイン産生抑制作用を示さなかったが、敗血症の病態では、TNF- α の産生を抑制し、生存率を改善することが示された。一般に敗血症の病

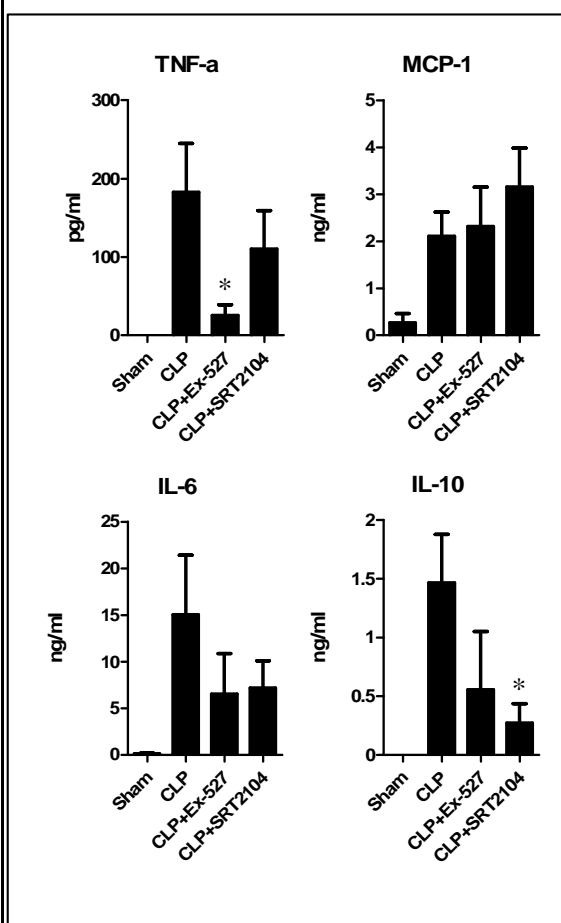


図 3

態では、TNF- α の炎症局所での産生を阻害すると却って重篤な転帰となることが知られているが、血中濃度が過剰となればやはり高サイトカイン血症となって死に至る。そのため、適切なタイミング、産生レベルで、必要な部位において産生されることが重要であると考えられている。Ex-527 が、炎症局所、すなわち本実験では腹腔内において、TNF- α の産生を抑制するか否かは本実験中には明らかにできなかったため、今後の課題とした。一方 SIRT1 選択的活性化剤 SRT2104 は、マクロファージ系細胞 RAW264.7 に対して、*in vitro*で有意な IL-6 産生の抑制作用を示した。*In vivo*では有意ではないものの同様に IL-6 産生を抑える傾向にあり、炎症の重篤度を緩和したために抗炎症性サイトカインである IL-10 の産生も抑制された可能性が考え得られる。

しかしながら、本実験では LPS 刺激によって NF- κ B p65 のアセチル化に有意な変化が起こらず、また、阻害剤、活性化剤によっても変化しなかったことから、これらの作用は NF- κ B のみならず他の炎症促進的経路に参与するシグナル伝達因子が SIRT1 によって調節を受けた結果の可能性は否定できない。SIRT1 によって脱アセチル化による活性修飾を受けるターゲット分子は既に NF- κ B 以外にも p53 等が報告されており、敗血症の病態に

において、病態形成に関わるシグナル伝達因子などを1分子だけではなくネットワークとして捉え、多角的に解析することが重要であると考えられる。

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 5件)

1. Takehara K, Murakami T, Kuwahara-Arai K, Iba T, Nagaoka I, Sakamoto K: Evaluation of the effect of recombinant thrombomodulin on a lipopolysaccharide-induced murine sepsis model. *Exp Ther Med* 2016 (in press) 査読有
2. Hu Z, Murakami T, Suzuki K, Tamura H, Reich J, Kuwahara-Arai K, Iba T, Nagaoka I: Antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 inhibits the pyroptosis of macrophages and improves the survival of polybacterial septic mice. *Int Immunol* 2016, pii: dxv113. 査読有
3. Murakami T, Hu Z, Tamura H, Nagaoka I: Release mechanism of high mobility group nucleosome binding protein 1 from lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Mol Med Rep* 13: 3115-3120, 2016. 査読有
4. Suzuki K, Murakami T, Hu Z, Tamura H, Kuwahara-Arai K, Iba T, Nagaoka I: Human host defense cathelicidin peptide LL-37 enhances the lipopolysaccharide uptake by liver sinusoidal endothelial cells without cell activation. *J Immunol* 196: 1338-1347, 2016. 査読有
5. Hu, Z., Murakami, T., Suzuki, K., Tamura, H., Kuwahara-Arai, K., Iba, T., and Nagaoka, I. (2014) Antimicrobial Cathelicidin Peptide LL-37 Inhibits the LPS/ATP-Induced Pyroptosis of Macrophages by Dual Mechanism. *Plos One* 9(1): e85765. doi:10.1371/journal.pone.0085765, 2014. 査読有

[学会発表](計 2件)

1. Murakami T, Hu Z, Suzuki K, Tamura H, Nagaoka I: Mechanism for the lipopolysaccharide-induced release

of high mobility group nucleosome-binding domain-1 from murine macrophage like RAW264.7. 48Th Annual Meeting of the Society for Leukocyte Biology Raleigh, USA, Sep. 28, 2015.

2. 村上泰介, 田村弘志, 長岡 功: LPS 刺激 RAW264.7 細胞からの HMGN1 の放出機序. 第 26 回日本生体防御学会学術総会 2015年7月10日 台東区生涯学習センター (東京, 台東区)

[その他]

ホームページ等

http://www.juntendo.ac.jp/graduate/labolabora/laboseikagaku_seitaibogyo/html/index_j.html

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

長岡 功 (NAGAOKA, Isao)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号: 60164399

射場 敏明 (IBA, Toshiaki)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号: 40193635