

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592323

研究課題名(和文)免疫監視細胞マクロファージを用いた急性炎症応答の評価

研究課題名(英文)Evaluation of the acute inflammation using macrophages

研究代表者

川前 金幸 (Kawamae, Kaneyuki)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：70254026

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)：集中治療管理において、生体炎症の程度は病態の予後に大きな影響を与える。生体細胞を用いて炎症等を定量的に解析することが出来れば、生体急性炎症メカニズムの解明ひいては臨床応用に非常に有用と思われる。本研究では、生体急性炎症のモニター指標として血球細胞に着目し、細胞内情報伝達制御因子ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)ファミリーの発現変化を検討した。ヒト血球系細胞株を用いて、DGKファミリーの発現パターン、ならびにLPS、IL2刺激における発現変動を解析した。その結果、DGKファミリーのうち、DGK ϵ が炎症応答初期に発現増強を示すことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In the case of intensive care management, the prognosis depends on the severity of the inflammation. If we can quantitatively assess the inflammation using cell samples from patients, it would be useful in clinical practice. In the present study, we focused on human blood-derived cell line and investigated the expression levels of diacylglycerol kinase (DGK) family, an enzyme involved in intracellular signal transduction, under physiological and stimulatory conditions with LPS and IL2. We found that DGK ϵ is upregulated in the initial phase of inflammation, suggesting that this isozyme is intimately involved in the inflammatory process.

研究分野：麻酔科学、救急医学

キーワード：急性炎症 ストレス 細胞内情報伝達機構 血球細胞 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

外科的手術、種々の要因による人工呼吸管理および重症肺炎等において集中治療が選択される場合、その過程における生体炎症の程度が病態の予後に大きな影響を与えることが少なくない。現在の周術期モニターシステムは、薬物の投与時間と連動して血圧や血ガス等の変動を経時的にモニタリングすることを可能にしているが、惹起される炎症応答は個体により大きく異なるので、生体細胞を用いて炎症等を定量的に解析することが出来れば、生体急性炎症メカニズムの解明ひいては臨床応用に非常に有用と思われる。

ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) は、脂質性二次伝達物質であるジアシルグリセロール (DG) をリン酸化してホスファチジン酸 (PA) に変換する酵素である。DG は、ホスホリパーゼ C (PLC) によるホスファチジルイノシトール 2 リン酸 (PIP₂) の加水分解により産生され、プロテインキナーゼ C (PKC) を活性化することにより、神経伝達や細胞の分化・増殖に関与することが報告されている。DGK はこの DG を量的に調節することで、PKC 活性を制御する分子と考えられている。また DGK の反応産物である PA が、近年新たに細胞内情報伝達分子としての作用を有することが明らかになり、DGK は細胞内情報伝達系における主要な制御因子であると考えられる。

近年、単離された髄鞘において、インターロイキン 2 (IL-2) の刺激により DGK の酵素活性が上昇することが報告され、DGK とサイトカインとの関連が示唆されている。一方、マウス T 細胞において、DGK が T 細胞受容体の応答に抑制的に働くことが示され、DGK ノックアウトマウス T 細胞のウイルス感染に対する反応性亢進が報告されている。また白血病細胞株において、単球系細胞への分化に伴い DGK の発現が減弱するとの報告もある。以上の知見は、DGK ファミリーが免疫機能の制御機構において重要な役割を果たすことを示唆する。

2. 研究の目的

本研究では、生体急性炎症のモニター指標として、生体免疫機能の最前線に位置し、生体炎症応答を監視する血球細胞に着目し、炎症応答の評価法を検討した。この時、細胞内情報伝達機構において脂質性二次メッセンジャー代謝酵素、ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) に着目し、その発現パターンおよび変動を指標として炎症応答の指標とした。

3. 研究の方法

DGK アイソザイムのプライマー設計：

既報の塩基配列を基に、ヒト (DGK₁、DGK₂、DGK₃) およびラット (DGK₁、DGK₂) の各 DGK アイソザイムに対するプライマーを合成した。

RT-PCR による mRNA 発現解析：

TRIzol Reagent (Invitrogen) を用いて、分離した細胞およびポリトロンホモジェナイザー破砕組織から、総 RNA を抽出した。総 RNA 2 μg から、オリゴ (dT) プライマーと Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase : M-MLV RT (Promega) を使用した逆転写酵素反応 (反応系 50 μl) により、first strand DNA を得た。このうち 1.5 μl をテンプレートとして、KOD plus DNA ポリメラーゼ (Toyobo) の存在下で、各プライマーセット (最終濃度 1.2 pM) を使用し 94 2 分前変性後、94 30 秒 / 62 30 秒 / 68 40 秒 33 サイクルの PCR 増幅 (反応系 25 μl) を行った。上記反応系から 8 μl をエチジウムブロマイド含有 2% アガロースゲルで電気泳動し解析した。PCR は正常ラット脾臓においてサイクル数の検討を行い、linear phase である 33 サイクルで統一し、バンドの輝度体積値をゲル撮影装置により測定し、その値を GAPDH の輝度体積値で除したものを、Kruskal-Wallis の検定で解析し、群間の有意差を検討した。LPS 誘発炎症反応の確認には、炎症性サイトカインである IL-6 の mRNA を同様の方法で解析した。

ヒト好中球、CD14、CD4、CD8、CD19 陽性細胞の分離：

健常成人からヘパリン添加末梢血採血し、1/5 量の 3% 白血球分離用デキストラン含有リン酸緩衝生理食塩水 pH 7.4 (PBS) を添加し、1 時間静置し、白血球を含む上清を回収した。その上清を FicolI-Paque Plus (Amersham) を充填した Leucosep 分離チューブ (Greiner) に添加後、1000 × g、10 分の遠心操作により、単核球層と多核球層に比重遠心分離した。多核球層は 0.2% 生理食塩水による溶血操作後、0.9% 生理食塩水に再浮遊させて好中球分画 (1~3% の好酸球を含む) とした。単核球層は PBS で洗浄後、2% ウシ胎児血清 (FBS) 含有 PBS に再浮遊させ、細胞濃度 1 × 10⁷ 個 / ml の単核球浮遊液に調節した。単核球浮遊液 1 ml に、分離する細胞種に対応した磁気ビーズ: Dynabeads M-450 CD4、M-450 CD8、M-450 CD19 (DynaI) をそれぞれ 1 × 10⁷ 個加え、室温、30 分反応後、磁石 (magnetic particle conector MPC, Dynal) を用いてビーズに付着した細胞を磁気分離した。CD14 陽性細胞は、ヘパリン添加末梢血 20 ml 由来のバッフィーコート (血小板・白血球層) に Dynabeads M-450 CD14 を加え同様に分離した。分離した細胞は磁気ビーズ結合細胞のまま総 RNA 抽出を行い、上記の方法で RT-PCR を行った。

フローサイトメトリーによる細胞集団の解析：

分離した細胞を 10% FBS 含有 RPMI 培地に浮遊させ、磁気ビーズ剥離試薬 (DETACHaBEAD, Dynal) を加え 37 °C、1 時間処理後に、細胞

から剥離した磁気ビーズを磁石によって除去した。その後、2% FBS 含有 PBS に再浮遊し、それぞれの細胞種を同定する抗体 (Anti-CD14-FITC、Anti-CD4-FITC、Anti-CD8-FITC、Anti-CD19-FITC、Beckman Coulter) で標識し、フローサイトメーターで陽性細胞の比率を測定した。

LPS 誘導炎症動物モデル：

動物実験には生後 10 週齢の Wistar 系ラットを使用した。ジエチルエーテル吸入麻酔下に PBS 溶解 LPS 25 mg/kg 総量 200 μ l を 26 ゲージの注射針で腹腔内投与した。LPS 投与後、30 分、6 時間、24 時間に脾臓を採取した。生理食塩水 200 μ l を同様に腹腔内投与し 6 時間後に脾臓を採取した生理食塩水投与群と、腹腔内投与を行わない無処置群も含め、各評価時間において 3 匹以上を実験に用いた。ジエチルエーテル吸入深麻酔下に脾臓を速やかに取り出し、液体窒素で急速に凍結後、-80 に保存した。

血球系細胞株を用いた刺激実験：

細胞株：KG-1、HUT102、Jurka を 10% 牛胎児血清 (FBS) 含有 RPMI 培地にて、37、5% 二酸化炭素、98% 水蒸気の恒温器内で培養した。細胞密度 1×10^6 個/ml の時点で、ヒトリコンピナントインターロイキン 2 (rhIL-2, Sigma) 200 U/ml、大腸菌抽出 LPS (Sigma) 200 ng/ml、12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA, Cell signaling) 200 nM を添加し、経時的に細胞から総 RNA 抽出を行った。

ウエスタンブロットによる蛋白発現解析：

得られた細胞総抽出液を 10% SDS-ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行った後、PVDF-Plus 膜に転写し、5% スキムミルク、0.2% Tween20 含有トリス緩衝生理食塩水 (TBS) でブロッキングした。一次抗体にマウス抗 FLAG-M2 抗体 (1 μ g/ml, Sigma)、二次抗体に西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗マウス IgG 抗体 (1:20000, Amersham) を用い、ECL +Plus Western blotting detection Kit (Amersham) 検出した。TPA 刺激実験における PKC のウエスタンブロット解析では、刺激後経時的に細胞を採取し、上記と同様に細胞抽出液を得た。さらに 100,000 \times g、30 分の遠心分離で、可溶性分画と不溶性分画に分離した。一次抗体にウサギ抗 PKC / 2 リン酸化抗体 (Cell Signaling)、二次抗体に HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Amersham) を用いた。

4. 研究成果

正常ヒト免疫担当細胞における DGK アイソザイム mRNA の発現：

9 種のヒト DGK アイソザイムを検出するため、各アイソザイムのプライマーセットを設定した。すべてのアイソザイムが発現している

ヒト脳組織において、各アイソザイムの目的塩基長の単一バンドが増幅されることを確認した。次に、健康成人男性より末梢血を採取し磁気ビーズを用いて、CD14 陽性細胞 (単球、好中球の一部)、CD4 陽性細胞 (ヘルパー/インデューサー T 細胞)、CD8 陽性細胞 (サイトトキック/サブプレッサー T 細胞)、CD19 陽性細胞 (B 細胞) のサブタイプに分離した。分離効率は CD14 陽性細胞では 78.1%、CD4 陽性細胞では 97.6%、CD8 陽性細胞では 99.4%、CD19 陽性細胞では 98.0% と、いずれも高い値を示した。

これらの分離細胞における DGK アイソザイム mRNA の発現を RT-PCR 法で検討したところ、DGK、 δ 、 ϵ mRNA は、すべての細胞種で発現が認められ、特に DGK mRNA は T 細胞 (CD4 および CD8 陽性細胞) において強く発現していた。DGK mRNA は CD8 陽性細胞以外のすべての細胞において発現が認められ、特に単球 (CD14 陽性細胞) で強く発現していた。DGK、 δ mRNA はいずれの細胞種でも発現が認められなかった。DGK mRNA は CD19 陽性細胞以外のすべての細胞において発現が認められた。DGK、 δ mRNA は、脳で発現を認めるものの、免疫担当細胞では発現が認められなかった。

ラット LPS 誘導炎症モデルの解析：

炎症反応下の免疫担当細胞における DGK アイソザイムの役割を検討するため、正常および LPS 誘導炎症モデルの脾臓において、DGK アイソザイム mRNA の発現変化をラット DGK アイソザイムプライマーセットを用いて RT-PCR 法で検討した。正常ラット脾臓では DGK、 δ 、 ϵ mRNA の発現が検出され、DGK、 δ mRNA は検出限界以下であった。LPS 投与により、炎症反応が誘発されたこと確認するため、炎症性サイトカインの代表である IL-6 mRNA の発現を検討した。IL-6 mRNA のコントロール GAPDH に対する発現量は、無処置群と比較し、LPS 投与後 30 分群、6 時間群、24 時間群の 4 群間で、有意な上昇を認め、炎症反応が誘導されていることが確認された。一方、生理食塩水投与後 6 時間群においても、無処置群に比べ約 2 倍の IL-6 mRNA の増加が認められた。

このような炎症反応下において、各 DGK アイソザイム mRNA の発現量を比較すると、無処置群と比較し、DGK は増加傾向を、一方 DGK および DGK は減少傾向を示した。また DGK ではほとんど変化を示さなかった。これらの変化を統計的に解析すると DGK mRNA は 5 群間で有意に増加し、特に無処置群に対し、LPS 投与 6 時間群では約 2 倍に上昇していた。また DGK mRNA は 5 群間で有意に低下した。DGK、 δ mRNA の発現量は、有意な変化を示さなかった。DGK、 δ mRNA は炎症反応下においても発現が検出できなかった。以上のデータにより、LPS 誘導炎症モデルにおいて、DGK アイソザイムが各々特徴的な変

化を示すことが示唆された。

血球系細胞株を用いた刺激実験：
細胞レベルでの刺激応答における、DGK アイソザイム mRNA の発現変化を検討するため、リンパ球系細胞株の HUT102 と顆粒球系細胞株の KG-1 を用いた刺激実験を行った。刺激物質は LPS、IL-2 と TPA の 3 種を用いた。LPS 刺激に対して HUT102 および KG-1 いずれの細胞株においても、DGK アイソザイムのうち、DGK mRNA は刺激早期に著明な増加を示し、添加後 20 分でピークに達し、40 分及び 60 分では徐々に減少傾向を示した。また HUT102 において、DGK と の mRNA が、刺激後 20 分で減少し、その後、徐々に刺激前の状態まで回復し、さらに増加する傾向を示した。他のアイソザイムは、刺激前後において変化を示さなかった。

HUT102 に対する IL-2 刺激では、DGK mRNA が刺激後 20 分で上昇し、40 分をピークとし、60 分には減少に向かう傾向を示した。他のアイソザイムは、刺激前後において変化を示さなかった。

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3件)

- 1) Yamamoto M, Tanaka T, Hozumi Y, Saino-Saito S, Nakano T, Tajima K, Kato T, Goto K. Expression of mRNAs for the diacylglycerol kinase family in immune cells during an inflammatory reaction. *Biomed Res.* 2014;35:61-8. doi.org/10.2220/biomedres.35.61 査読有
- 2) Yoshioka J, Nakane M, Kawamae K. Healthcare Technology Management (HTM) of mechanical ventilators by clinical engineers. *J Intensive Care.* 2014; 2(27). doi:10.1186/2052-0492-2-27 査読有
- 3) Goto K, Tanaka T, Nakano T, Okada M, Hozumi Y, Topham MK, Martelli AM. DGK under stress conditions: "To be nuclear or cytoplasmic, that is the question." *Adv Biol Regul.* 2014;54:242-53. doi:10.1016/j.jbior.2013.08.007 査読有

[学会発表](計5件)

- 1) 後藤 薫：一酵素ファミリーから見た生命現象-脂質性二次メッセンジャー代謝酵素ジアシルグリセロールキナーゼの機能解析. 第 60 日本解剖学会・東北北海道地方会、福島学院大学(福島); 2014 年 9 月 6 日
- 2) Goto K: Functional implications of DGK family in stress response. Science Research Center symposium "Phospholipid-mediated Signaling in Brain", Ulsan (Korea); December 15, 2013.
- 3) Kumasaka A, Kanazawa K, Nakane M,

Kawamae K, Miura Y: Comparisons of protocol and isoflurane at electroencephalographically equivalent doses on outcomes from severe forebrain ischemia in the rat. *Euroanaesthesia 2013*, Barcelona (Spain); June 1, 2013

4) 松井祐興, 後藤 薫: イプシロン型ジアシルグリセロールキナーゼの細胞内局在化機構と小胞体ストレスにおける機能的役割. 第 118 回日本解剖学会総会、サンポートホール高松(高松); 2013 年 3 月 29 日

5) Iwabuchi M, Oda S, Nakane M, Kawamae K: Comparison of stress response, remifentanyl with epidural anesthesia on excessively invasive abdominal surgery -a prospective study-. *ASA annual congress 2012*, Washington (USA); October 13, 2012

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川前 金幸 (KAWAMAE, Kaneyuki)
山形大学・医学部・教授
研究者番号: 70254026

(2) 研究分担者

後藤 薫 (GOTO, Kaoru)
山形大学・医学部・教授
研究者番号: 30234975