

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15378

研究課題名(和文) アポ蛋白Mを用いた播種性血管内凝固症候群、多臓器不全の新規治療法の確立

研究課題名(英文) Establish of novel therapy for DIC and multiple organ failures with apolipoprotein M

研究代表者

蔵野 信 (Kurano, Makoto)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60621745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウスにHDL上に存在するアポ蛋白Mを過剰発現あるいは発現抑制させることにより、敗血症モデルマウスであるリポポリサッカライド誘導DIC・多臓器不全モデルマウスの予後を改善あるいは悪化させることが分かった。また、リコンビナントアポ蛋白Mを用いることにより、リポポリサッカライド誘導DIC・多臓器不全モデルマウスの臓器障害を改善させることができた。これらの研究成果はアポ蛋白Mの敗血症に続発するDIC・多臓器不全の治療に応用できる可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：We found that the overexpression of apolipoprotein M (ApoM), an apolipoprotein carried on HDL, ameliorated the survival rate and organ injuries caused by the treatment with lipopolysaccharides, while the suppression of apoM deteriorated them. Moreover, we successfully improved the outcomes of the injection with lipopolysaccharides with recombinant apoM. These findings suggest that apoM can be applied to the treatment with DIC and/or multiple organ failure which occur consequently to sepsis.

研究分野：脂質学

キーワード：敗血症 DIC 多臓器不全 アポ蛋白M スフィンゴシン1-リン酸

1. 研究開始当初の背景

本邦における感染症による死亡は、優れた抗生物質が開発されてきている現在においても死因統計において未だ上位に位置している。その1つの大きな原因として、感染症に続発する播種性血管内凝固症候群 (DIC) そして、多臓器不全 (MOF) により、抗生物質などによる原疾患の治療が効果を発揮する前に致死状態に陥ってしまうことが挙げられる。したがって感染症による死亡率を下げるためには、抗生物質の開発とともに、DIC それに伴う MOF に対する治療薬を開発することが求められているが、現在のところ、有望な治療薬に乏しい。

さて、申請者は、生理活性脂質であるリゾリン脂質の研究を中心的に行っているが、そのリゾリン脂質のうちスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) には、細胞生存促進・抗アポトーシス作用があることが知られている。また、申請者は、S1P の血液中の輸送体であるアポ蛋白 M (ApoM) を、マウス肝臓に過剰発現させることにより、ApoM は S1P の分解を抑制し、血漿 S1P 濃度を約 5~10 倍に増加させ (M. Kurano, et al. atherosclerosis, 2013) また、それにより脾細胞機能を促進することを発見している (Kurano M, et al. Biochim Biophys Acta. 2014)。このような背景より、申請者は、体内の ApoM を増加させる、あるいは ApoM のリコンビナント蛋白を体外より投与することにより、S1P の臓器保護作用を応用して、DIC に伴う MOF による致死率を改善できるのではないかと、という発想に至った。

2. 研究の目的

ApoM の過剰発現による DIC, MOF による致死率の改善機序について、特に S1P の関与、臓器機能の保護作用について検討し、また、ApoM リコンビナントを作成し、治療的な応用が可能かどうかマウスモデルにて明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

リポポリサッカライド (LPS) 誘導 DIC・MOF モデルを用いて、アデノウイルスによる ApoM の過剰発現による生存率改善できるかどうか、またそのメカニズムについて、特にスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) の関与に関して検討する。

LPS 誘導 DIC・MOF モデルを用いて、in vivo siRNA システムを用いて ApoM の発現抑制を行い、ApoM の発現抑制が生存率を悪化させるかどうか検討する。

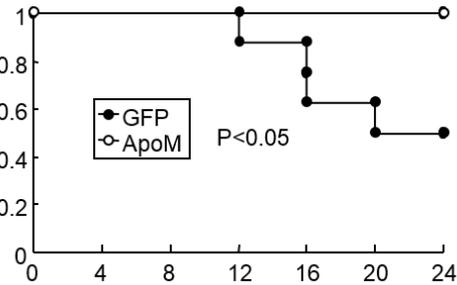
リコンビナント ApoM を作成して、アデノウイルスによる ApoM 過剰発現と同様に、LPS 誘導 DIC・MOF モデルの生存率を改善できるか検討する。

4. 研究成果

LPS 誘導 DIC・MOF モデルマウスに

ApoM を過剰発現させると、LPS 50 mg/kgBW, LPS 25 mg/kgBW 投与したいずれの場合も生存率が改善した。また、LPS 10 mg/dL 投与した場合と合わせて、クレアチニンの上昇、ALT の上昇が抑制され、ApoM には、LPS 誘導 DIC・MOF に対する保護作用があることが分かった (図 1)。

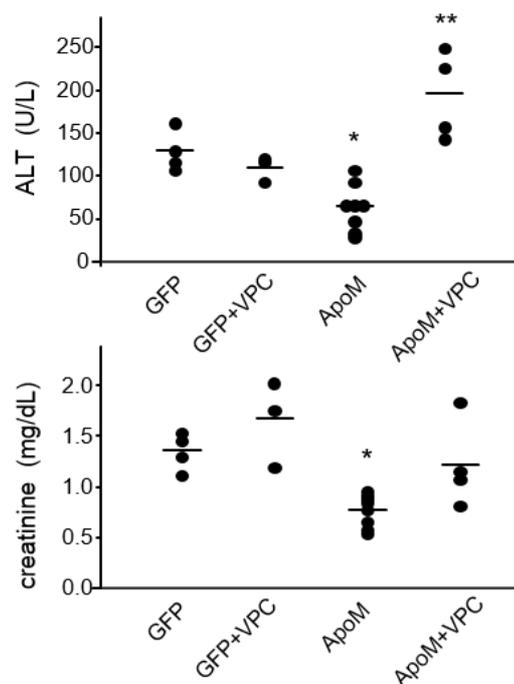
図 1. ApoM 過剰発現は LPS 誘導 DIC・MOF による生存率を改善させる



(GFP、ApoM 過剰発現マウスに LPS 25 mg/kgBW を静脈注射し、4 時間ごとに生存率を検討した。)

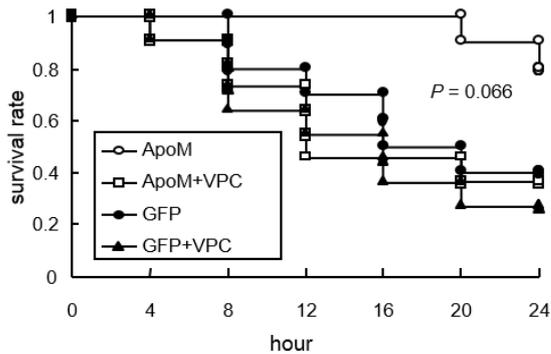
また、その機序に関しては、ApoM 過剰発現により、PAI-1 の上昇抑制および催アポトーシスマーカーの抑制がみられ、抗凝固作用、抗アポトーシス作用が関与すると考えられた。さらには、S1P 受容体アンタゴニストである VPC23019 により、ApoM の LPS 誘導 DIC・MOF に対する保護作用が、少なくとも部分的に阻害されており、S1P の関与が考えられた (図 2、3)。

図 2. VPC23019 は LPS 誘導 DIC・MOF モデルマウスにおける ApoM の臓器保護作用を阻害する



(GFP, ApoM 過剰発現マウスに、VPC23019 [VPC]あるいは vehicle を投与した。それらのマウスに LPS 25 mg/kgBW を静脈注射し、24 時間後、生存したマウスの ALT[上], クレアチニン[下]を測定した。)

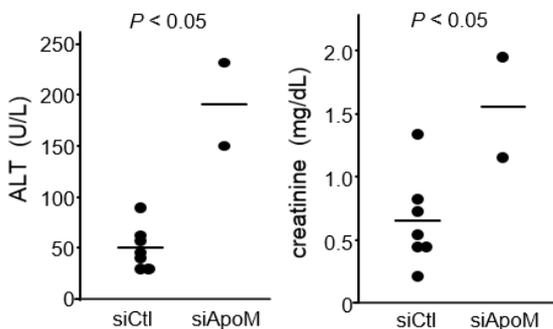
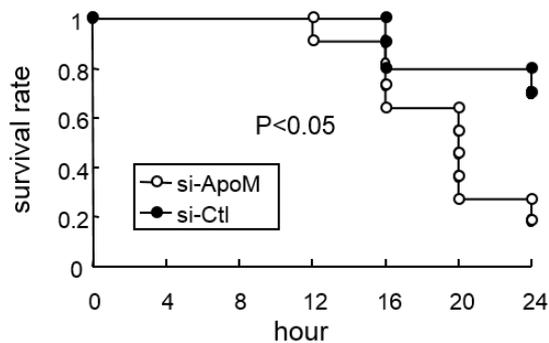
図 3. VPC23019 は LPS 誘導 DIC・MOF モデルマウスにおける ApoM の生存率改善作用を阻害する傾向がある



(GFP, ApoM 過剰発現マウスに、VPC23019 [VPC]あるいは vehicle を投与した。それらのマウスに LPS 25 mg/kgBW を静脈注射し、4 時間ごとに生存率を検討した。)

ApoM の発現を in vivo siRNA にて抑制すると、とは逆に LPS 誘導 DIC・MOF モデルマウスの生存率が悪化し、クレアチニン・ALT の上昇も促進した (図 4)。

図 4. ApoM 発現抑制は LPS 誘導 DIC・MOF による生存率を低下させ、ALT, クレアチニンの上昇を促進する

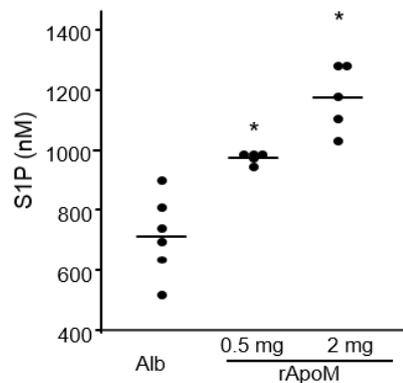


(野生型マウスに ApoM 発現抑制する siRNA[si-ApoM]あるいはコントロールの siRNA[si-Ctl]を投与した。その 5 日後、LPS 25 mg/kgBW を静脈注射し、4 時間ごとに生存率を検討し[上]、24 時間後生存したマウスの ALT, クレアチニンを測定した[下]。)

以上より、ApoM は少なくとも部分的に S1P を介して、LPS 誘導 DIC・MOF に対する抵抗作用を持つこと、その作用機序は抗凝固作用、抗アポトーシス作用が考えられた。

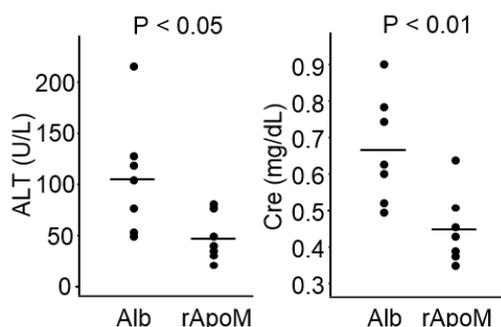
上記の結果を受けて、リコンビナント ApoM を作成して、DIC・MOF に対する治療医学的応用が可能かどうか検討した。リコンビナント ApoM は BIC システムを用いて合成し、ウエスタンブロットにて HDL 中の ApoM と同じバンドが検出できることを確認した。この作成したリコンビナント ApoM は、in vitro では S1P を分解から保護し、培養上清中の S1P 濃度を維持することができたが、残念ながら、リコンビナント ApoM を投与してもマウス血漿 S1P の増加は、有意差はあるものの、1.5~2 倍ほどにしか増加しなかった (図 5)。しかしながら、リコンビナント ApoM は、少量の LPS を投与したマウスのクレアチニン、ALT の上昇を抑制することができ、リコンビナント ApoM の代謝動態を研究し、改良すれば、DIC・MOF の治療へ応用することができると考えられた (図 6)。

図 5. リコンビナント ApoM は血漿 S1P 濃度を増加させる



(野生型マウスにアルブミン [Alb]あるいはリコンビナント ApoM [rApoM]を投与し、24 時間後に血漿 S1P を測定した。)

図 6. リコンビナント ApoM は LPS 誘導 DIC・MOF による臓器障害を軽減する



(野生型マウスに LPS 5mg/kgBW 腹腔内投与し、1 時間後に 2mg のアルブミン[Alb]あるいはリコンビナント ApoM [rApoM]を静脈内投与した。24 時間後に生存したマウスの ALT、クレアチンを測定した)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Takahashi, C., Kurano, M., Nishikawa, M., Kano, K., Dohi, T., Miyauchi, K., Daida, H., Shimizu, T., Aoki, J., and Yatomi, Y. Vehicle-dependent Effects of Sphingosine 1-phosphate on Plasminogen Activator Inhibitor-1 Expression. *J. Atheroscler Thromb.*, in press.

2. Kurano, M., Hara, M., Ikeda, H., Tsukamoto, K., and Yatomi, Y. Involvement of Cholesteryl Ester Transfer Protein in the Shift of Sphingosine 1-Phosphate Among Lipoproteins and in the Modulation of its Functions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37: 506-514, 2017.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Takahashi, C., Kurano, M., Nishikawa, M., and Yatomi, Y. Carrier-dependent Effects of Sphingosine 1-phosphate on Plasminogen Activator Inhibitor-1 Expression in Adipocytes. The 9th Congress of the Asia Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis. 2016. 10. 6 - 9. Taipei, Chinese Taipei.

2. Takahashi, C., Kurano, M., Nishikawa, M., Kano, K., Dohi, T., Miyauchi, K., Daida, H., Shimizu, T., Aoki, J., and Yatomi, Y. Sphingosine 1-Phosphate Possesses the Carrier-dependent Effects on the Plasminogen Activator Inhibitor 1 Expression in Adipocytes. AHA Scientific Sessions 2016. 2016. 11. 12 - 16. New

Orleans, Louisiana, USA.

3. 蔵野 信, 常山 幸一, 常名 政弘, 矢富 裕. アポ蛋白 M を用いた播種性血管内凝固症候群, 多臓器不全の新規治療法の開発. 第 38 回 日本血栓止血学会学術集会. 2016.6.18. 奈良春日野国際フォーラム (奈良県・奈良市)

4. 蔵野 信, 矢富 裕. リコンビナントアポ蛋白 M を利用した多臓器不全に対する新規治療法の開発. 第 56 回 日本臨床化学会年次学術集会. 2016.12.3. くまもと県民交流館パレア (熊本県・熊本市).

〔図書〕(計 4 件)

1. 蔵野 信. HDL の抗血栓作用. *臨床病理* 64 : 66-71, 2016 .

2. 蔵野 信, 矢富 裕. スフィンゴシン 1-リン酸と HDL. *医学のあゆみ* 259 : 878-879, 2016 .

3. 蔵野 信. アポ蛋白 M を通じたスフィンゴシン 1-リン酸学の構築. *臨床化学* 45:52-59, 2016 .

4. 蔵野 信, 可野 邦行, 矢富 裕, 青木 順賢. リゾリン脂質を標的とした診断と創薬. (村上誠, 横溝 岳彦 編)「実験医学 増刊号」Vol.33 No.15, pp. 178-185, 2015.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<http://lab-tky.umin.jp/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

蔵野 信 (Kurano, Makoto)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 60621745