HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Novel suppressive action of adiponectin on LPS- and HMGB1-induced inflammatory responses [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Elfeky, Mohamed Sobhy Hassan
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第12399号
Issue Date	2016-09-26
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/63594
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Mohamed_Sobhy_Hassan_Elfeky_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨
Abstract of the dissertation

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）　　氏名：Mohamed Sobhy Hassan Elfeky
Name

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

Novel suppressive action of adiponectin on LPS- and HMGB1-induced inflammatory responses

(脂肪細胞分泌因子アディポネクチンの細菌内毒素LPSおよび核内タンパク質HMGB1に因る炎症に対する新規抑制作用)

非ヒストン核タンパク質HMGB1（high mobility group box protein 1）はDNAと結合し，様々な転写因子の活性を間接的に調節する。また、マウスにLPS(lipopolysaccharide)を投与して敗血症モデルを作製すると数日で死に至るが，この時、単球やマクロファージからHMGB1が能動的に、壊死組織からもHMGB1が受動的に細胞外へ放出され、炎症応答を増大させる。つまり、HMGB1は致死性炎症メディエーターとして機能する。

一方、アディポネクチンは脂肪細胞から分泌され、血中にμgオーダーで存在し、抗炎症作用を示す。脂肪蓄積が過剰となるとアディポネクチン生成は低下し、マクロファージの移入による軽度の非感染性炎症が起こる。これにより脂肪組織のみならず骨格筋などにおけるインスリン抵抗性が誘導される。この時、血中HMGB1濃度の上昇が見られ、小児肥満のマーカーとしての応用が期待されているが、その病態生理学的役割は明らかではない。

本研究ではHMGB1と関連する炎症応答とアディポネクチンの関係を明らかにすることを目的として、第一章ではアディポネクチンのLPSによるHMGB1の能動的分泌に対する作用について解析し、第二章ではアディポネクチンのHMGB1による炎症性応

答に対する作用を解析した。

まずマクロファージ様細胞株RAW264細胞を用いて、全長アディポネクチンのHMGB1の能動的分泌への作用を調べた。細胞をLPSで刺激すると細胞の生存率には影響しないものの、HMGB１の細胞質への移行と細胞外液中の濃度の上昇がみられた。全長アディポネクチンの前処理はHMGB1の細胞質への移行と分泌を抑制した。また抗炎症性サイトカインであるIL-10 (Interleukin-10)も濃度依存性にHMGB1の細胞外への放出を抑制した。全長アディポネクチンの前処理はLPS受容体であるTLR (Toll-like receptor) 4 mRNAの発現を減少させ、抗酸化作用をもつHeme oxygenase-1 (HO-1) mRNAの発現を誘導したが、IL-10 mRNAの誘導は起こさなかった。一方、IL-10の前処置はTLR2およびHMGB1 mRNAの発現を抑制し、HO-1およびIL-10 mRNAの発現を上昇させた。全長アディポネクチンの抑制効果はHO-1阻害剤の存在下で完全に消失したが、IL-10の抑制効果は部分的にしか解除されなかった。さらに全長アディポネクチンの抑制効果とHO-1 mRNAの誘導はAMPキナーゼ阻害剤によって阻害された。以上の結果は全長アディポネクチンが、IL-10とは独立して、AMPキナーゼを介して誘導したHO-1の作用によってLPSによるHMGB1の細胞外への放出を抑制することが示唆された。

次に大腸菌を用いて組換えHMGB1を作成し、Niカラムとエンドトキシン除去カラムで精製した。RAW264細胞を抗LPS剤ポリミキシンB存在下において組換えHMGB1で刺激すると、その濃度に依存して炎症性サイトカインTNFα (Tumor necrosis factor α) mRNAの発現を増加させた。この作用は組換え体の加熱変性によって失われ、HMGB1アンタゴニストによっても阻害されるので特異的な受容体の関与が示唆された。受容体アンタゴニスト共存下でHMGB1の活性を調べたところ、HMGB1の反応はTLR4アンタゴニストにより強く、RAGE (Receptor for advanced glycation end products)アンタゴニストにより弱く阻害されたが、TLR1/2アンタゴニストによっては影響されなかった。以上の結果よりRAW264細胞においてHMGB1は主にTLR4を介して炎症性サイトカインの発現を亢進させることが明らかとなった。

全長あるいは球状アディポネクチンの前処理はHMGB1によるTLR４に直接結合するMyD88 (Myeloid differentiation primar response 88)アダプタータンパク質を介するTNFαとIL-1β遺伝子発現およびMyD88非依存性に調節されるC-X-C chemokine (CXCL) 10遺伝子発現の亢進を濃度依存性に抑制した。また球状アディポネクチンの前処理もTLR4 mRNAの発現を減少させ、HO-1 mRNAの発現を誘導した。そこでAMP

キナーゼとHO-1の阻害剤を適用したが、AMPキナーゼ阻害剤は両アディポネクチンによる炎症性サイトカイン発現の抑制を解除したが、HO-1阻害剤は効果がなかった。両アディポネクチンの作用が、HMGB1によるMyD88を介するサイトカインと介さないサイトカインの発現亢進を供に抑制するので、以上の結果は全長および球状アディポネクチンはAMPキナーゼを介してHO-1非依存性に、おそらくはTLR4の発現を抑制することでHMGB1の炎症性シグナルを減じていることが示唆された。

以上のように、脂肪細胞分泌因子アディポネクチンはマクロファージにおける細菌内毒素LPSによる核内タンパク質HMGB1の放出をAMPキナーゼ／heme oxygenase-1依存性に抑制し、HMGB1受容体として機能するTLR4の発現をおそらくは抑制することでHMGB1のシグナルを減弱させていると考えられた。非感染性炎症である肥満においてもアディポネクチンの低下がHMGB1の放出やサイトカイン誘導能を増強させていることが推察され、生活習慣病のターゲットとしてHMGB1が注目される。