

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592338

研究課題名(和文)プロポフォールの樹状細胞刺激作用の生体防御、免疫病理への影響

研究課題名(英文)The immunomodulatory effect of propofol on dendritic cell and immune response induced by dendritic cells

研究代表者

藤野 裕士(Fujino, Yuji)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50252672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：樹状細胞は最も強力な抗原提示細胞として免疫応答の始動と調節に重要な役割を果たす。申請者は今までに鎮静薬と麻酔薬が樹状細胞機能と樹状細胞によって惹起される免疫応答に焦点を当てて研究してきた。本研究では最も頻用される麻酔薬であるプロポフォールの樹状細胞機能に与える影響を詳細に解析を行った。プロポフォールは樹状細胞の分化成熟を促進してリンパ球のTh1への分化を促進した。さらに個体レベルのTh1型の免疫応答を促進した。この免疫刺激作用はプロポフォール製剤の脂質懸濁液成分に由来するものであることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Dendritic cells (DCs), as antigen-presenting cells, play a key role in the induction and regulation of adaptive immune response. Propofol is reported to have immunomodulatory properties that affect immune cells. However, the effect of propofol on DCs has not been characterized. We examined the immunomodulatory properties of propofol on DC-mediated immune response. Propofol promoted the functional maturation of murine DCs and augmented DC induction of T helper 1 immunity in the whole mouse. In addition, it appears that the immunostimulatory effect of propofol is attributed to the component of lipid emulsion rather than anesthetic propofol itself.

研究分野：周術期管理医学

キーワード：樹状細胞 プロポフォール 脂質懸濁液 Th1/Th2 接触過敏症

### 1. 研究開始当初の背景

麻酔薬と免疫系との関係は古くからある研究分野であり、様々な形で麻酔薬が免疫系に与える影響は追求されてきた。従来行われてきた研究は試験管内での研究が多数を占めているために、麻酔薬の生体個体レベルへの影響は疑問視する意見も多い。すなわち麻酔薬鎮静薬は免疫系や生体防御に与える影響は無視できるものであろうとの考え方が多かった。

樹状細胞は最も強力な抗原提示細胞として強力な免疫制御作用を持っているために、その研究がワクチン開発、腫瘍免疫、感染防御などの分野で関心が持たれている。申請者らは近年、麻酔薬と免疫系の関係を樹状細胞という細胞の観点から見直して研究してきた。そのなかでベンゾジアゼピン系薬物は樹状細胞に対して臨床使用濃度内で抑制的に働くこと、さらに樹状細胞に作用することで動物個体レベルの免疫応答に影響を与えることを世界に先駆けて示してきた。

今までの臨床的な報告でプロポフォールを用いた麻酔薬が対照群として選ばれ他の麻酔薬を用いた麻酔が炎症性サイトカインの産生が抑えられているという報告が散見されていた。ほれは観点を変えるとプロポフォールの側に免疫刺激的な要素がある可能性を示唆している。さらに私たちの研究でも鎮静薬麻酔薬全般がどちらかといえば免疫応答に対して抑制的に働くのに対してプロポフォールは免疫を活性化する傾向があることを示唆するデータを試験管内の細胞を中心とした予備的実験から私たちは得ていた。このプロポフォールの免疫系への作用をより詳細を追求することを本研究の目標とした

### 2. 研究の目的

麻酔集中治療の分野で樹状細胞に対する麻酔鎮静薬の詳細な影響を解析してきた報告は他にない。また上述したように麻酔薬の生体レベルでの免疫応答への影響を評価した研究は厳密には私たちの研究をおいてない。その意味でも現代の臨床麻酔で最も臨床使用される麻酔薬を私たちの実験系を用いて詳細に解析するのは意義深い。また臨床的研究と私たちの予備的研究からも他の麻酔薬と異なる免疫系への影響が示唆されている。プロポフォールには他の麻酔薬にない重篤な合併症である Propofol infusion syndrome がある。この合併症の本態は現時点では全く未解明である。脂質の取り込み障害が想定されるが現象論にとどまっており詳細は不明である。この原因不明の合併症の発生病理に免疫系の関与を積極的に除外することはできない。現時点で示唆されるプロポフォールの免疫系への作用は炎症を促進する性質である可能性もある。本研究によってプロポフォールの免疫系への作用の詳細が解明されることで propofol infuseon syndrome の病

態の一端を知る端緒になることも目指している。

### 3. 研究の方法

本研究は4つの部分に分けることができる

(A) プロポフォールの樹状細胞の機能に対する影響の解析

(B) プロポフォールが個体レベルの免疫応答に与える影響の解析

(C) プロポフォールは麻酔薬としての化合物が脂質懸濁液に封入する形で成立している薬剤である。プロポフォールのどの成分がプロポフォールの免疫刺激作用の原因になっているのかを解析

(D) 今までのベンゾジアゼピン系薬物の樹状細胞を始めとする免疫細胞の免疫制御作用の分子メカニズムの追求

(A-1) C57BL/6 マウスの骨髄細胞を GM-CSF の存在下に培養して未熟樹状細胞を誘導する。この未熟樹状細胞にリポ多糖 (LPS) を作用させて樹状細胞の活性化を誘導する。活性化の指標として副刺激分子の CD80, CD86 をフローサイトメトリーにて、分泌されるサイトカインの IL-12p-40 を ELISA 法によって測定する。分化成熟過程にプロポフォールを存在させる群と、対照群を作成して成熟分化過程に対する影響を評価する

(A-2) 樹状細胞に対してプロポフォールの影響を解析した後、変化した樹状細胞機能が T 細胞の活性化に与える影響を調べるために、mixed cell culture 法によって T 細胞の活性化への影響を調べる。樹状細胞は同様に C57BL/6 マウスより準備し、プロポフォールで処理した群と対照群を作成する。これと反応させる responder 細胞として MHC の異なる Balb/C マウスから分離した T 細胞を磁気ソーティングによって調整する。これら樹状細胞と T 細胞を混合して 5 日間培養する。培養の最後 12 時間の時点で放射性ラベルチミンを添加し T 細胞の増殖能を評価する。さらに培養上清中に分泌されるインターフェロン (IFN-) によって Th 1 への分化を評価する

(B-1) 次に樹状細胞の性質への影響が個体レベルでの免疫応答に影響を与えるのかを接触過敏症モデルを用いて評価する。接触過敏症モデルは接触アレルギーの動物疾患モデルであり、古典的にはハプテンをあらかじめ体に塗布しておきその数日後にハプテンを再塗布すると塗布部が腫脹するという免疫疾患モデルである。ここでは樹状細胞の移入によって発症する接触過敏症モデルを用いて評価する。骨髄より誘導した樹状細胞をハプテンである DNFB を溶かしたメジウム中

で培養してハプテンを樹状細胞にロードする。この樹状細胞をプロポフォル処理群とみ処理群を作成しておく。ハプテンを取り込ませた樹状細胞を腹腔内投与して移入する。移入後5日目にマウスの耳介部に DNFB と同様の抗原性を持ち脂溶性の DNBS を塗布して接触過敏症の発症を誘導する。対照群では耳介は腫脹するのでこれをマイクロメーターによって測定する。樹状細胞のプロポフォル処理の有無による耳介腫脹の変化を解析する。

(C-1) プロポフォルは、イントラリピッドのような臨床的に使用される栄養製剤としての脂質懸濁液にプロポフォルの麻酔成分を混ぜた状態の製剤である。脂質には様々な生理活性があるために麻酔薬であるプロポフォルの麻酔成分そのものと溶媒である脂質懸濁液のどちらに免疫刺激作用があるのかを次に解析する。本研究で用いたプロポフォル製剤の脂肪懸濁液はリポフンディンであり、これを用いた実験群を作成した

- (1) PBS 群
- (2) リポフンディン群
- (3) 脂質溶媒にプロポフォル麻酔成分を溶かした群
- (4) プロポフォル製剤群  
これらの実験群を作成し、樹状細胞の分化過程への影響を樹状細胞に発現される副刺激分子である CD80 の発現の増減によって解析した

(D-1) 現在までに申請者が遂行してきた免疫細胞に対するベンゾジアゼピンの作用メカニズムの追求も合わせて行った。作用メカニズムの解析上、primary culture の細胞を使用した実験は困難であるので本実験に関しては安定したマクロファージ細胞株である RAW264 を用いて実験を遂行した。ラ W 2 6 4 に対して LPS を添加すると活性化して、樹状細胞の場合と同様に副刺激分子の発現が上昇するとともに炎症性サイトカインである IL-6 の産生が亢進することがわかっている。ここに代表的なベンゾジアゼピンであるミダゾラムを併存させてマクロファージの活性化がどのように変化するのかを解析した。さらに LPS のシグナル伝達系への影響を評価するために NF- $\kappa$ B の転写活性を NF- $\kappa$ B のレポーターアッセイによって評価を行った。LPS からの

(D-2) 次にベンゾジアゼピンの結合分子として可能性のある GABAA 受容体と末梢性ベンゾジアゼピン受容体 (peripheral benzodiazepine receptor 近年は Translocator protein TSPO と呼ばれ以下 TSPO と略す) のリガンドを RAW264 の活性化過程に併存させてミダゾラムと同様の変化を示す化合物を調べた。評価する項目は副刺激分子の発現と IL-6 の発現、加えて NF-

B のレポーターアッセイである。

(D-3) 候補となる結合分子に対する siRNA を neon transfection system によって RAW264 に導入してノックダウン RAW264 細胞を作製しこれに対するミダゾラムを作用させて活性化の過程への影響を今までと同様副刺激分子の発現と炎症性サイトカインである IL-6 の発現への影響から調べた。

#### 4. 研究成果

(A-1) プロポフォルの樹状細胞への作用  
未熟樹状細胞を LPS によって分化させると副刺激分子である CD80, CD86 の発現が上昇し、Th1 を誘導するサイトカインである IL-12p40 の産生が上昇する。この過程にプロポフォルが存在していると CD80, CD86 とも発現が増強した。また同様に IL-12 の分泌も促進された。またこれらの変化は容量依存性であった。これらの結果はプロポフォルが樹状細胞の成熟分化過程を促進し、リンパ球の Th1 への分化を促進する環境を作る可能性がある結果である。

(A-2) 次にこのような樹状細胞の性質の変化がリンパ球の活性化と分化過程への影響を調べた。方法でのべたように Mixed cell culture 法によってこれを評価した。プロポフォルで処理した樹状細胞はトリチウム標識チミジンの取り込みで評価する T リンパ球の増殖を促進した。またリンパ球からのサイトカイン産生は Th1 への分化のマーカーである IFN- $\gamma$  の産生が亢進した。これはプロポフォルによって樹状細胞の成熟分化が促進されて Th1 にリンパ球を誘導する活性が亢進したと考えることができる。

(B) プロポフォルの樹状細胞への影響が動物個体レベルでの免疫応答に与える影響を接触過敏症モデルで評価した。樹状細胞にハプテンである DNFB を取り込ませて通常マウスに移入して免疫後5日に耳介にハプテンを塗布すると耳介は腫脹した。次にプロポフォルの存在下で分化させた樹状細胞は接触過敏症反応を亢進させた。接触型過敏症モデルは典型的な Th1 型の免疫応答により引き起こされる疾患モデルであることが知られている。よってプロポフォルで処理した樹状細胞で接触過敏症が亢進したのは樹状細胞がプロポフォルにより Th1 を誘導しやすい状態に分化したからだと考えられた。これは(A-2)で示した in vitro の実験結果でプロポフォルの存在下で成熟した樹状細胞が T 細胞を Th1 型に分化させやすくなった実験結果と一致している。これらからプロポフォルは樹状細胞の細胞レベルのみならず、個体レベルの免疫応答に影響を与えることを強く示すデータが得られたと考えている。

(C)次にプロポフォル製剤のどの成分が樹状細胞の分化促進に重要であるのかを追求した。方法の部で上述した(1)-(4)の実験群を作成した。プロポフォル群とPBS群の比較ではプロポフォル群がCD86の発現の増加が認められた。一方でプロポフォル製剤の溶剤である脂質懸濁液のみの群(リポフンディン群)でもCD86の発現増加が認められた。さらに脂質溶媒(DMSO)にプロポフォルの麻酔成分を溶解したものではCD86の発現はPBS群と差は認めなかった。これはすなわちプロポフォル製剤の樹状細胞の分化成熟過程に対する影響はプロポフォルの麻酔成分によるというよりは溶媒である脂質懸濁液成分に由来するものであることが示唆される結果である。プロポフォルの脂質懸濁液は主として大豆油に由来する。大豆油に含まれる遊離脂肪酸の成分が直接的に Toll like receptor4(TLR4)のリガンドとして働き炎症性変化を惹起するという近年の報告にも私たちの研究結果は合致している。

(D-1) RAW264はLPSの刺激によって副刺激分子の発現が上昇し、IL-6の分泌が亢進した。これはLPSによってRAW264が活性化したことを示す。ここにミダゾラムを併存させるとCD80の発現は低下し、IL-6の分泌は減少した。さらにNF- $\kappa$ BのレポーターアッセイによってもミダゾラムはNF- $\kappa$ Bの転写活性を抑制していることが示された。以上よりミダゾラムがRAW264のLPSによる活性化を抑制したことを示している

(D-2) GABA-A受容体リガンド(ムシモル、ピガバトリン)、TSPOリガンド(エチフォキサイン、FGIN-1-27)のいずれかをRAW264の活性化過程に併存させた。GABA<sub>A</sub>受容体リガンドの存在下ではRAW264の活性化は影響されず表面分子、IL-6の産生とも変化を認めなかった。一方でTSPOリガンドを併存させておくとミダゾラムの時と同様にCD80の発現は低下し、IL-6の分泌も低下した。この結果は、ミダゾラムは中枢神経系における中心的な作用分子であるGABA-A受容体ではなく、TSPOを介して作用していることを強く示唆する結果である。複数のTSPOリガンドで同様の結果が得られたことから、特有のリガンド自身の作用であることは除外できると考えられた。

(D-3) 今までの実験結果からミダゾラムはTSPOを介してRAW264に作用することが示唆されたが、これを完全に分子レベルで証明するためにTSPOの発現を低減させた細胞を持った解析を行った。まずTSPOに対するsiRNAをNEON transfection systemによってRAW264に導入するとTSPOのmRNAの発現は低減されたことが確認できた。次にTSPOをノックダウンしたRAW264細胞をミダゾラムの存在下、非存在下にLPS

によって活性化を行った。ミダゾラムによってRAW264の活性化が抑制されるのは今までと同様であったが、TSPOをノックダウンした細胞ではミダゾラムによる抑制効果が低減された。これはCD86、IL-6とも同様の結果であった。この実験結果からミダゾラムはTSPOを介してRAW264に作用していることが分子レベルで証明されたといえる。GABA<sub>A</sub>受容体を介しての作用は現時点では他の報告を鑑みても無いとは言えないが、少なくともTSPOを介する作用が存在することが私たちのこの度の研究から証明された。

## 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. Haloperidol suppresses murine dendritic cell maturation and priming of the T helper 1-type immune response  
Anesth Analg. 2015 ;120:895-902.  
Matsumoto A, Ohta N, Goto Y, Kashiwa Y, Yamamoto S, Fujino Y.

2. The comparison of spontaneous breathing and muscle paralysis in two different severities of experimental lung injury.  
Crit Care Med. 2013 ;41:536-45.  
Yoshida T1, Uchiyama A, Matsuura N, Mashimo T, Fujino Y.

3. Spontaneous breathing during lung-protective ventilation in an experimental acute lung injury model: high transpulmonary pressure associated with strong spontaneous breathing effort may worsen lung injury.  
Crit Care Med. 2012 ;40:1578-85.  
Yoshida T1, Uchiyama A, Matsuura N, Mashimo T, Fujino Y.

[学会発表](計 5 件)

ミダゾラムはTSPOを介してマクロファージの活性化を抑制する  
第62回日本麻酔科学会 2015年6月28日-30日 神戸

麻酔科医がコマンダーとして活躍するために  
第62回日本麻酔科学会 2015年6月28日-30日 神戸

n3/n6 不飽和脂肪酸を主成分とする脂肪製剤の樹状細胞を介する免疫応答に与える影響  
第41回日本集中治療医学会学術総会  
2014年2月28日-2014年3月1日

京都

ミダゾラムは樹状細胞による抗原特異的な  
応答を抑制する

第40回日本集中治療医学会学術総会

2013年2月28日-3月2日

松本

プロポフォールは樹状細胞によって誘導さ  
れるTh1型免疫応答を促進する

第59回日本麻酔科学会学術総会

2012年6月7日-2012年6月9日

神戸

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤野 裕士 ( Fujino Yuji )

大阪大学 医学系研究科 教授

研究者番号: 50252672

### (2) 研究分担者

大田 典之 ( Ohta Noriyuki )

大阪大学 医学部附属病院 助教

研究者番号: 60379162

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: