

# Expression and function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human alveolar macrophages

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 朝田, 和博 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1226">http://hdl.handle.net/10271/1226</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 373号	学位授与年月日	平成14年 3月26日
氏名	朝田和博		
論文題目	<p>Expression and function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human alveolar macrophages                      (ヒト肺胞マクロファージにおけるペルオキシソーム増殖剤活性化受容体の発現と機能に関する研究)</p>		

博士(医学) 朝田和博

## 論文題目

Expression and function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human alveolar macrophages  
(ヒト肺胞マクロファージにおけるペルオキシソーム増殖剤活性化受容体の発現と機能に関する研究)

## 論文の内容の要旨

### 〔はじめに〕

ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体ガンマ(PPAR $\gamma$ )は核内レセプタースーパーファミリーに属するリガンド依存性の転写因子であり、主に脂肪組織に存在している。アラキドン酸の代謝物である15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandin J<sub>2</sub>(15d-PGJ<sub>2</sub>)や糖尿病治療薬であるチアゾリジン誘導体などがリガンドとして知られている。最近、PPAR $\gamma$ がマクロファージや単球にも発現していることが明らかとなり、リガンド添加によりマクロファージの活性化や単球からの炎症性サイトカインの産生を抑制することが示された。また、PPAR $\gamma$ はスカベンジャーレセプターであるCD36の発現を増強することが報告された。マクロファージはこのCD36を介してアポトーシスをおこした好中球を貪食することが明らかとなっている。したがって、PPAR $\gamma$ はマクロファージにおいてCD36の発現を誘導し、炎症部位に集積した好中球の貪食を促進する可能性がある。しかしながら、肺胞マクロファージ(AMs)におけるPPAR $\gamma$ の発現およびその機能については全く明らかにされていない。そこで、AMsにおけるPPAR $\gamma$ の役割を解明することを目的に、ヒトAMsにおけるPPAR $\gamma$ の発現を調べ、そのTNF- $\alpha$ の産生、CD36の発現、アポトーシス好中球の貪食能にPPAR $\gamma$ がどのような作用を及ぼすかを検討した。

### 〔材料ならびに方法〕

健常人に気管支肺胞洗浄をおこないAMsを回収し、以下の検討に用いた。単球は比重遠心法と磁気細胞分離システムにて分離した。好中球は比重遠心法にて分離し、24時間培養してアポトーシスを誘導した。RT-PCR法にてAMsにおけるPPAR( $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ )の発現を検討した。RT-PCRのシグナルはデンシトグラフで測定し、半定量的に単球の発現量と比較した。TNF- $\alpha$ の産生はAMsに15d-PGJ<sub>2</sub>を添加して1時間培養後、LPS 0.1ng/mlを加えた。24時間後に培養上清中のTNF- $\alpha$ 濃度をELISA法にて測定した。CD36の発現はAMsに15d-PGJ<sub>2</sub>(10 $\mu$ M)を加え6日間培養後、FITC標識抗CD36抗体を加えフローサイトメトリーにて測定した。アポトーシス好中球の貪食能はAMsに15d-PGJ<sub>2</sub>(10 $\mu$ M)を加え6日間培養後、3倍量のアポトーシス好中球を加え60分培養した。AMsを回収し、ミエロペルオキシダーゼ(MPO)を染色した。顕微鏡にてMPO陽性のAMs(アポトーシス好中球を貪食したAMs)を測定した。

### 〔結果〕

AMsにPPAR $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ が発現していることをRT-PCR法にて確認した。AMsでは単球に比べPPAR $\gamma$ のmRNAの発現量が約10倍亢進していた(p<0.01)。PPAR $\alpha$ ,  $\delta$ は単球と差はなかった。PPAR $\gamma$ のリガンドである15d-PGJ<sub>2</sub>はLPS刺激によるAMsからのTNF- $\alpha$ 産生を濃度依存的に抑制し、またAMsにおけるCD36の発現強度、CD36陽性細胞数を経時的に増加させた。6日間の添加でCD36の発現強度は約3倍に増強した(p<0.05)。さらに、15d-PGJ<sub>2</sub>はAMsによるアポトーシス好中球の貪食能を有意に亢進した(p<

0.01)。

〔考察および結論〕

ヒト AMs における PPAR $\gamma$  の発現量はヒト単球に比べ有意に亢進しており、PPAR $\gamma$  は AMs においてより重要な役割を担っていると推定された。また、内因性のリガンドである 15d-PGJ $_2$  が LPS 刺激によるヒト AMs からの TNF- $\alpha$  産生を抑制し、さらに CD36 の発現増強を介してアポトーシス好中球の貪食を亢進させたことから、PPAR $\gamma$  は肺における炎症反応に対して抑制的に関与していると考えられた。このことはまた AMs が関与する炎症性肺疾患において、PPAR $\gamma$  のリガンドが治療薬となりうる可能性を示唆した。

論文審査の結果の要旨

ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体(PPAR)は核内受容体スーパーファミリーに属し、 $\alpha$ 、 $\gamma$ 、 $\delta(\beta)$  の亜型が知られている。これらはレチノイド X 受容体(RXR)とヘテロ二重体を形成し、転写因子として機能する。このうち、糖尿病改善薬であるチアゾリジン誘導体の受容体である PPAR $\gamma$  は脂肪組織に発現しており、脂肪細胞の分化に関与する。さらに、PPAR $\gamma$  は脂肪組織のみならず副腎、脾臓にも発現することが報告されている。また、PPAR $\gamma$  のリガンドとしてはチアゾリジン誘導体以外にも内因性リガンドとして 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandin- $J_2$  (15d-PGJ $_2$ ) などが知られている。しかし、この 15d-PGJ $_2$  を生成するのに必要なプロスタグランジン D2 合成酵素は主にマクロファージに発現しているため、15d-PGJ $_2$  はマクロファージにおける PPAR $\gamma$  のリガンドとして、この細胞の機能を調節している可能性がある。実際、PPAR $\gamma$  は活性化マクロファージで発現増強しており、15d-PGJ $_2$  やチアゾリジン誘導体でその活性(誘導型 NO 合成酵素発現、炎症性サイトカイン産生など)が抑制されることが報告されている。申請者らはヒト肺胞マクロファージ(AMs)を健常人の気管支肺胞洗浄液から回収し、この細胞における PPAR $\gamma$  の発現およびその機能について検討した。得られた結果は以下の通りである。

- (1) PPAR 亜型 mRNA の発現：AMs に PPAR $\alpha$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  mRNA が発現していることを RT-PCR で確認した。  
特記すべきことに、AMs は単球に比べ PPAR $\gamma$  mRNA の発現量が約 10 倍亢進していた。
- (2) 15d-PGJ $_2$  による TNF- $\alpha$  産生抑制：PPAR $\gamma$  の内因性リガンドである 15d-PGJ $_2$  はリポ多糖体(LPS)によって AMs から産生誘導される TNF- $\alpha$  を濃度依存的に抑制した。
- (3) 15d-PGJ $_2$  による CD36 の発現増強：15d-PGJ $_2$  (10 $\mu$ M) で AMs を 6 日間刺激し、AMs における CD36 (スカベンジャー受容体 B) の発現をフローサイトメトリーで測定したところ、発現強度、発現細胞数とも経時的に増強した。
- (4) 15d-PGJ $_2$  による貪食能の亢進：15d-PGJ $_2$  (10 $\mu$ M) で AMs を 6 日間刺激後、アポトーシス好中球を加え 60 分培養し、その貪食能をミエロペルオキシダーゼ染色にて判定したところ、貪食能は有意に亢進していた。

以上より、申請者らは PPAR $\gamma$  はヒト AMs において重要な役割を担っており、特に肺における抗炎症作用に関与する可能性を示唆した。

審査委員会では、健常人ヒト AMs に PPAR $\gamma$  が特に強く発現しており、AMs の機能に深く関与してい

ることを初めて示した点を評価した。

以上の研究に対し、審査委員会では以下の質疑を行った。

- 1) PPAR $\gamma$ 量をタンパクレベルで検討したか
- 2) RT-PCRの定量性について
- 3) PPAR $\gamma$ が単球よりもAMsで発現量が多い機能的な意味は
- 4) AMsを6日間培養した後の細胞回収に問題はなかったか
- 5) 15d-PGJ<sub>2</sub>のLPSによるTNF- $\alpha$ 産生阻害効果が不完全である理由は
- 6) LPS刺激に15d-PGJ<sub>2</sub>を作用させてもTNF- $\alpha$ の産生は阻害されるか
- 7) 15d-PGJ<sub>2</sub>によるCD36発現増強は転写レベルで調節されているか
- 8) 15d-PGJ<sub>2</sub>はCD36(スカベンジャーレセプターB)を発現増強したが、スカベンジャーレセプターAの発現を抑制する理由は
- 9) PPAR $\gamma$ によるAMsのCD36発現増強に比し、アポトーシス好中球貪食能の亢進が弱い理由は
- 10) AMsによるアポトーシス好中球の貪食はすべてCD36のみを介しているか
- 11) AMsによるアポトーシス好中球の貪食は実際に抗炎症的に機能するか
- 12) PPAR $\gamma$ は慢性炎症性肺疾患で治療薬となりうるか
- 13) 15d-PGJ<sub>2</sub>の急性肺炎症における産生細胞について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 小出幸夫  
副査 山下昭 副査 小田敏明