

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17799

研究課題名（和文）糖尿病による免疫機能低下メカニズムの検討

研究課題名（英文）Investigation of the mechanism of immune function reduction by diabetes mellitus

研究代表者

北浦 淳寛 (KITAURA, Atsuhiko)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：20716485

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：糖尿病では免疫の低下が生じ、感染症を発症し、予後を悪化させる。糖尿病による免疫低下のメカニズムについて、長期間高血糖にさらされると産生・蓄積される非常に生理活性が強い糖化最終産物という物質に着目した。糖化最終産物は免疫系にさまざまな影響を与える。そのなかで、免疫系の重要な司令塔であるマクロファージの活性への影響を検討した。結果、糖化最終産物は、グラム陰性桿菌由来のリポポリサッカライド（LPS）という炎症惹起物質のマクロファージへの取り込みを抑制して、細菌への正常な免疫応答を抑制することを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、糖化最終産物（AGEs）が、マクロファージのエンドサイトーシス抑制と、その下流経路にあたるマクロファージのサイトカイン分泌抑制を明らかにした。糖化最終産物は免疫系の中で中心的役割を担うマクロファージの機能を抑制する。本研究によって、糖尿病の免疫低下における新たなメカニズムを明らかにしたことは、*in vitro* 研究でまだ臨床応用にはほど遠いが、今後の糖尿病管理および糖尿病合併症管理において、新たな治療ターゲットを提供する可能性がある。糖尿病は日本でも有病率が高く、また脳血管疾患や血液透析の最も強い誘因となりうるので、もし将来的に臨床応用がなかった場合には、その波及効果は大きい。

研究成果の概要（英文）：Diabetes mellitus causes a decrease in immunity, leading to the development of infections and worsening prognosis. To understand the mechanism of immunocompromised immunity caused by diabetes, we focused on a substance called advanced glycation end products (AGEs), which are highly bioactive and are produced and accumulated after prolonged exposure to high blood glucose. AGEs have various effects on the immune system. Among them, we investigated the effects on the activity of macrophages, which are an important command post of the immune system. As a result, we found that AGEs suppress the normal immune response to bacteria by inhibiting the uptake of an inflammation-producing substance called lipopolysaccharide (LPS), which is derived from Gram-negative rods, into macrophages.

研究分野：麻酔科学

キーワード：糖化最終産物 糖尿病 免疫 マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者は、周術期にいかにも注意深く血糖管理を行っても、術野感染や敗血症を引き起こしやすく、入院期間の延長や術後 QOL 低下につながっている。これは、たとえ血糖コントロールを行っていたとしても健常者並みとならない。申請者は、慢性的な高血糖状態で蓄積し、糖尿病合併症の原因となる advanced glycation end-product (AGEs) に着目した。AGEs 刺激によって、代表的な Pathogen-associated molecular pattern(PAMPs) である Lipopolysaccharide (以下 LPS) のマクロファージへの取り込みが抑制され、マクロファージの細胞死も抑制されることを、申請者はマウス単球由来マクロファージ (RAW264.7) を用いて確認した。この現象は、マクロファージによる LPS の除去を遅延させるだけではなく、LPS 感作マクロファージのアポトーシス誘導も抑制する。これらは免疫応答を減弱する方向に働くものと考えられるが未だ明らかにはなっていない。申請者は、AGEs によるマクロファージの機能変化が糖尿病患者における免疫低下の病因と捉え、その病態解明を目指す。

## 2. 研究の目的

糖尿病患者における免疫力低下の機序を検討することを目的として、本研究では AGEs によるマクロファージの機能について着目し、AGEs による、マクロファージの取り込み作用に対する作用を明らかにする。

## 3. 研究の方法

マウス末梢血由来単球細胞の RAW 264.7 細胞を用いた in vitro 研究により、マクロファージの PAMPs に対するエンドサイトーシス作用について検討した。研究手法としては、フローサイトメトリーと ELISA 法、および共焦点顕微鏡を用いた形態学的検討を用いた。

## 4. 研究成果

マクロファージが LPS を細胞内に取り込み除去していることを明らかにするため、マウス単球由来マクロファージ RAW264.7 を用いた研究で、蛍光標識した LPS (LPS-Alexa Fluor594, Thermo Fisher) を用いてフローサイトメトリーを行い、LPS はマクロファージに取り込まれることを確認した。また、この反応はエンドサイトーシス抑制薬である Chlorpromazine によって抑制された。これにより、マクロファージは LPS をエンドサイトーシスによって取り込むことが明らかになった (図 1-A~E)。

次に、マクロファージによる LPS のエンドサイトーシスが CD14 を介して行われ (図 2-A&B)、TLRs、RAGE、スカベンジャー受容体などの他の AGEs に関連する受容体が影響を与えないことを確認した。さらに、LPS を取り込んだマクロファージが、CXCL10 などのインターフェロンを産生し、免疫細胞の誘導に関与することが確認された (図 2-C&D)。

AGEs の作用とそのメカニズムを解明するため、AGEs のなかでも特に生理活性の高い AGE3 を用いた研究を行った。AGEs 存在下にマウス単球由来マクロファージ RAW264.7 による、蛍光標識した LPS (LPS-Alexa Fluor594, Thermo Fisher) 取り込

みの検討の結果、AGEs が存在するとマクロファージの LPS 取り込みが抑制されることを発見した (図 3)。この研究により、AGE3 はマクロファージによる LPS 取り込みを抑制することが発見された。AGE3 による LPS 取り込み抑制のメカニズムはまだ完全には確認できていないが、種々の検討により RAGE が関与していることが明らかとなった。

現在、引き続き、マウスやヒト検体を用いた *in vivo* 研究を遂行中である。

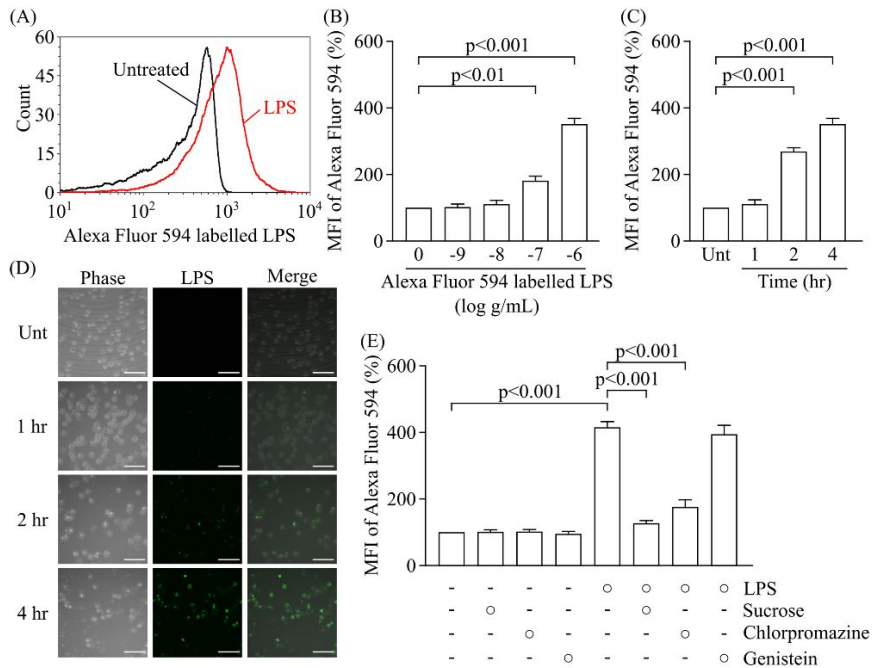


図 1 RAW264.7 の LPS 取り込みとそのメカニズム

A: Alexa Fluor 594 標識 LPS のフローサイトヒストグラム、B: RAW264.7 による Alexa Fluor 594 標識 LPS の濃度別取り込みを測定したフローサイト結果、C: RAW264.7 による Alexa Fluor 594 標識 LPS の経時的取り込みを測定したフローサイト結果、D: 各種エンドサイトーシス阻害薬による RAW264.7 による Alexa Fluor 594 標識 LPS 取り込みの変化

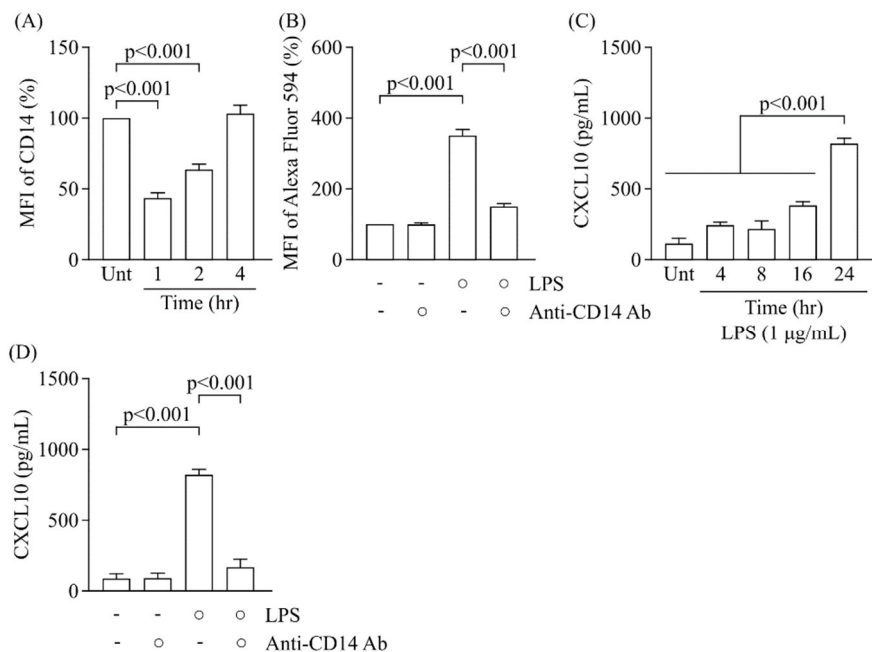


図 2 RAW264.7 による LPS 取り込みへの CD14 の関与

A: LPS 刺激による RAW264.7 膜表面 CD14 発現の変化、B: RAW264.7 による LPS 取り込みに対する CD14 中和抗体の影響、C: LPS 刺激 RAW264.7 による CXCL10 産生の経時的変化、D: RAW264.7 の LPS 刺激に対する CXCL10 産生に対する CD14 中和抗体の影響

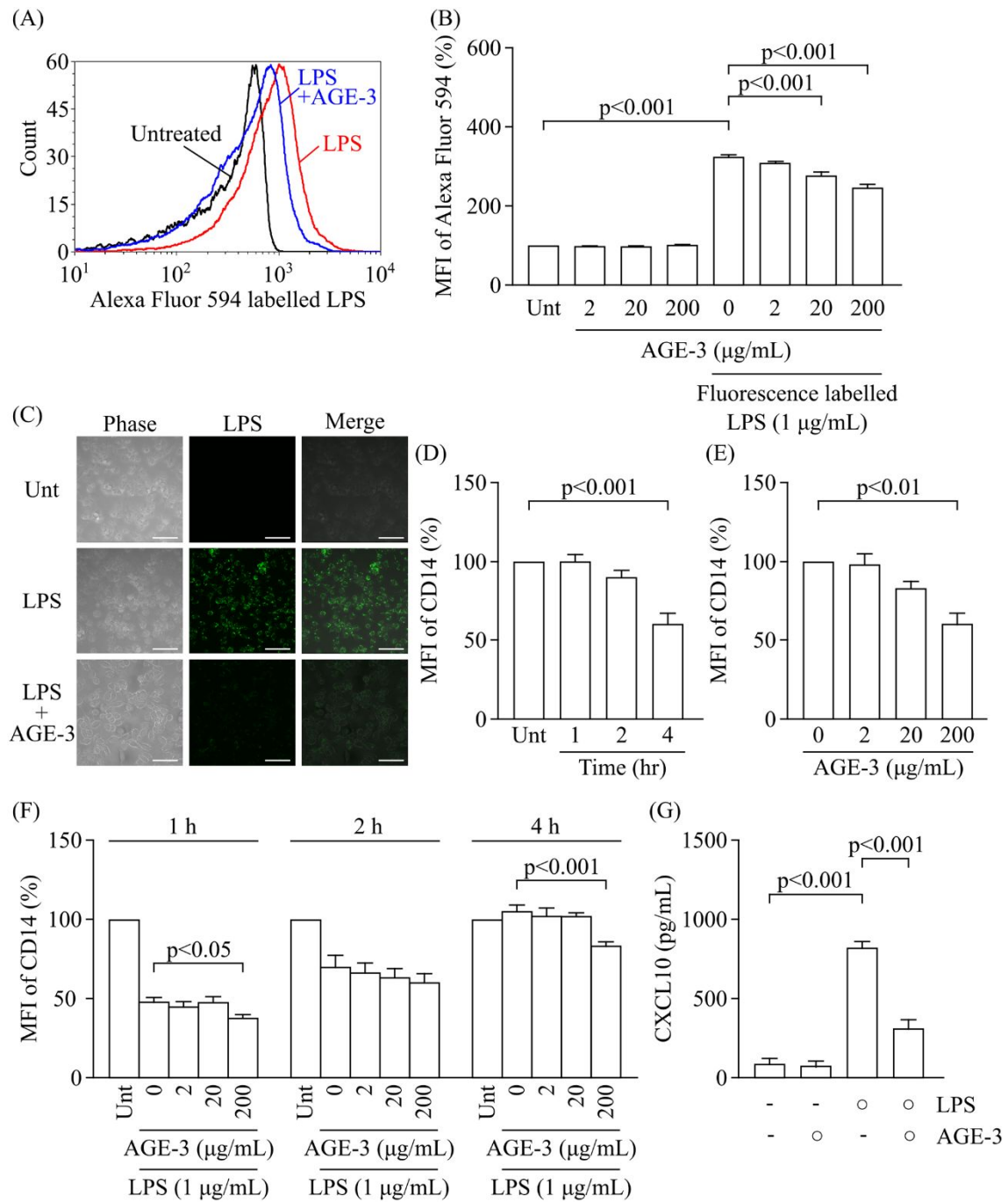


図3 AGE3 による RAW264.7 の LPS 取り込みへの影響

A: Alexa Fluor 594 標識 LPS のフローサイトヒストグラム、AGE3 付加により LPS 取り込みが減弱している。B: AGE3 添加濃度による RAW264.7 の Alexa Fluor 594 標識 LPS 取り込みの変化。C: 共焦点顕微鏡を用いた RAW264.7 の Alexa Fluor 594 標識 LPS 取り込みの評価。AGE3 添加により LPS の取り込みが抑制されている。

参考文献：

Kitaura A, et al. Advanced glycation end-products reduce lipopolysaccharide uptake by macrophage. PLOS ONE. 16, 2021. DOI:10.1371/journal.pone.0245957

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kitaura Atsuhiko, Nishinaka Takashi, Hamasaki Shinichi, Hatipoglu Omer Faruk, Wake Hidenori, Nishibori Masahiro, Mori Shuji, Nakao Shinichi, Takahashi Hideo	4. 巻 16
2. 論文標題 Advanced glycation end-products reduce lipopolysaccharide uptake by macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0245957
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0245957	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------