

令和 5 年 3 月 29 日現在

機関番号：12501
 研究種目：基盤研究(B) (一般)
 研究期間：2018～2020
 課題番号：18H02901
 研究課題名(和文)メタボロミクスから見た敗血症時のオートファジー動態 新規バイオマーカーの検索

研究課題名(英文)The kinetics of autophagy following septic insults from metabolomics analyses - Exploration of novel biomarkers on sepsis -

研究代表者
 渡邊 栄三 (Watanabe, Eizo)
 千葉大学・大学院医学研究院・特任教授

研究者番号：40375639
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症において、オートファジーに関連するバイオマーカーの検索を企図した。下部消化管穿孔(敗血症)患者の血漿およびそのモデルである盲腸結紮穿孔(CLP)手術を施行したマウスの血漿でメタボローム解析を行った。その結果、共通代謝経路として、タンパク質構成アミノ酸, Ceramide, Gly/Ser/Thr関連物質が導出された。一方, Alb-CreERT2/Atg5f/fマウス(KO)の肝臓検体と野生型(WT)のCLPで比較したところ, 酸化ストレスに関わるものが4種類抽出された。MINT-sPLSDA法による判別因子は5種類であり, 電子伝達系・糖代謝物・ジペプチド等に関連するものであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症は、感染症の最重症病態であるが、その病態自体に対する治療薬は未開発である。一方、敗血症モデルマウスにおいて、敗血症急性期ではオートファジーが一過性に亢進し、その後抑制傾向となること、そしてそのことが炎症反応や転帰に悪影響を及ぼしていることが判明していた。本研究では、メタボロミクスで発見されたオートファジー誘導物質の投与により、オートファジー調節を介した敗血症治療に結びつけることが最終目的である。今回、ヒトとマウスで同様の敗血症(腹膜炎)の検体を用い、血漿によるメタボロミクスを比較、共通代謝経路を導出できたことから、今後のオートファジー経路からの敗血症バイオマーカー検索に繋がった。

研究成果の概要(英文)：We sought to investigate the detailed mechanism of autophagy regulation in sepsis. Moreover, we wanted to clarify the characteristics of plasma metabolites in septic patients due to perforation of the digestive tract and the mouse model of sepsis, i.e., cecal ligation and punctures (CLP) by metabolomic analysis using the plasma. As results, proteinogenic amino acids, Ceramide, Gly/Ser/Thr were common pathways between septic patients and mice due to peritonitis. On the other hand, when we compare metabolites of CLP liver from Alb-CreERT2/Atg5f/f (KO) mice and those of wild-type mice (WT), 97 and 49 metabolites were extracted at 8 hrs and 24 hrs after CLP surgery, respectively. Among them, the four metabolites are related to oxidative stress. Furthermore, the five metabolites segregated the KO CLP from WT CLP in the liver, of which electron transfer system, glucose metabolism, and dipeptide-associated metabolites were listed.

研究分野：救急集中治療医学

キーワード：敗血症 腹膜炎 メタボロミクス 酸化ストレス バイオマーカー オートファジー 細胞死 タンパク構成アミノ酸 細菌性

1. 研究開始当初の背景

オートファジー機構は、飢餓応答としての栄養供給という働き以外にも、不要なオルガネラの分解、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。一方、II型プログラム細胞死であるアポトーシスに対して、I型プログラム細胞死と称されることもあり、過剰なオートファジーは、細胞質の著明な空胞化によるオルガネラの喪失が甚大となり細胞死を惹起することもあるとされる。他方、敗血症患者のTリンパ球や腸管上皮細胞などでは、アポトーシスによる細胞死が、ネクローシスに比べて数多く認められることが判明していた。さらに、敗血症患者の脾臓 CD4+T 細胞においてアポトーシスが顕著に起きて、AIDS のような免疫抑制状態に陥ることを提唱した (*N Engl J Med* 2003)。そしてそのことが、同疾患の転帰を悪化させる免疫麻痺に繋がることから、免疫担当細胞におけるアポトーシス制御というアプローチからの免疫麻痺回避を、共に試みている (*Intensive Care Med* 2019, *Shock* 2020)。申請者は特に、アポトーシスとのクロストークの存在が示唆されるオートファジーに着目し、敗血症病態にオートファジーが関連していることを発見し、最近まで研究を重ねて知見を得てきた (*Lab Invest* 2009, *Crit Care* 2013, *Crit Care Med* 2017, *Shock* 2018)。

2. 研究の目的

オートファジーは敗血症急性期の重要臓器において生体保護的に一過性に亢進するが、次第に遅延することが判明し、亜急性期に停滞しているオートファジーを促進させることが敗血症病態改善に繋がると考えた。事実、有益な筈の早期経静脈栄養補助が重症患者の転帰を改善させないという結果となった EPaNIC trial で、過栄養によるオートファジー抑制が悪影響を及ぼしたと考察されている (Casaer MP, et al. *N Engl J Med* 2011)。そこで今回、敗血症時の代謝面からみたオートファジーの関与を、敗血症動物モデルの肝と血清および敗血症患者の血清を用いたメタボロミクス解析により明らかにすることを目的とする。それによりオートファジー関連経路の新規バイオマーカーの発見および新規治療法の開発を目指す。一般的に、侵襲時にはタンパク異化亢進を防ぐべく、低栄養は避けねばならない。ただし、オートファジー発動を勘案すると過栄養は有害となることから、現在広く受け入れられている permissive underfeeding の効果は、オートファジーが少なからず寄与するとの説を申請者は提唱し (*Chiba Medical J* 2016, 侵襲と免疫 2013) 本研究の学術的独自性となっている。したがって、敗血症バイオマーカーの検出のみならず、その標的分子をモニタリングしつつ、オートファジーで敗血症を治療するという新規治療法の開拓が将来的な目標である。

3. 研究の方法

1) 敗血症患者と非敗血症 ICU 患者におけるメタボローム解析 (血漿)

対象: ICU に入室した 18 歳以上の患者で、下部消化管穿孔等の腹腔内感染症による敗血症患者 (のちに計画している盲腸結紮穿孔 (cecal ligation and punctures; CLP) 敗血症モデルとの類似性を勘案、術直後検体 (n=10))。コントロール患者は、非感染性の開腹患者 (イレウスなど)、術直後検体 (n=7) とした。

敗血症患者とコントロール患者において、血漿を用いて、術後 ICU 入室時にメタボローム解析を行った。敗血症診断には sepsis-3 の診断基準 (Singer M, et al. *JAMA* 2016) を用いた。まずは敗血症患者血漿で上昇している代謝物をターゲット代謝物プロファイリングで抽出した (図 1)。

2) 敗血症マウスにおけるメタボローム解析 (血漿)

C57BL/6J 野生型マウスの CLP (敗血症) と sham 単開腹手術モデル (非敗血症) を術後 8 時間および 24 時間で比較し、包括的代謝プロファイリングを行った (各群 n=4)。CLP は、23 ゲージ針で盲腸を 2 回穿刺した。CLP マウス血漿で上昇している代謝物をターゲット代謝物プロファイリングで抽出した (図 2)。血漿のメタボローム解析データについては、ヒト敗血症とマウス CLP で、共通に変動しているものの同定を行った。

ヒト、マウスいずれも、CE-MS を用いたデータ (Basic Scan 解析結果) と LC-MS を用いたデータ (Mediator Scan 解析結果) に分かれていたことから、まずはヒト、マウスそれぞれにおいてデータの統合を行った。そして、ヒト血漿データの「敗血症 vs コントロール」の比較において、Welch の t 検定で $p < 0.05$ となった 30 物質を選択し MSEA (metabolite set enrichment analysis) を実施した。その後、マウス血漿による、CLP 24 時間後と Sham 24 時間後との比較において、Welch の t 検定で $p < 0.05$ となった 214 物質を選択し MSEA を実施した。

3) オートファジー機構から見た敗血症マウスにおけるメタボローム解析 (肝)

時期特異的・肝細胞特異的にオートファジーを欠損させた Alb-Cre^{ERT2}/Atg5^{ff} マウス (KO) に CLP を施行し、C57BL/6J 野生型 (WT) の CLP 施行マウスと比較した。さらに敗血症刺激で変動するオートファジー関連代謝物を導出すべく、経時的 (無刺激、術後 8 時間、24 時間) に包括的代謝プロファイリングを行った (図 3, 各群 n=4)。

4. 研究成果

3 - 1) 敗血症 (Sepsis) 患者血漿で Control に比して上昇している代謝物をターゲット代謝物プロファイリングで抽出した (図 1).

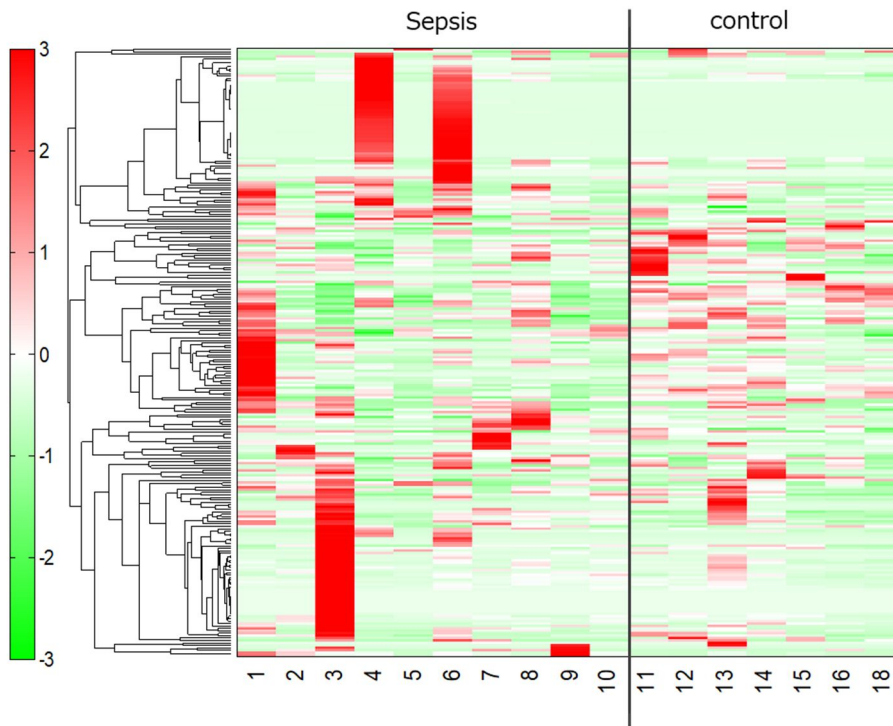


図 1. 敗血症患者とコントロールにおける階層的クラスタリング解析 (HCA) およびヒートマップ

3 - 2) CLP マウス血漿で sham に比して上昇している代謝物をターゲット代謝物プロファイリングで抽出した (図 2). ヒトとマウスの敗血症血漿を用いたメタボローム解析結果で共通の振舞いを示した物質から, 共通パスウェイとして, タンパク質構成アミノ酸 (Proteinogenic amino acids), セラミド (Ceramide), Gly/Ser/Thr 関連物質 (Gly/Ser/Thr) がリストアップされた.

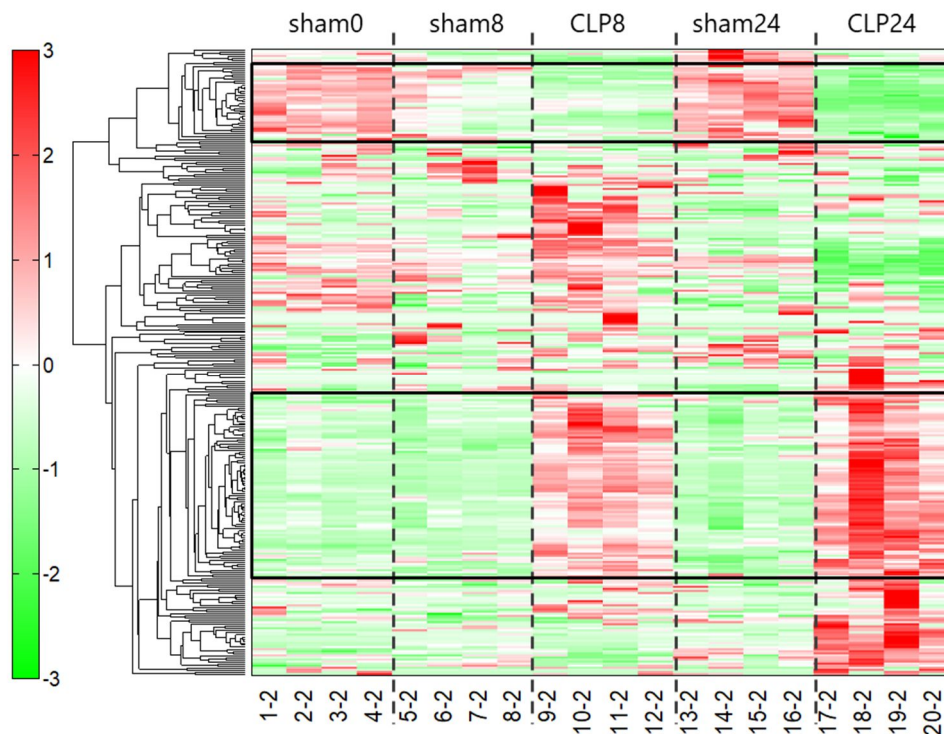


図 2 .敗血症マウス (CLP)と非敗血症マウス (sham) における階層的クラスタリング解析(HCA) およびヒートマップ

3 - 3) Alb-Cre^{ERT2}/Atg5^{f/f} マウスの肝臓検体 (KO) と野生型 (WT) の CLP で比較した結果を以下に示す (図 3)。

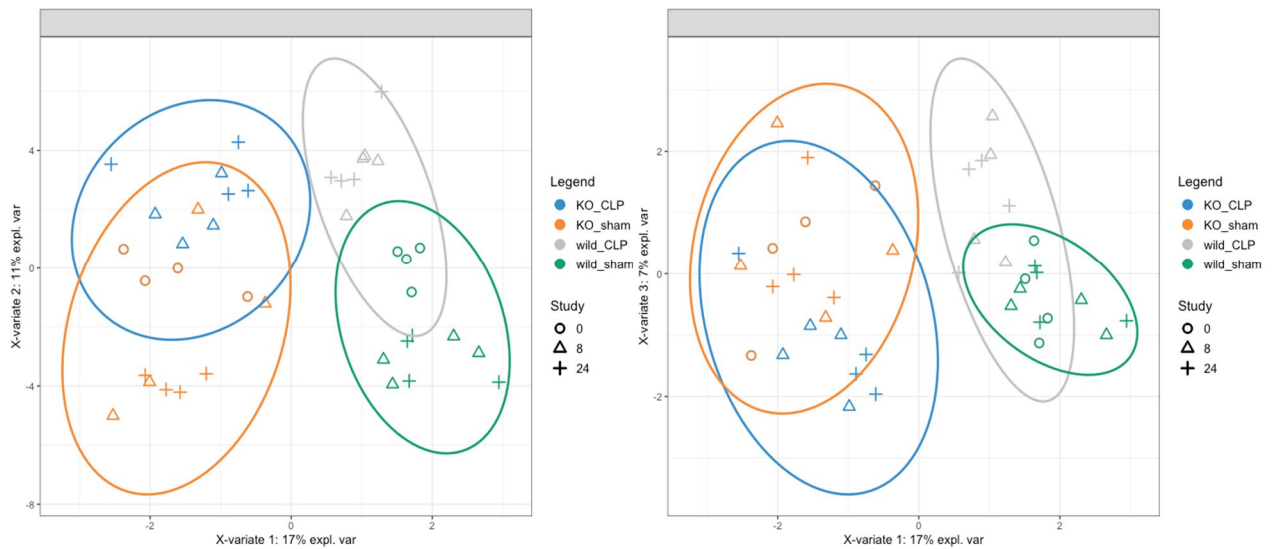


図 3 . ATG5 KO と WT マウスの CLP 手術後肝データを用いた主成分分析

データベースと照合可能な 413 種類の代謝産物が抽出された中で, KO マウスと WT マウスにおいて有意に差を認めたものは 8 時間で 97 種類, 24 時間で 49 種類あった. この中で酸化ストレスに関わるものが 4 種類であった. また MINT-sPLSDA 法 により KO マウスと WT マウスを区別する因子は 5 種類であり, 電子伝達系・糖代謝物・ジペプチドなどに関連するメタボライトがリストアップされた (図 4)。

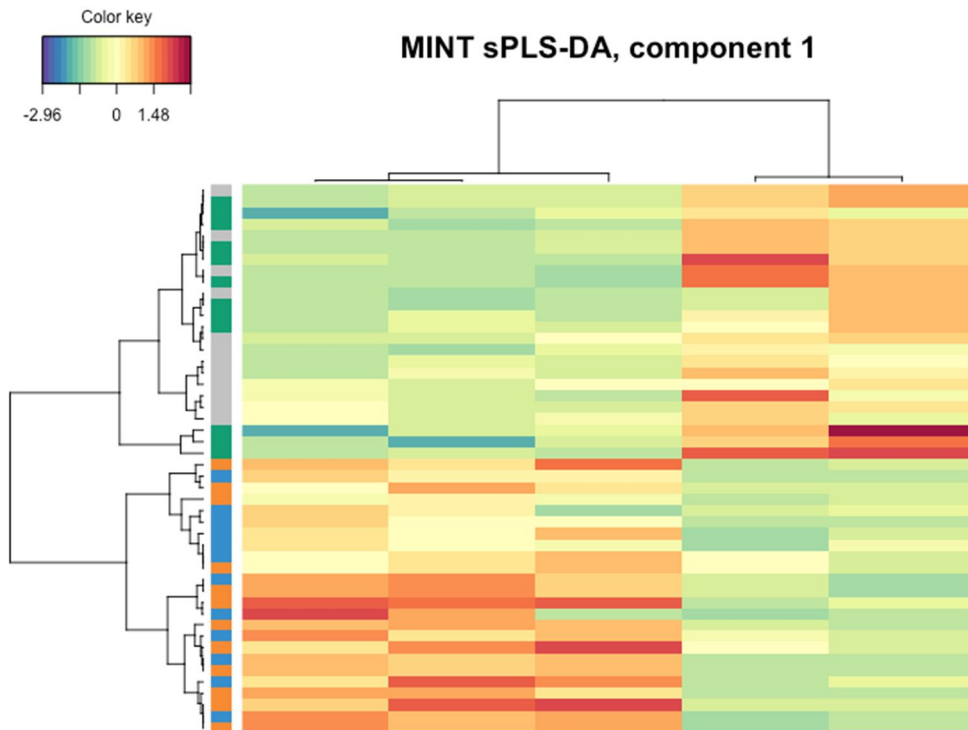


図 4 . ATG5KO および野生型敗血症 (CLP) マウスにおける, MINT-sPLSDA 法により抽出されたメタボライトの経時的階層的クラスタリング解析 (HCA) およびヒートマップ

今後、3 - 1)、2)の血漿を用いた実験によってリストアップされた物質、およびそれらが関わるパスウェイと3 - 3)により得られたものを比較検討、さらには統合し、オートファジー制御の観点からの敗血症バイオマーカー検索を進める方針である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Klionsky DJ, Watanabe E, et al. | 4. 巻 17 |
| 2. 論文標題 Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition) | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Autophagy | 6. 最初と最後の頁 1-382 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15548627.2020.1797280 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 渡邊 栄三 | 4. 巻 53 |
| 2. 論文標題 敗血症時のAutophagyと栄養管理 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 外科と代謝・栄養 | 6. 最初と最後の頁 287-292 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 渡邊 栄三 |
| 2. 発表標題 敗血症病態におけるMitophagyの役割とその制御の可能性 |
| 3. 学会等名 日本外科代謝栄養学会第58回学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------------------|--|---|----|
| 研究 分 担 者 | 幡野 雅彦 (Hatano Masahiko) (20208523) | 千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 伊藤 千鶴 (Ito Chizuru) (80347054) | 千葉大学・大学院医学研究院・講師 (12501) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |