

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791946

研究課題名(和文)敗血症病態における単球系細胞死の機序解明と炎症消退脂質による新しい治療法の開発

研究課題名(英文)Mechanisms underlying the monocytic cell death in sepsis and development of new treatments by pro-resolving lipid mediators

研究代表者

中山 力恒(Nakayama, Yoshinobu)

京都府立医科大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：90568198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：LPSを用いた単球系細胞敗血症モデルにおいて、細胞死、貪食能低下が経時的に引き起こされ、高糖濃度環境下ではこれらが促進した。そのメカニズムとして小胞体ストレスの関与が示唆された。また、炎症消退脂質であるレゾルビンD2投与により細胞死、CHOP発現の抑制、貪食能の改善を認め、敗血症に対する薬物治療へ応用できる可能性があると考えられる。さらに、次世代シーケンサーを用いたmicroRNAの網羅的解析を行い、予備実験段階ではあるがmiR-211、-204といったmicroRNAの変化を認め、今後更に敗血症におけるmicroRNAの関与についても検討していく予定である。

研究成果の概要(英文)：To develop an in vitro model of sepsis, monocytic cells were exposed to lipopolysaccharides and high glucose, which induced apoptosis and reduced phagocytosis. Our results indicate that endoplasmic reticulum stress is involved in sepsis, as an upstream regulatory mechanism. Resolvin D2, a lipid mediator involved in the resolution of inflammation, suppressed apoptosis, reduced C/EBP homologous protein expression, and improved phagocytosis, indicating that Resolvin D2 has therapeutic potential for sepsis. We are in the process of exhaustively analyzing the role of microRNAs in our model of sepsis by using Illumina PGM next-generation sequencing, and in our preliminary experiments, we have observed changes in some microRNAs, including miR-211 and miR-204. We will further examine the potential of microRNAs for use in sepsis treatment in the future.

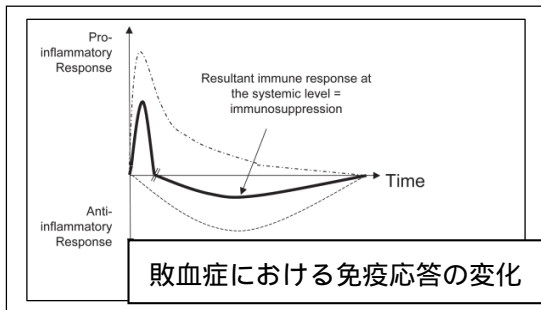
研究分野：集中治療医学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：敗血症 高血糖 単球系細胞 炎症消退脂質

### 1. 研究開始当初の背景

敗血症病態において、近年、免疫担当細胞の細胞死や機能低下に伴う免疫抑制による炎症の持続が予後悪化の大きな要因と考えられている (Vincent JL, et al. Sepsis definitions: time for change. Lancet. 2013;381:774-5)。敗血症患者において生体内の単球、T細胞、B細胞等の免疫担当細胞の細胞死による細胞数減少を認める報告 (Skrupky LP. Advances in the management of sepsis and the understanding of key immunologic defects. Anesthesiology. 2011 Dec;115(6):1349-62)や LPS 投与によってマクロファージの貪食能の低下を認める報告 (X Feng, et al. Lipopolysaccharide inhibits macrophage phagocytic neutrophils by regulating the production of tumor necrosis factor  $\alpha$  and growth arrest-specific gene 6. Immunology. 2011 Feb;132(2):287-95) 等がある。



また、重症敗血症患者において、ストレス性高血糖が予後を決定する因子となることが報告されている (Critical Care Medicine, 2008;36:2407-13) が、これらの細胞内情報伝達系における機序についての報告は少ない。

今回我々は、敗血症病態における単球系細胞死及び機能低下の細胞内情報伝達系のメカニズムを解明するに当たり、小胞体ストレスおよび PI3K-Akt 経路に着目した。

小胞体は、タンパク質の合成および折りたたみなどのプロセッシングを行っているが、感染や炎症といったストレスにより変性タンパク質が小胞体内に蓄積する。細胞は本来、この小胞体ストレスに対し恒常性を維持する機である小胞体ストレス応答 (UPR) が働き、細胞生存へと機能するが、これを越えるストレスに暴露されると、転写因子 CHOP が関与する経路などを介してアポトーシスが誘導される。神経性疾患、糖尿病、癌といった一部の病態、疾患において、UPR に異常を生じることが知られている。敗血症病態においては、CHOP ノックダウンマウスにおいて LPS 投与による肺障害が抑制される報告 (Endo M, et al. J Immunol. 2006 ; 176 : 6245-53) や、敗血症モデルマウスの脾細胞で細胞死が増加し、それに伴い GRP78、CHOP などの発現増加が観察された報告 (Ma T, et al. Eur Surg Res. 2008;41:219-25.) があるが、単球系細胞における敗血症病態時の細

胞死と小胞体ストレスの関係はあまり知られていない。

また、炎症消退脂質として注目されているレゾルビン D2 が、好中球への遊走性の抑制や貪食能促進等により盲腸結紮穿孔による敗血症モデルマウスの生命予後を改善する報告 (M Spite. Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. Nature. 2009 Oct 29; 461 (7268): 1287-91)等があり、敗血症をはじめとする炎症性疾患への応用が期待されている。

さらに近年、タンパク質をコードしない 21-24 塩基程度の小分子 RNA である microRNA(miRNA)が、細胞の発生、分化、増殖、癌化およびアポトーシスなどの様々な細胞機能の発現に関わっていると考えられている。

我々は敗血症病態および高血糖環境における単球系細胞死、機能低下に対するレゾルビン D2 による抑制効果と miRNA の変化を観察し、今後の敗血症治療の可能性を検討する。

### 2. 研究の目的

(1) 糖濃度の異なる培養液を用いて培養し、単球系培養細胞 THP-1 細胞およびヒト Monocyte/Macrophage における LPS 投与後のアポトーシス、貪食能の変化と細胞内情報伝達系の変化およびそれらの関係などへの糖濃度による影響を観察する。

(2) RNAi 法を用いて、アポトーシスおよび貪食能を制御する遺伝子をターゲットとした遺伝子抑制を THP-1 細胞もしくはヒト Monocyte/Macrophage に行い、それぞれの変化を観察する。

(3) レゾルビン D2 を投与することによってアポトーシスおよび貪食能の変化を観察し、敗血症病態に対する薬物治療への応用を考える。

(4) Ion PGM システムを使用し、LPS 投与後の THP-1 細胞もしくはヒト Monocyte/Macrophage における microRNA の発現の変化を観察する。

### 3. 研究の方法

5.5mM(normal glucose NG 群)、15mM (high glucose HG 群) グルコースの糖濃度の培養液および浸透圧コントロールとして 5.5mM グルコース培養液に 9.5mM マンニトールを加えた培養液(mannitol 群 M 群)を用い、72 時間培養を行う。LPS 負荷および糖濃度によるアポトーシス、貪食能、細胞内情報伝達系として小胞体ストレスおよび Akt のリン酸化 (p308) の変化を観察し、それぞれの糖濃度による変化を比較検討した。

ヒトマクロファージの分離は、健常成人より静脈血を採血し、Histopaque1077 を用いた比重による分離を行った。PBS(-)にて洗浄後、自己血清の入った培養液に 2 時間培養し、浮遊細胞を取り除いた後、M-CSF を加えた培養液に交換後 7 日間培養し、それぞれの実験を

行った。

(1) アポトーシス：フローサイトメトリー法を用い、ミトコンドリア膜電位、Caspase9、Caspase3、PI の変化を観察した。

(2) 貪食能の変化：200nM の Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) を負荷してマクロファージ様細胞に変化させた THP-1 細胞、およびヒトマクロファージ細胞に対し、病原菌貪食能および資産傍貪食能の変化を測定した。

病原菌貪食能の測定：Vybrant Phagocytosis Assay kit を用い、蛍光標識された大腸菌の Particle を貪食させ、蛍光プレートリーダーで測定した。

死細胞貪食能の測定：蛍光染色 (CellTracker™ Green CMFDA を使用) したアポトーシスを起こした好中球を貪食させ、蛍光プレートリーダーを用いて測定した。

(3) 細胞内情報伝達系として、炎症時に発現が増加するといわれている小胞体ストレス (CHOP) の発現の変化を Real-Time PCR (StepOnePlus リアルタイム PCR システム Applied Biosystems を使用) および Western blot 法を用いて測定した。

(4) 細胞保護に働くと考えられる Akt のリン酸化の変化についてフローサイトメトリー法を用いて測定した。

(5) siRNA は Nucleofection 法を用いて (Amaxa siRNA Nucleofection Program)、THP-1 細胞およびヒトマクロファージに対し、CHOP および Negative control (NC) の siRNA 導入を行った。導入後 24 時間、37 度の CO2 インキュベーターにて培養後に細胞を回収し、ノックダウンの効果を Real-Time PCR により、mRNA レベルの定量評価を行い、遺伝子発現が抑制されていることを確認した後、アポトーシスおよび貪食能の変化を観察した。

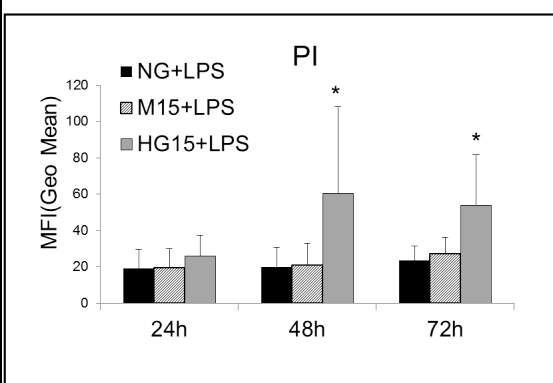
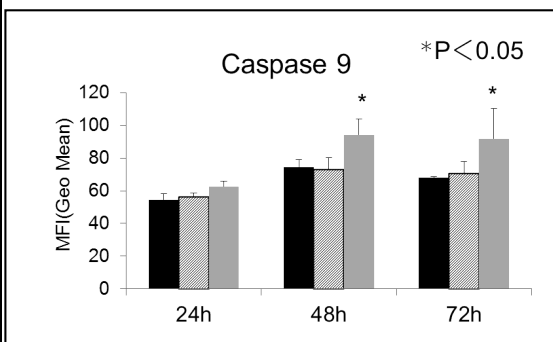
(6) 炎症消退脂質として注目されている、レゾルビン D2 を HG 群に投与することによって、アポトーシスや貪食能および細胞内情報伝達系の変化がどのように影響されるかについても検討した。

(7) 様々な病態の調節に関与していると考えられている micro RNA の発現の変化を検討する上で、次世代シーケンサ Ion PGM システムを用いて、敗血症病態時の単球系細胞死に関する網羅的な解析を行った。THP-1 細胞及びヒトマクロファージ細胞から mirVana™ miRNA Isolation Kit を用いて miRNA を抽出後、ライブラリ調整 (Ion Total RNA-seq キットを使用)、ビーズ調整 (エマルジョン PCR を行い、DNA 断片をビーズ上に増幅する)、シーケンシング (エマルジョン PCR 後のサンプルをマイクロチップに注入し Ion PGM シーケンサにて塩基配列を検出し、miRNA の発現定量を行う) を行った。データ解析は解析ソフト：Genomic Work Bench, CLC バイオ社を用いて行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) アポトーシス

ミトコンドリア膜電位は 72h において NG+LPS 群と比べて HG+LPS 群が有意に低下し、Caspase9、Caspase3 は 48h、72h で、PI は 72h において HG+LPS 群に有意に上昇した。

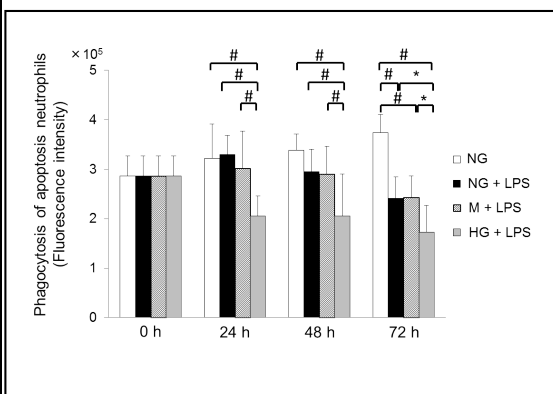


##### (2) 貪食能の変化

HG 単独負荷では貪食能の有意な変化は認められなかった。

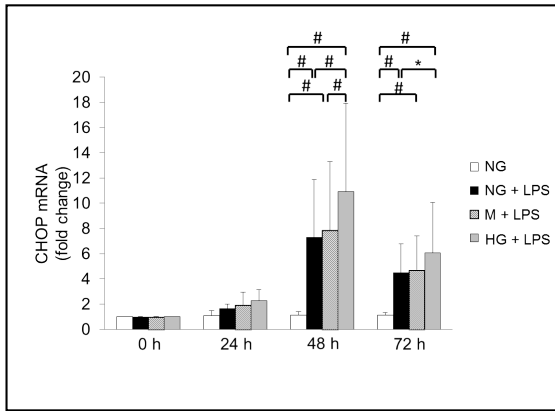
一方、LPS 負荷により 72h で有意に貪食能の抑制を認めた (NG+LPS 群)。さらに、HG + LPS 群では 24-72h において有意に貪食能の抑制を認めた。なお、M + LPS 群では NG+LPS 群と有意な変化は認めなかった。

なお、病原体 (大腸菌 Particle)、死細胞 (好中球) いずれを貪食した場合においても同様の結果であった。

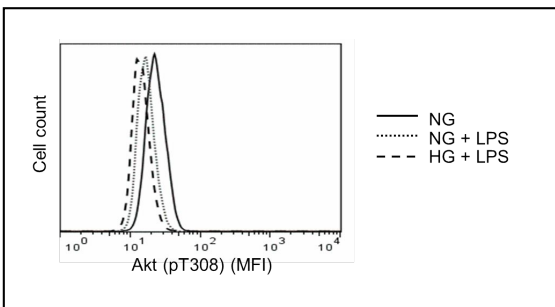


##### (3) 小胞体ストレス

mRNA レベルでは CHOP の発現が 24h、48h で HG + LPS 群で有意に増加した。蛋白レベルでは 48h、72h において HG+LPS 群において有意に CHOP の発現が増加した。

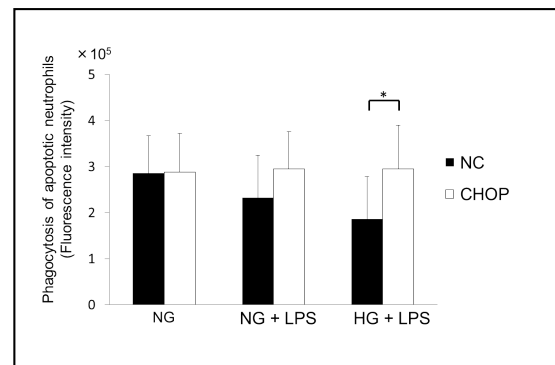


(4) Aktリン酸化 (p308)  
HG+LPS 群において 72h で有意にリン酸化が抑制された。



(5) CHOP 遺伝子ノックダウンによるアポトーシス、貪食能、Aktリン酸化の変化

CHOP の siRNA によって、Caspase3、Caspase3、PI はいずれも抑制され、貪食能においては、HG+LPS 群の貪食能低下の改善を認めた。また、Akt のリン酸化 (p308) においても抑制の改善を認めた。

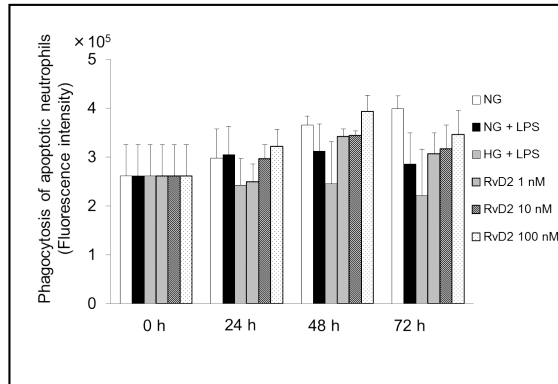


(6) Resolvin D2 によるアポトーシス、貪食能、Aktリン酸化の変化

Resolvin D2 投与によって、Caspase9 および PI の HG+LPS 群での上昇抑制効果を認めた。また、貪食能低下に関しても、濃度依存性に抑制効果を認めた。Akt リン酸化に関しては、HG+LPS によるリン酸化抑制を改善する傾向を認めた。

(7) LPS + HG 群における miRNA の変化  
シーケンス解析の結果において、小胞体ストレスに関係すると思われる、miR-211、miR-204 で変化を認めた。HG+LPS 群において miR-211 の発現低下および miR-204 の発

現増加の傾向があった。



以上より、LPS を用いた単球系細胞敗血症モデルにおいて、高糖培養液下ではアポトーシスが促進され、また貪食能の低下を認めた。高糖環境下ではこのように細胞死の促進と貪食能の低下による死細胞のクリアランスが低下によってさらなる炎症の遷延に繋がると考えられる。また、そのメカニズムとして今回、小胞体ストレスおよび Akt のリン酸化に着目した。高糖環境下において小胞体ストレスのうち、アポトーシスを促進するとされる CHOP の発現の増加を認め、Akt についてもリン酸化の有意な抑制を認めた。siRNA によってこれらアポトーシスの抑制や貪食能への影響を観察できた。また、炎症消退脂質として注目されている、レゾルビン D2 を投与することによってアポトーシスの抑制、貪食能の改善を認めたことから、今後敗血症時の治療法として応用できる可能性がある。そして今回次世代シーケンサ Ion PGM システムを使用し、敗血症病態における単球系細胞死においていくつかの miRNA の関与が示唆された。今後さらに研究を進め、それぞれの miRNA の発現定量を行うとともに、敗血症ラットモデルを用いた In Vivo 系の実験も進めていきたい。今後の敗血症病態に対する遺伝子治療への可能性が期待される。

## 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 1 件)

Nakayama Y, Shibasaki M, Shime N, Nakajima Y, Mizobe T, Sawa T. The RACHS-1 risk category can be a predictor of perioperative recovery in Asian pediatric cardiac surgery patients. J Anesth. 2013; 27:850-4. .

[学会発表](計 3 件)

1. 虚血性僧帽弁逆流患者の TEE 評価と麻酔管理 日本心臓血管麻酔学会第 17 回学術大会心エコーワークショップテキスト

2. ト 中嶋康文、中山力恒、竹下淳、  
溝部俊樹 P47-48. 2012
3. 村瀬百子、中嶋康文、中山力恒、柴崎雅  
志、佐和貞治、溝部俊樹: 止血凝固機構  
と開心術周術期における止血凝固異常.  
日本心臓血管麻酔学会誌 16: 23-30,  
2012
4. 中山力恒、中嶋康文、小川覚、飯田淳、  
溝部俊樹: 特集 慢性腎臓病と麻酔管理  
CKD 患者の非心臓手術の麻酔管理. 麻  
酔 62: 1326-1335, 2013.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

中山 力恒 (NAKAYAMA YOSHINOBU)  
京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医  
研究者番号 : 90568198