

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20333

研究課題名(和文)敗血症病態における免疫担当細胞へのオートファジー機構の関与

研究課題名(英文)A potential role of autophagy in immune cells during sepsis

研究代表者

大網 毅彦(OAMI, Takehiko)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：70527887

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)：敗血症における免疫麻痺とオートファジーの関連を明らかにするために、T細胞のオートファジーを特異的に欠損させたAtg5コンディショナルノックアウトマウス(CD4-Cre/Atg5f/f)を用いた。盲腸結紮穿孔手術により敗血症腹膜炎モデルを作成し24時間後に解析を行った。CD4-Cre/Atg5f/fマウスでCD4<sup>+</sup>T細胞数低下、アポトーシス活性亢進を認めた。また、アポトーシス関連遺伝子であるBIMやPDCD1の発現が亢進していた。そして、生存率は有意に低下していた。本研究により、敗血症でT細胞のオートファジーはアポトーシスとのクロストークを介して、生体保護的に働いている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the details of the interaction between autophagy and immunosuppression, we analyzed apoptosis in T cells and survival rate after performing cecal ligation and puncture (CLP) operation on T cell-specific autophagy deficient mice. A blockade of autophagy accelerated T cell apoptosis compared with the control mice, augmenting the gene expression of BIM and PDCD1. Consequently, deficiency of autophagy in T cells significantly decreased the survival rate in the murine sepsis model. In conclusion, we demonstrated that T cell autophagy played a protective role against apoptosis and immunosuppression in sepsis.

研究分野：救急集中治療医学

キーワード：オートファジー アポトーシス 細胞死 敗血症 免疫麻痺 盲腸結紮穿孔 集中治療

## 1. 研究開始当初の背景

敗血症は救急集中治療領域における最重症病態のひとつであるが、未だ死亡率が高くその病態の全容は解明されていない。敗血症急性期には高サイトカイン血症による全身炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome; SIRS) とそれに引き続く臓器障害が病態の中心をなしているが、敗血症急性期の病態を乗り越えた後には免疫麻痺 (immunoparalysis) による易感染性が生命予後に関わってくる。免疫麻痺の病態において、免疫担当細胞の型プログラム細胞死であるアポトーシスが関与していることが知られており、ネクローシスやアポトーシスの敗血症への影響が徐々に明らかになってきている (1)。さらに、自食を意味する細胞内の蛋白分解機構の一種であるオートファジーが型プログラム細胞死を惹起し、アポトーシスとクロストークしていることも確認されている (2)。オートファジーという現象には飢餓応答としての栄養供給という働き以外にも、不要な organelle の分解、病原微生物の排除、腫瘍抑制などの役割も確認されており、生命維持に必須のシステムである。近年オートファジーと様々な疾病との関わりが研究報告されており、癌など一部の疾患ではオートファジーを利用した創薬の研究が進められている (3)。

敗血症におけるオートファジーの関与が近年注目を集めているが (4,5,6)、敗血症亜急性期に問題となる免疫麻痺の病態にオートファジーがどのように関わっているのかについて調べた研究は少ない。今日までに敗血症病態において、リンパ球、特に CD4T<sup>+</sup>細胞のアポトーシスが著明に起こり、亜急性期の免疫麻痺に大きく関与していることが判明している (7)。既報ではオートファジーの抑制がアポトーシスを促進することが報告されており (8)、抗アポトーシス蛋白である Bcl-2 がオートファゴソームの形成に必須である Beclin-1 との作用を介して、オートファジーとアポトーシスのクロストークを調節していることも示されている (9)。しかし、敗血症モデルにおける免疫担当細胞のアポトーシスとオートファジーのクロストーク

に関しては未だ明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

敗血症病態におけるアポトーシスとオートファジーのクロストークを免疫担当細胞において解明し、オートファジーの制御による敗血症の治療につなげることを目的とする。そこで今回、CD4 T<sup>+</sup>細胞特異的 Atg5 ノックアウトマウスを用いた機能解析により、免疫麻痺とオートファジーの関連を調べる。

## 3. 研究の方法

### (1)敗血症モデル作成:盲腸結紮穿孔(CLP)モデル

6~8週 C57B/6 雄マウスに対してイソフルレンで全身麻酔導入し、CLP手術を施行する。腹部正中小切開にて開腹し、盲腸を腹腔内から挙上する。そして、腸内容を盲腸先端まで圧搾した後に回腸から大腸への便通を妨げないように盲腸根部を 5-0 絹糸で結紮、緊満している盲腸を、23 ゲージ注射針で 2 回穿刺する。その後、その穿孔した盲腸をさらに圧搾し便を少量各孔から搾り出す。そのまま、盲腸を腹腔内に捺れがよい環納し 2 層に閉腹する。コントロールには、盲腸の結紮穿孔以外は全て同じ処置を行う単開腹 (Sham)モデルを使用した。

### (2)敗血症モデルにおける免疫担当細胞のオートファジー解析

敗血症モデルにおける免疫担当細胞のオートファジー動態を明らかにするために、脾臓を用いた解析を行う。まず電子顕微鏡で免疫担当細胞の形態学的変化を観察し、フローサイトメトリーで CD4T<sup>+</sup>細胞と B 細胞のオートファジー及びリソソーム、オートファジーで選択的に分解されるタンパク質である p62 の変化を解析した。オートファジーの生体モニタリングとして、全身のオートファゴソームが蛍光標識されている green fluorescent protein-microtubule-associated protein light chain 3 (GFP-LC3) マウスを使用した。

### (3)CD4 T<sup>+</sup>細胞特異的 Atg5 ノックアウトマ

## ウスの作成

CD4<sup>+</sup>T細胞特異的 Atg5 ノックアウトマウス (CD4-Cre/Atg5<sup>fl/fl</sup>) を作成するために、研究協力者である千葉大学バイオメディカル研究センター 幡野雅彦教授のラボより提供された CD4<sup>+</sup>T細胞 Cre マウスと RIKEN BRC より購入した Atg5<sup>flox</sup> マウスを交配させた。

## (4)CD4<sup>+</sup>T細胞特異的 Atg5 ノックアウトマウスを用いた敗血症時の免疫担当細胞の機能解析

CD4-Cre/Atg5<sup>fl/fl</sup> マウスとコントロールマウスに対して、CLP手術を施して腹膜炎敗血症モデルを作成した。術後 24 時間の脾臓リンパ球数の推移を評価し、Annexin-V 染色によるアポトーシス活性の変化をフローサイトメトリーで観察した。また、アポトーシス関連遺伝子の発現、ミトコンドリア局在状態と膜電位、サイトカイン産生能、生存率の変化について経時的に解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 敗血症モデルにおける免疫担当細胞のオートファジー動態の変化

電子顕微鏡で CLP 群マウスの CD4<sup>+</sup>T細胞を観察すると、傷害されたミトコンドリアとともに一重膜のオートリソソームと二重膜のオートファジーを認めた。定量的な評価を行うためにフローサイトメトリーでオートファジーの動態を観察したところ、術後 24 時間の時点で B 細胞において GFP-LC3 の平均蛍光強度は変化しなかったが、CLP 群マウスの CD4<sup>+</sup>T細胞では GFP-LC3 の平均蛍光強度が有意に増加した。さらに、CLP 群マウスの CD4<sup>+</sup>T細胞ではリソソームも増加していた一方で、オートファジーで分解されるべき p62 が CLP 群マウスの CD4<sup>+</sup>T細胞で有意に増加していた。以上の結果から、CD4<sup>+</sup>T細胞のオートファゴソームは敗血症病態で増加していたが、リソソームの増加や選択的分解蛋白である p62 の蓄積から、敗血症におけるオートファジーが生体にとって不十分である可能性が示唆された。

### (2) オートファジー欠損マウスを用いた敗血症時のアポトーシス解析

CD4-Cre/Atg5<sup>fl/fl</sup> マウスで CD4<sup>+</sup>T細胞数の低下、アポトーシス活性の亢進を認めた。さらに CLP 群の CD4-Cre/Atg5<sup>fl/fl</sup> マウスの CD4<sup>+</sup>T細胞において、アポトーシス関連遺伝子である *BIM* や *PDCD1* の発現が亢進する一方、アポトーシス抑制遺伝子である *BCL2* の発現は有意に低下していた。CD4-Cre/Atg5<sup>fl/fl</sup> マウスの CD4<sup>+</sup>T細胞では Sham 群および CLP 群ともにミトコンドリア蓄積が認められ、さらに CLP 群の CD4-Cre/Atg5<sup>fl/fl</sup> マウスのミトコンドリア膜電位はコントロール群に比べて有意に低下していた。また、CD4<sup>+</sup>T細胞の IL-10 産生は CLP 群の CD4-Cre/Atg5<sup>fl/fl</sup> マウスで有意に上昇していた。そして、生存率は CLP 群の CD4-Cre/Atg5<sup>fl/fl</sup> マウスで有意に低下していた。以上より、敗血症病態で免疫担当細胞におけるオートファジー欠損は、アポトーシスを惹起し、ミトコンドリア傷害等を介して転帰を悪化させると考えられた。

本研究により、敗血症の病態で T細胞のオートファジーはアポトーシスとのクロストークを介してプログラム細胞死を抑制し、生体保護的に働いている可能性が示唆された。現時点でオートファジーの制御による敗血症の治療につなげる最終的な段階までは到達していないものの、今回の研究結果を踏まえて治療への応用が見込まれる。今後ラパマイシンやインスリンなどオートファジーの制御効果（促進ないし阻害）が知られている薬剤の投与により、敗血症環境で細胞死の制御が行われるかについての詳細な検討を行い、最終的には個体の生存率を改善させることを目標としている。

### <引用文献>

- 1) Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D, et al: Nat Rev Immunol 2013;13:862-74.
- 2) Levine B, Yuan J: Autophagy in cell death:an innocent convict?. J Clin Invest 2005;115:2679-88.
- 3) Choi AM, Ryter SW, Levine B, et al: Autophagy in human health and disease. N

- Engl J Med 2013;368:651-62.
- 4) Watanabe E, Muenzer JT, Hawkins, et al : Sepsis induces extensive autophagic vacuolization in hepatocytes – a clinical and laboratory based study. Lab Invest 2009;89: 549-61.
  - 5) Takahashi W, Watanabe E, Fujimura L, et al: Kinetics and protective role of autophagy in a mouse cecal ligation and puncture-induced sepsis. Crit Care 2013;17:R160.
  - 6) Takasu O, Gaut JP, Watanabe E, et al: Mechanisms of cardiac and renal dysfunction in patients dying of sepsis. Am J Respir Crit Care Med 2013; 187, 509-17.
  - 7) Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, et al: Cell death. N Engl J Med 2009;361:1570-83.
  - 8) Boya P, González-Polo RA, Casares N, et al: Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. Mol Cell Biol 2005;25:1025-40.
  - 9) Pattingre S, Tassa A, Qu X, et al: Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. Cell 2005;122:927-39.

## 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 4 件)

- 1) Oami T, Watanabe E, Hatano M, Sunahara S, Fujimura L, Sakamoto A, Ito C, Toshimori K, Oda S. Suppression of T Cell Autophagy Results in Decreased Viability and Function of T Cells Through Accelerated Apoptosis in a Murine Sepsis Model. Crit Care Med. 2017; 45: e77-e85. (査読有)
- 2) 渡邊栄三, 大網毅彦, 砂原 聡, 木村友則, 高橋和香, 幡野雅彦, 織田成人: 外科侵襲と Autophagy - 敗血症, がんから PICS (persistent inflammation, immunosuppression, catabolism syndrome) まで - . 外科代栄 2017; 51: 9-15. (査読有)
- 3) 大網毅彦, 渡邊栄三, 幡野雅彦, 織田成人: オートファジーとそれに関連する細胞死 .

Thrombosis Medicine 2016; 6: 198-201. (査読有)

- 4) Watanabe E, Oami T, Sunahara S, Kimura T, Takahashi W, Hatano M, Oda S. Programmed cell death in sepsis-Determining whether a friend or foe-. Chiba Medical J 2016; 92E: 15-24. (査読有)

〔学会発表〕(計 2 件)

- 1) Oami T, Watanabe,E, Hatano M, Sunahara S, Fujimura L, Sakamoto A, Oda S. T cell autophagy plays a protective role through inhibition of apoptosis in a murine sepsis model. 39th Annual conference on Shock 2016 June 12 Hilton Austin Austin, U.S.A.
- 2) 大網毅彦, 渡邊栄三, 砂原 聡, 藤村理紗, 幡野雅彦, 織田成人: 敗血症病態における免疫担当細胞のオートファジーとアポトーシス .第 51 回腹部救急医学会総会 2015 年 3 月 5 日 京都府京都市 国立京都国際会館

〔図書〕(計 0 件)

〔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

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

大網 毅彦 (OAMI, Takehiko)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：70527887

### (2)研究分担者

### (3)連携研究者

### (4)研究協力者

渡邊 栄三 (WATANABE, Eizo)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：40375639

織田 成人 (ODA, Shigeto)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：90204205

幡野 雅彦 (HATANO, Masahiko)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：20208523