

平成28年9月

# 仲宗根正人 学位論文審査要旨

主査 長谷川 純 一  
副主査 松 浦 達 也  
同 稲 垣 喜 三

## 主論文

Preconditioning by low dose LPS prevents subsequent LPS-induced severe liver injury via Nrf2 activation in mice

(低用量LPSによるプレコンディショニングは、Nrf2活性化を介して、その後のLPSによるマウスの重篤な肝障害を防止する)

(著者：仲宗根正人、中曽一裕、堀越洋輔、花木武彦、北川良憲、高橋徹、稲垣喜三、松浦達也)

平成28年 Yonago Acta medica 59巻 223頁～231頁

## 参考論文

1. Estrogen receptor-mediated effect of  $\delta$ -tocotrienol prevents neurotoxicity and motor deficit in the MPTP mouse model of Parkinson's disease

(エストロゲン受容体を介した $\delta$ トコトリエノールの効果は、MPTP投与パーキンソン病マウスモデルにおける神経毒性と運動障害を防止する)

(著者：中曽一裕、堀越洋輔、高橋徹、花木武彦、仲宗根正人、北川良憲、小池泰介、松浦達也)

平成28年 Neuroscience Letters 610巻 117頁～122頁

# 学位論文要旨

Preconditioning by low dose LPS prevents subsequent LPS-induced severe liver injury via Nrf2 activation in mice

(低用量LPSによるプレコンディショニングは、Nrf2活性化を介して、その後のLPSによるマウスの重篤な肝障害を防止する)

同一又は類似の負荷に繰り返し暴露された際、2回目以降の負荷に対して耐性を示すことがあり、プレコンディショニング (PC) 効果として知られている。敗血症は、リポポリサッカライド (LPS) によって自己免疫が過剰に応答する病態であるが、反復する場合、2回目以降では症状が軽減することがあり、一種のPC効果と考えられている。しかし、PC効果の詳細なメカニズムは解明されていない。LPSの刺激により活性酸素が発生するが、これに対する防御反応として、転写因子NF-E2-related factor 2 (Nrf2) を介したヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) などの抗酸化分子の誘導が知られている。今回、マウスへの反復LPS投与によるPC効果に、Nrf2を介した抗酸化メカニズムが関与しているかを検討した。

## 方法

C57BL/6マウスを用い、LPSを2回に分けて腹腔内投与した。1回目はPCとして非致死量のLPS (1.7または5.0 mg/kg体重)、2回目は5日後に本刺激として致死量のLPS (20 mg/kg体重) を投与し、PC効果を検討した。非PC群は1回目にPBSを投与した。PC効果は生存率変化および臓器障害について検討し、後者に関しては主に肝臓で、血漿トランスアミナーゼ活性測定、病理組織学的検討を行い評価した。PC効果の詳細なメカニズムを明らかにするために、DNAマイクロアレイを行い、その結果を元にin vivo Nrf2レポーターアッセイ、HO-1の発現誘導、及び局在をそれぞれウエスタンブロット、免疫染色により、PC群と非PC群で比較検討した。PCに対するNrf2の関与を明らかにするために、Nrf2欠失マウスを用いて同様の検討を行った。

## 結果

本刺激7日後の生存率は非PC群12.5%に対して、PC群 (1.7または5.0 mg/kg体重) ではそれぞれ100%、87.5%と生存率上昇効果を認めた。肝障害に関する検討では、非PC群で本刺激後の血漿トランスアミナーゼ活性上昇、肝臓の巣状壊死、類洞内好中球浸潤を認めたのに

対し、PC群では本刺激後の血漿トランスアミナーゼ活性上昇の抑制、肝臓の巣状壊死や好中球浸潤の軽減が認められ、PCによる肝保護効果が示された。DNAマイクロアレイでは、PC群において抗酸化に関連する遺伝子群の発現上昇が示唆されたため、抗酸化分子発現のマスター転写因子Nrf2に注目してさらなる検討を行った。in vivo Nrf2レポーターアッセイでは、非PC群に比してPC群で本刺激後のNrf2活性化が全身で増強していることが示された。Nrf2の主要標的分子HO-1は、肝臓において、非PC群に比してPC群で顕著な誘導が認められた。また、免疫染色により、このHO-1発現は主にCD163陽性クッパー細胞に認められることが明らかになった。Nrf2欠失マウスを用いた検討ではPC効果としてのHO-1誘導が認められず、PC群においても非PC群同様、本刺激後の肝臓の巣状壊死、好中球浸潤、さらに肝臓内微小出血を認めた。

## 考 察

Nrf2及び抗酸化分子がLPS単回投与によって誘導されることはよく知られているが、今回の実験で低用量LPSによるPC効果にもNrf2が関与していることを明らかにした。しかしながら、Nrf2欠失マウスを使用した場合、LPSによる刺激に対して脆弱なため、PCの時点で死亡する個体があり、生存率を比較できなかった。また、組織サンプルは、PCで生存できた限定的なマウスを使用しているため、別の耐性メカニズムも増強されている可能性を考慮する必要がある。クッパー細胞は、類洞内に存在し、LPSのような毒素の浄化作用を行っている。また、Nrf2の活性化やHO-1の誘導がLPSの毒性に対する肝保護に重要であるという報告がある。今回PC群では、クッパー細胞でHO-1発現が顕著に誘導されており、クッパー細胞がPC効果による肝保護に関与していることが示唆された。脳、肺、腎のHE染色による病理組織学的検討でも、PC群で本刺激後の所見は軽減しており、これらの臓器におけるPC効果にNrf2が関与している可能性が考えられた。

## 結 論

低用量LPSによるPCは、主にクッパー細胞におけるNrf2活性化を介して、致死量LPSによるマウスの重篤な肝障害を軽減する。