

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

梶原千晶より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号乙第 2734 号

学位申請者 : 梶 原 千 晶
かじ わら ち あき

学位審査論文 : Metformin mediates protection against *Legionella* pneumonia through activation of AMPK and mitochondrial reactive oxygen species

(メトホルミンは、AMPK 活性化およびミトコンドリア由来活性酸素種を介してレジオネラ・ニューモフィラに対する防御を媒介する)

著 者 : Chiaki Kajiwara, Yu Kusaka, Soichiro Kimura, Tetsuo Yamaguchi, Yuta Nanjo, Yoshikazu Ishii, Heiichiro Udon, Theodore J. Standiford, Kazuhiro Tateda

公 表 誌 : Journal of Immunology DOI:10.4049/jimmunol.1700474

論文内容の要旨 :

【背景・目的】

メトホルミンは、ビグアナイド系の2型糖尿病治療薬であり、インスリン抵抗性を改善させる効果がある。以前からメトホルミンは、AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) を介した代謝調節作用を持つことから、癌の予防や治療の分野でも注目されている。感染症領域では、メトホルミン添加のマウス由来好中球の遊走能および細菌に対する食食殺菌能が増強するなどの報告があるが、病態モデルにおける検討はほとんどなされていない。

本研究は、メトホルミンのレジオネラ細胞内増殖に対する影響、およびその作用機序を明らかにすることを目的として行う。

【方法】

マウス骨髄由来マクロファージ、RAW264.7 (マウスマクロファージ細胞)、U937 (ヒトマクロファージ細胞) にレジオネラを1時間感染させ、洗浄後メトホルミン (2 mM) を添加し48時間まで培養した。その後細胞を破碎し、菌数測定を行った。メトホルミン添加後の、感染マクロファージ由来サイトカイン産生量を調べるため、RNA および培養上清を用いて、リアルタイムPCR およびELISAを行った。感染マクロファージにメトホルミンを添加して培養し、リン酸化AMPKのウェスタンブロットを行った。

メトホルミン添加後の感染マクロファージ由来活性酸素種(ROS)産生量の評価を行うため、ミトコンドリア由来ROSおよびNADPH由来ROSをそれぞれ染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。レジオネラ感染後のマウス生存率に対するメトホルミンの効果調べるため、メトホルミン群(感染7日前から飲水ボトルに添加:5 mg/ml)とコントロール群に分け、菌液を経気管的に投与し、肺炎モデルを作成して生存率を調べた。同様の群において肺内菌数測定およびサイトカイン測定、また、AMPKリン酸化レベル評価のためのウェスタンブロットを行った。さらに、ROSが菌増殖抑制に関与しているか調べるため、メトホルミンと還元型グルタチオンを同時に投与する群を作成し、肺内菌数の測定と同時に、肺内マクロファージにおけるミトコンドリア由来ROSの産生性についてフローサイトメトリーで解析した。

【結果】

マウス骨髄由来マクロファージおよび培養細胞を用いた感染実験で、メトホルミンは濃度依存的にレジオネラの細胞内増殖を抑制した。その結果、マクロファージのサイトカイン産生性も低下していた。ウェスタンブロットの結果、未感染に比べて感染マクロファージではAMPKのリン酸化レベルが低下したが、メトホルミン添加により増強した。メトホルミンと同時にAMPK阻害剤を添加することで、メトホルミンによるレジオネラの細胞内増殖抑制効果がキャンセルされた。メトホルミン添加により、感染マクロファージはミトコンドリア由来ROSの産生が増強しており、還元型グルタチオンの同時添加でメトホルミンによる菌の細胞内増殖抑制効果がキャンセルされた。レジオネラ肺炎マウスモデルにおいて、生存率はメトホルミン投与群で有意に上昇し、肺内菌数およびサイトカイン産生性は減少した。肺におけるAMPKのリン酸化レベルは、未感染群に比べて感染群で低下したが、メトホルミン投与群で未感染群と同等のレベルに回復した。肺内マクロファージ由来ROSは、未感染群に比べて感染群で低下したが、メトホルミン投与群で増加した。また、メトホルミンと還元型グルタチオン同時投与群では、感染群と同レベルに低下した。肺内菌数は、メトホルミンと還元型グルタチオン同時投与群でメトホルミン単独投与群に比べて有意に増加した。

【考察】

本研究により、レジオネラ感染したマクロファージおよびマウスにおいて、AMPKリン酸化レベルおよびミトコンドリア由来のROS産生が抑制されること、メトホルミンはこれらを増加させ、レジオネラの細胞内での増殖を抑制することがわかった。レジオネラに対するメトホルミンの直接的な殺菌作用が認められなかったことから、マクロファージを介した菌増殖抑制効果であると考えられた。また、マクロファージおよびレジオネラ肺炎モデルマウスにおいて、いずれもメトホルミンのレジオネラ増殖抑制効果には、サイトカイン産生性の関与は認められなかった。メトホルミン投与による感染マウスの生存率改善効果は、メトホルミン投与を感染前から開始する場合にのみ認められ、感染当日、もしくは感染後からの開始では効果が認められなかったことから、生体内においては治療効果ではなく予防効果であると考えられた。

【結論】

メトホルミンは、AMPKリン酸化およびミトコンドリア由来ROSを介してレジオネラの細胞内増殖を抑制し、レジオネラ肺炎マウスの病態を改善させた。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号乙第 2734 号	氏 名	梶 原 千 晶
学位審査担当者	主 査	中 野 裕 康
	副 査	近 藤 元 就
	副 査	本 間 栄
	副 査	盛 田 俊 介
	副 査	弘 世 貴 久

学位審査論文の審査結果の要旨 :

現在 2 型糖尿病の治療薬として使用されるメトホルミンは、糖新生の抑制や血糖の取り込みを促進することが知られている。メトホルミンは AMPK というキナーゼを活性化してミトコンドリアの電子伝達系の複合体 I を阻害し、細胞内の AMP の濃度を上昇させることが知られているが、一方でミトコンドリアからの活性酸素種 (ROS) 産生を亢進させることも知られている。本研究ではミトコンドリア由来の ROS がレジオネラという細胞内寄生細菌の排除を促進するかを検討し、そのメカニズムを解析した研究である。まずメトホルミンを *in vitro* でレジオネラとマクロファージの共培養系に添加することによりレジオネラの菌量が減少すること、またメトホルミンを添加することでマクロファージの AMPK のリン酸化が誘導されることを明らかにした。さらにミトコンドリア内および細胞質内の ROS を測定するために、ROS 感受性の蛍光プローブを使用し、メトホルミン投与によりミトコンドリア内での ROS 産生が増加することを示した。次にマウスのレジオネラ肺炎モデルを用いてメトホルミンを感染 1 週間前から投与することにより、レジオネラ肺炎の生存率が有意に改善すること、それに伴いレジオネラの菌量も低下すること、さらに炎症性サイトカインの産生も低下することを明らかにした。最後にレジオネラを感染させた肺組織では AMPK のリン酸化が低下するものの、そこにメトホルミンを投与することで AMPK のリン酸化が増強すること、肺のマクロファージのミトコンドリア内の ROS の産生も亢進することを明らかにした。以上よりメトホルミンはミトコンドリア内の ROS 産生を亢進させることで、レジオネラの排除を促進していることを *in vitro* および *in vivo* の実験から明らかにした。

平成 30 年 2 月 28 日に開催された学位審査会において (盛田、近藤、中野の 3 名が参加し、本間、弘世の 2 名は書面での参加)、研究内容を発表した後で活発な質疑応答が行われた。①使用したメトホルミンの濃度はヒトの治療に使用される濃度と比較して妥当な濃度なのか、②ROS 産生の増強とレジオネラ菌の排除の促進との直接の因果関係を証明できるか、③今回の抗酸化剤として実験に用いた還元型 GSH はどのようにして細胞内に取り込まれるのか、④メトホルミンの効果は ROS 産生の亢進以外に、例えば炎症の抑制などの効果はないのかなど数多くの質問に対して申請者は、適切に回答した。メトホルミンのレジオネラ肺炎に対する予防効果を培養細胞や動物実験を用いて証明した本研究の意義は高く、本論文は学位に値するとの結論に達し、学位審査会を終了した。