

論文内容要旨

論文題目

DGK ϵ 欠損はNF- κ B経路を抑制しエンドトキシンへの抵抗性をもたらす

責任講座： 解剖学第二 講座
氏名： 小澤 昌子

【内容要旨】

<背景>細菌やウイルスなどの病原体は Toll 様受容体 (TLR) を介して感知され、これが NF- κ B シグナル伝達経路を始動して炎症応答が進行する。ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) はジアシルグリセロール (DG) をリン酸化して、ホスファチジン酸 (PA) を生成する酵素である。この働きにより、DGK はイノシトールリン脂質の代謝の一翼を担うとともに、セカンドメッセンジャーとして作用する DG や PA のバランス調節を介して様々な細胞機能を制御すると考えられている。DGK アイソザイムのうち DGK ϵ は、アラキドン酸を含む DG に基質特異性を示す。これまでの報告により DGK ϵ は、グラム陰性菌由来のエンドトキシンであるリポ多糖 (LPS) に反応して一過性に転写亢進を起こすことが明らかにされており、炎症応答への関与が示唆されているが、機能的役割は未だ不明である。本研究では、DGK ϵ が LPS を介する炎症応答の過程にどのような影響を及ぼすのかを、培養細胞と動物モデルを用いて解析した。

<方法>細胞内シグナル分子動態を検討するため、野生型マウスおよび DGK ϵ 欠損マウスから得られたマウス胎児線維芽細胞 (MEF) を LPS で刺激し、Akt および NF- κ B 関連分子についてウエスタンブロットと免疫細胞化学の手法を用いて解析した。また、野生型マウスおよび DGK ϵ 欠損マウスの腹腔内に LPS を投与してエンドトキシンショックの動物モデルを作製し、投与 24 時間後の肝臓、肺、腎臓における誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) と NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3) の発現をウエスタンブロットで解析した。さらに、肝細胞における腫瘍壊死性因子 (TNF- α) と iNOS の発現、およびフリーラジカルによる DNA 損傷の指標である 8-OHdG の蓄積について免疫組織化学法により解析した。

<結果>DGK ϵ 欠損 MEF では、野生型 MEF と比較して LPS 刺激後 15 分で Akt と NF- κ B p65 サブユニットのリン酸化が抑制され、刺激後 1 時間での p65 サブユニットの核内移行が減少した。動物モデルでは、LPS 投与 24 時間後に野生型マウスが 53% の生存率を示すのに対して、DGK ϵ 欠損マウスは全例 (100%) が生存した。また肝臓において、DGK ϵ 欠損マウスでは TNF- α と iNOS 発現誘導の低下が認められ、8-OHdG の陽性像も減少した。

<考察>LPS は TLR4 に結合して NF- κ B 経路を活性化し、炎症性サイトカインや iNOS などの炎症応答物質の産生を引き起こす。本研究の結果、DGK ϵ 欠損によって LPS 刺激後の NF- κ B 転写活性が抑制され、TNF- α と iNOS 誘導が低下する可能性が示唆された。さらにその結果として、iNOS により産生される一酸化窒素 (NO) が減少し、フリーラジカルによる細胞傷害作用が低下することによって、DGK ϵ 欠損マウスはエンドトキシンに対して抵抗性を示すことが示唆された。

令和 4 年 1 月 14 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名： 小澤 昌子

論文題目： DGK ϵ 欠損はNF- κ B 経路を抑制しエンドトキシンへの抵抗性をもたらす

審査委員：主審査委員

川前 金幸

副審査委員

三井 哲夫

副審査委員

二口 亮

審査終了日：令和 4 年 1 月 13 日

【 論文 審査 結果 要 旨 】

ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) はジアシルグリセロール (DG) をリン酸化して、ホスファチジン酸 (PA) を生成する酵素である。DGK アイソザイムのうち DGK ϵ は、アラキドン酸を含む DG に基質特異性を示す。これまでの報告により DGK ϵ は、グラム陰性菌由来のエンドトキシンであるリポ多糖 (LPS) に反応して一過性に転写亢進を起こすことが明らかにされており、炎症応答への関与が示唆されているが、機能的役割は未だ不明である。著者は DGK ϵ が LPS を介する炎症応答の過程にどのような影響を及ぼすのかを、培養細胞と動物モデルを用いて解析した。細胞内シグナル分子動態を検討するため、野生型マウスおよび DGK ϵ 欠損マウスから得られたマウス胎児線維芽細胞 (MEF) を LPS で刺激し、Akt および NF- κ B 関連分子についてウエスタンブロットと免疫細胞化学的手法を用いて解析した。また、野生型マウスおよび DGK ϵ 欠損マウスの腹腔内に LPS を投与してエンドトキシンショックの動物モデルを作製し、投与 24 時間後の肝臓、肺、腎臓における誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) と NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3) の発現をウエスタンブロットで解析した。さらに、肝細胞における腫瘍壊死性因子 (TNF- α) と iNOS の発現、およびフリーラジカルによる DNA 損傷の指標である 8-OHdG の蓄積について免疫組織化学法により解析した。DGK ϵ 欠損 MEF では、野生型 MEF と比較して LPS 刺激後 15 分で Akt と NF- κ B p65 サブユニットのリン酸化が抑制され、刺激後 1 時間での p65 サブユニットの核内移行が減少した。動物モデルでは、LPS 投与 24 時間後に野生型マウスが 53% の生存率を示すのに対して、DGK ϵ 欠損マウスは全例 (100%) が生存した。また肝臓において、DGK ϵ 欠損マウスでは TNF- α と iNOS 発現誘導の低下が認められ、8-OHdG の陽性像も減少した。LPS は TLR4 に結合して NF- κ B 経路を活性化し、炎症性サイトカインや iNOS などの炎症応答物質の産生を引き起こす。本研究の結果、DGK ϵ 欠損によって LPS 刺激後の NF- κ B 転写活性が抑制され、TNF- α と iNOS 誘導が低下する可能性が示唆された。さらにその結果として、iNOS により産生される一酸化窒素 (NO) が減少し、フリーラジカルによる細胞傷害作用が低下することによって、DGK ϵ 欠損マウスはエンドトキシンに対して抵抗性を示すことが示唆された。

以上、DGK ϵ が LPS によるサイトカイン及び NO 産生等に関与することを初めて明らかにした最初の研究である。本研究は学位に値すると評価した。

(1,200字以内)