

平成 19年 3月

持田晋輔 学位論文審査要旨

主 査 井 藤 久 雄
副主査 山 田 一 夫
同 稲 垣 喜 三

主論文

Geranylgeranylacetone ameliorates inflammatory response to lipopolysaccharide (LPS) in murine macrophages: inhibition of LPS binding to the cell surface (ゲラニルゲラニルアセトンとはマウスマクロファージにおけるリポポリサッカライド (LPS) に対する炎症反応を軽減する：細胞表面へのLPS結合の抑制)

(著者：持田晋輔、松浦達也、山下 敦、堀江俊輔、大畑修三、楠本智章、西田直史、南ゆかり、稲垣喜三、石部裕一、仲田純也、太田好次、山田一夫)
平成19年 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition 41巻 掲載予定

学 位 論 文 要 旨

Geranylgeranylacetone ameliorates inflammatory response to lipopolysaccharide (LPS) in murine macrophages: inhibition of LPS binding to the cell surface (ゲラニルゲラニルアセトン)はマウスマクロファージにおけるリポポリサッカライド (LPS) に対する炎症反応を軽減する：細胞表面へのLPS結合の抑制

リポポリサッカライド(LPS)はグラム陰性桿菌外膜の主要構成成分であり、強力なマクロファージ活性化因子であると共にエンドトキシンショックの原因物質である。LPSは炎症性メディエーター、活性酸素、一酸化窒素(NO)などの産生を誘導し、動物をエンドトキシンショックから死に至らしめる。さらに、これらの物質の誘導はin vitroの研究でも確認されており、これらの反応の過程には細胞表面のToll様受容体(TLR)4によるLPSの認識、それに続く転写因子NF- κ Bの活性化が関与している。

ゲラニルゲラニルアセトン(GGA)は日本で開発された抗胃潰瘍薬であり、その強力な熱ショックタンパク(HSP)誘導作用を介して臓器や細胞を障害から保護することが知られている。近年、著者らはGGA前投与がHSP70誘導と炎症性サイトカインおよびNO産生抑制を介して、LPSによって誘導されるラットエンドトキシンショックに対する生存率を著明に改善し、多臓器保護効果をもたらすことを報告したが、そのメカニズムの詳細は不明である。

本研究は、LPSによるエンドトキシンショック時に活性化されるマクロファージに焦点を当て、GGAによるマクロファージ活性化抑制作用およびそのメカニズムについて検討したものである。

方 法

マウスマクロファージ由来の細胞株であるRAW264細胞を、10%ウシ胎児血清を添加したDMEM培地で培養した。培養2時間後、新しい培地に交換し、LPS(1 μ g/ml)を添加した。GGAは20、40、80 μ Mの濃度でLPS刺激の2時間前に添加した。LPSのTLR4への結合実験では、GGA添加2時間後に、GGAを含まない培地に交換した後、LPSで刺激した。GGAによる抑制効果の血清タンパク依存性を調べる実験では無血清培地を用いた。細胞生存率(Cell Quanti-Blue Cell Viability Assay Kits)、培地中のNO濃度(Griess法)、培地中TNF- α 濃度(ELISA法)、細胞内HSP70、iNOSの発現(ウエスタンブロット)、細胞表面に結合したLPS、細胞表面に発現したTLR4-MD-2、CD14(フローサイトメトリー)を解析した。

結 果

GGA、LPS、GGA+LPS処理は細胞生存率に影響を及ぼさなかった。RAW264細胞でのNO産生、TNF- α 産生は時間およびLPS用量依存的に増加した。

LPS添加2時間前のGGA (80 μ M) 処理により、LPS刺激12時間後のTNF- α および24時間後のNO産生は有意に抑制された。

GGA前投与によりLPS刺激後のiNOS発現は用量依存的に抑制された。しかし、GGAはHSP誘導作用をもつにもかかわらず、LPS刺激後のHSP70誘導を用量依存的に抑制した。GGA処理後、LPS刺激直前に培地を新しい (GGA不含) 培地に交換するとGGAのNO産生に対する抑制効果は消失した。無血清培地を用いた実験においても、GGAはLPSによるNO産生を抑制した。GGAはTLR4-MD-2およびCD14の発現には影響を与えなかった。

考 察

本研究により、GGAがLPS刺激により活性化されたマクロファージからのNOおよびサイトカイン産生を抑制することが示された。

炎症性サイトカイン産生はHSP70誘導により抑制されることが報告されている。GGAの強力なHSP誘導作用を考えるとGGAの抗炎症作用もまた、HSP誘導を介することが考えられたが、予想に反して、GGA前投与によりLPS投与後のHSP誘導は抑制された。これはGGAのHSP誘導作用は直接的にHSPを誘導するというよりも、転写因子であるHSF (熱ショック因子) -1の活性化に間接的に作用していると考えられており、GGAはHSF-1を活性化することにより細胞をHSP誘導に向けてプライミングできるが、刺激が加わらなければHSP発現を誘導できないと仮定すると、LPS刺激によるシグナルが細胞内に伝達されなかったことが考えられる。

GGA投与後LPS投与前に培地を交換することにより、GGAのNO産生抑制効果が消失したこと、さらにGGAは血清の有無に関わらずTNF- α 産生を抑制したことより、GGAはHSP70誘導を介して、あるいはLPSのTLR4-MD-2結合に必要な血清タンパクに直接作用して抗炎症作用を発揮しているのではなく、細胞表面あるいは細胞膜において、LPSがTLR4-MD-2へ結合する過程あるいはTLR4-MD-2の2量体化の過程で作用している可能性が示唆された。

結 語

LPSのマクロファージ活性化に対するGGAの抑制効果は、GGAのHSP70誘導活性によるものではなく、LPSの細胞表面への結合阻害によるものであると考えられる。