

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16513

研究課題名(和文) 侵襲時生体反応におけるオートファジーの役割とその制御：エネルギー供給の観点から

研究課題名(英文) The role of autophagy in biological reaction of sepsis: From the viewpoint of energy supply

研究代表者

蛭原 健 (TAKESHI, EBIHARA)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10813975

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)：敗血症などの侵襲病態でのオートファジーの役割は不明な点が多い。今回、脂肪組織に注目し脂肪組織での敗血症病態でのオートファジーの役割を明らかにした。

敗血症において、脂肪組織でのオートファジーは時間と共にダイナミックに動態を変えており、その活性化には侵襲により産生されるサイトカインの一つであるTNF- α の関与が明らかとなった。脂肪組織特異的にオートファジーが起こらないようにすると侵襲に対して生体防御的な作用が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の医療水準の向上にも関わらず、全世界で年間2500万人以上が敗血症に罹患し、そのうち4人に1人が死亡する。敗血症の治療は抗生剤投与に加えて輸液や強心薬投与などの対処療法が主体であるが、それだけでは救命することが困難な症例が存在し、更なる敗血症病態の解明や治療法の創出が急務である。

今回、敗血症病態での脂肪組織のオートファジーは劇的な変化をしており、オートファジーの亢進を抑えることで生体に対して防御的な働きが観察されたことから、今後敗血症の新たな治療につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The role of autophagy in invasive conditions such as sepsis remains unclear. We have clarified the role of autophagy in adipose tissue.

(1) In sepsis, autophagy in adipose tissue dynamically changes with time, and it was revealed that TNF- α , which was one of the cytokines produced by infection, was involved in the activation. (2) When autophagy was specifically ablated in adipose tissue, a bioprotective action against invasion was observed.

研究分野：救急医療

キーワード：敗血症 オートファジー 脂肪

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の医療水準の向上にも関わらず、全世界で年間 2500 万人以上が敗血症に罹患し、そのうち 4 人に 1 人が死亡する。敗血症の治療は抗生剤投与に加えて輸液や強心薬投与などの対処療法が主体であるが、それだけでは救命することが困難な症例が存在し、更なる敗血症病態の解明や治療法の創出が急務である。

オートファジーは細胞内での自食作用として捉えられ、飢餓時のエネルギー供給以外にも、障害されたミトコンドリアなどの細胞内器官を分解して細胞死を回避に関与することや、病原微生物の排除などの自然免疫への関与が報告されている。

敗血症におけるオートファジーの役割に関しては近年盛んに研究がなされているが、脂肪組織でのオートファジーの役割を明らかにしたものはない。

2. 研究の目的

敗血症病態における脂肪組織でのオートファジー動態、メカニズム並びに役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 敗血症病態における脂肪組織でのオートファジー動態の解明

LPS 投与、敗血症病態類似マウスを用いて、LPS 投与後、1、6、24 時間後の脂肪組織（皮下脂肪）におけるオートファゴソームの膜蛋白である LC3-、オートファジーでの特異的分解基質である P62 を western blot を用いて評価する。さらに脂肪組織を取り出しリソソーム阻害剤を用いて培養することでオートファジーの動的な動き（Autophagy flux assay）を評価する（LPS 投与 1、24、48 時間）。

(2) 脂肪組織でのオートファジーが亢進するメカニズムの解明

脂肪組織でのオートファジーが LPS の直接作用で変化するのか、LPS 投与により生体で産生される各種サイトカインによって変化するのか明らかにするため以下の実験を行った。まず、マウス 3T3L1 細胞をインスリン、デキサメタゾン、ピオグリタゾン、IBEX を用いて脂肪細胞に分化させ、培養液のアディポネクチン濃度を測定し、oil red 染色にて脂肪滴が産生されること確認した。LPS(1 µg/ml)、TNF- (10ng/ml)、IL-6(20ng/ml)で刺激し 24 時間後のオートファジーを flux assay にて評価した。続いて脂肪細胞とマウスのマクロファージ細胞である RAW264 を用いて共培養（接触法、非接触法）下に LPS(1 µg/ml)にて刺激し 24 時間後のオートファジーを flux assay を用いて評価した。

(3) LPS 投与マウスにおけるオートファジーの役割解明

マウスの腹腔内に体温計を埋め込み、LPS 投与後の体温を測定した。また代謝モニターを用いて LPS 投与後の酸素消費量、二酸化炭素排出量、呼吸商を測定した。続いてリソソームの阻害剤

であるクロロキンを投与し、投与していない場合と比較して LPS 投与後の体温の変化や、代謝動態に変化が生じるか観察した。また生存率も合わせて評価した。

続いて脂肪組織特異的な ATG5 ノックアウトマウスを用いた。8 匹のコントロールマウスと 8 匹のコンディショナルノックアウトマウスに LPS(15mg/kg)を投与し 24 時間後の生存率並びに炎症性サイトカイン、ケモカイン、血糖値、血清トリグリセライド値、血清遊離脂肪酸値を評価した。

4 . 研究成果

1. LPS 投与 24 時間後に LC3- 並びに p62 は有意に増加した。Autophagy flux assay を行ったところ LPS 投与後 1 時間でオートファジーの亢進、24 時間では低下が見られた。48 時間では生食投与群と比較して Autophagy の有意な亢進、低下は見られなかった。

2. 3T3L1 細胞を脂肪細胞に分化誘導し培養液中のアディポネクチンが上昇すること、oil red 染色にて脂肪滴が産生されることを確認したのち実験を行った。LPS、IL-6 の投与では脂肪細胞のオートファジーは変化しなかった。一方、TNF- 投与により 24 時間の 3T3L1 細胞のオートファジーは有意に亢進していた。RAW264 との共培養においては非接触法で、RAW264 細胞の細胞数を増加させることで 3T3L1 細胞のオートファジーの亢進が観察された。一方、接触法では LPS 刺激によりオートファジーの低下が観察された。

3. LPS 投与によりマウスは投与 12 時間をピークとして低体温を呈した。また代謝も顕著に抑制され、回復までには 4 日程度かかることが分かった。これは LPS の投与量に依存していた。クロロキンの投与では、LPS 投与後の体温変化や、代謝動態の変化は認めなかった。死亡率も有意な差は認めなかった。

脂肪細胞特異的 ATG5 ノックアウトマウスは Cre-loxP 部位特異的組み替え手法を用いて、アディポネクチンを標的とした。LPS(15mg/kg)の投与によりコントロール群で 4 匹(50%)、コンディショナルノックアウト群で 8 匹(100%)生存した。24 時間生存例での、血中サイトカイン、ケモカインの測定ではノックアウト群で IL-1 、 MCP-1 が有意に低下していた。

以上の研究から、侵襲時には急速に増加する TNF- により脂肪細胞でのオートファジーが誘導され、その後低下することが考えられた。この急激なオートファジーの亢進を制御することが、炎症性のサイトカインやケモカインの産生に関与している可能性が考えられ、今後の敗血症治療の新たな治療ターゲットになりうる可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 TAKESHI EBIHARA
2. 発表標題 LOW DOSE LIPOPOLYSACCHARIDE(LPS) INDUCE AUTOPHAGY, BUT HIGH DOSE LPS IMPAIR AUTOPHAGY IN ADIPOSE TISSUE
3. 学会等名 42nd Annual CONFERENCE ON SHOCK (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蛸原 健
2. 発表標題 LPSは脂肪組織でのオートファジーを亢進させるのか阻害するのか？
3. 学会等名 第25回日本エンドトキシン自然免疫研究会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----