

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03757

研究課題名(和文)敗血症性多臓器不全におけるSTAT3の遺伝子治療による創薬科学医療イノベーション

研究課題名(英文) Medical innovation using gene therapy of transcriptional factor STAT3 in septic multiple organ dysfunction

研究代表者

松田 直之(Naoyuki, Matsuda)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50332466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：盲腸結紮穿孔によるマウス敗血症モデル(CLP)において、STAT3上流のJAK2の活性が高まり、時系列でSTAT活性が高まること、そして合成二本鎖STAT3デコイオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)の*in vivo*導入がCLPマウスの臓器損傷を低下させることを確認した。STAT3デコイODNは、CLPマウスにおける炎症性サイトカイン/ケモカインの過剰産生を減少させ、さらにHMGB1などの炎症性分子の産生を肺や肝臓で有意に抑制した。この結果は、敗血症におけるSTAT3の役割を明確とし、敗血症の遺伝子治療におけるSTAT3デコイODNの潜在的な有用性を示唆する結果となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症は、さまざまな病気に合併し、臓器障害を進行させる病態である。本研究は、敗血症における転写因子STAT3の役割を、敗血症モデル動物の時系列で評価し、敗血症における遺伝子治療として転写因子STAT3をターゲットとした創薬科学の潜在的な有用性を示す結果となった。敗血症の新規治療薬として、IL-6受容体シグナルを制御することの提案となる学術的意義と、今後の創薬科学における社会的意義があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In septic mouse model (CLP) by cecal ligation and puncture, JAK2 activity and STAT3 activity was increased in time series. Synthetic administration of double-stranded STAT3 decoy oligodeoxynucleotide (ODN) reduced organ damage in major organs including the lungs, liver, kidneys. STAT3 decoy ODN reduced the overproduction of inflammatory cytokines and chemokines in CLP mice, and significantly suppressed the production of inflammatory molecules such as HMGB1 in the lungs and liver. The result clarifies the role of STAT3 in sepsis and suggests the potential usefulness of STAT3 decoy ODN in gene therapy for sepsis.

研究分野：救急医学

キーワード：敗血症 遺伝子治療 STAT3 炎症性サイトカイン IL-6 JAK2

1. 研究開始当初の背景

敗血症は、2016年に感染症により臓器不全が進行する病態として再定義され、2017年5月26日の世界保健機構総会において「当面の解決すべき医療上の重要課題」して議決された (Martischang R, et al. Crit Care 2018;22:92)。

本研究のテーマとした Interleukin-6 (IL-6) は、ヒトの正常時では 35 pg/mL 未満の血中濃度であるが、敗血症では長期にわたり、血中濃度を高めることが知られている。この IL-6 は敗血症などにおける「炎症マーカー」として期待されているが、敗血症の時系列で血中 IL-6 が、どの細胞に、どのように作用しているかを明確に論じることができない。敗血症における IL-6 受容体シグナルの詳細な解析が必要とされている。

2. 研究の目的

本研究は、敗血症で血液中に長い時系列で上昇傾向を示す IL-6 が、「どの細胞に作用し」、「どのような作用をもたらすか」を敗血症病態動物モデルで解析し、IL-6 受容体シグナルの細胞作用を明らかとすることを第1の目的とする。

次に、IL-6 受容体シグナルにおいて活性化される重要な転写因子である Signal Transducers and Activator of Transcription-3 (STAT-3) を、主要臓器が「どのレベルまで活性化するか」についてゲルシフト法および STAT3 リン酸化で解析し、IL-6 受容体発現細胞間での転写因子 STAT-3 の活性強度を評価することを第2の目的とする。

最終的に、IL-6 受容体シグナルとして活性化される「転写因子 STAT-3」の結合する転写領域 GAS (-interferon-activated site; 5'-TTTCCnGGAAA-3', n:任意) および SIE (c-sis-inducible element; 5'-GATCTACGGATTTCGGGAAATGAAGCT-3') の活性を、これらの遺伝子配列に類似したデコイ核酸や抗体試薬等で抑制し、敗血症の時系列における転写因子 STAT-3 の役割を遺伝子治療として明瞭とすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 敗血症モデル動物の作成

8~12週齢の雄性 BALB/c マウスを 3~4%のセボフルランで吸入麻酔し、麻酔下で盲腸結紮・穿孔術 (cecum ligation and puncture: CLP) (文献参照)を行い、敗血症モデル動物として評価する。対照群 (Sham 群) は、腹膜切開と虫垂先端の膨出のみを行ったものとする。研究対象は、対照群と CLP 群の作成後 48 時間までの時系列で評価した。以上の CLP 群に対して、STAT-3 の遺伝子治療群を併設する。重要臓器として、特に肺、心臓、肝臓、腎臓の組織評価を行う。

参考文献: Matsuda N, et al. Silencing of caspase-8 and caspase-3 by RNA interference prevents vascular endothelial cell injury in mice with endotoxic shock. Cardiovasc Res. 2007;76:132-40.

(2) STAT3 デコイ核酸の作成

研究にあたっては、STAT3 デコイ核酸を設計し、その効果を評価する。マウスへの STAT3 デコイ核酸 (ODN) の導入には、AteloGene Systemic Use キット (KOKEN, 東京, 日本) を使用する。この合成 ODN (8 nmol/匹) を含む滅菌蒸留水 (200 µL) を、セボフルラン麻酔のマウスの尾静脈に、手術 60 分後に室温で約 20 秒かけて注入する。

(3) 血液の解析

マウスの心臓穿刺により、血液を約 0.5 mL 採取する。TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、および MCP-1 の血中濃度は、市販の ELISA キット (R&D Systems, ミネアポリス, 米国) を製造元の指示に従って使用し、測定する。

(4) STAT3 活性の評価

摘出した組織標本からの核タンパク質の抽出には、市販の核抽出キット (Sigma-Aldrich, セントルイス, ミズーリ州, 米国) を使用し、ゲルシフト法で STAT3 活性を評価する。このゲルシフト解析には、シフトアッセイキット (LI-COR, ネブラスカ州リンカーン) を使用し、製造元のマニュアルを用いて STAT3 活性を評価する。STAT3 デコイ核酸およびミスマッチ配列の治療群を併設し、敗血症モデルマウスでの主要臓器の STAT3 活性を評価する。

(5) ウェスタンブロット解析

敗血症マウス動物の主要臓器を摘出し、ウェスタンブロット解析を施行する。市販されている以下の抗体を使用する。抗ヒト STAT3 マウスモノクローナル抗体 (1:1,000; Cell Signaling,

Danvers, MA), 抗マウス phospho-STAT3 (Thy-705) ウサギモノクローナル抗体 (1:1,000; Cell Signaling), 抗ヒト JAK2 マウスモノクローナル抗体 (1:300; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), 抗ヒト phospho-JAK2 (Tyr-1007/Tyr-1008) ウサギポリクローナル抗体 (1:500; Cell Signaling), 抗ヒト Src ウサギモノクローナル抗体 (1:1,000; Cell Signaling), 抗ヒト phospho-Src (Tyr-416) ウサギモノクローナル抗体 (1:1,000; Cell Signaling), および抗ヒトグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) ニワトリポリクローナル抗体 (1:3,000; EMD Millipore, Billerica) などとする。

(6) RNA 抽出と定量的リアルタイム PCR

RNA 抽出と定量的リアルタイム PCR を施行する。検討する分子標的に対して、定量的リアルタイム PCR に用いるプローブの塩基配列は以下とする。

TNF- プローブ: forward 5' - GTTCTATGGCCAGACCCTCAC-3'

および reverse 5' -GGCACCACTAGTTGGTTGTCTTTG-3'

IL-1 プローブ: forward 5' -TCCAGGATGAGGACATGAGCAC-3'

および reverse 5' -GAACGTCACACACCAGCAGGTTA-3'

IL-6 プローブ: forward 5' -CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTA-3'

および reverse 5' -GCAAGTGCATCATCGTTGTTTCATAC-3'

MCP-1 プローブ: forward 5' -CTCCAGCCTACTCATTGGGATCA-3'

および reverse 5' -GCATCCACGTGTTGGCTCA-3'

HMGB1 プローブ: forward 5' -AGCCCTGTCCTGGTGGTATTTTCAA-3'

および reverse 5' -GCTGTGCACCAACAAGAACCTGC-3'

GAPDH プローブ: forward 5' -TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'

および reverse 5' -TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'

参考文献: Kawakami M, et al. Role of G protein-coupled receptor kinase 2 in oxidative and nitrosative stress-related neuro histopathological changes in a mouse model of sepsis-associated encephalopathy. *J Neurochem.* 2018;145:474-488.

(7) 組織学的評価

組織を 10% 緩衝ホルムアルデヒドで浸水固定し、パラフィンに包埋後に厚さ 4 μm の切片に切断し、ヘマトキシリン・エオシン染色および免疫組織学的評価とする。研究手法は、これまでの研究手法に準じる。

参考文献: Matsuda N, et al. Silencing of fas-associated death domain protects mice from septic lung inflammation and apoptosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;179:806-15.

4. 研究成果

(1) 動物研究の承認

名古屋大学の動物研究施設における承認 (第 20327 号, 第 210623 号, 第 30438 号, 第 31345 号) に基づいて施行された。また, 富山大学分子医科薬理学との共同研究として研究は施行された。すべての動物実験と方法は, 関連するガイドラインと規制に従って実施された。

(2) STAT3 デコイ核酸の効能

作成した STAT3 デコイ核酸の中では, [5' -CATTTCCTCCGTAATC-3' / 3' -GTAAAGGGCATTAG-5'] の効能が最も高かった。この STAT3 デコイ核酸の導入により, CLP マウスのさまざまな臓器で活性化される STAT3 活性を正常に近づけることが, ゲルシフト法で確認された。全肺の評価においては, CLP 作成後 6 時間後より STAT3 活性が高まり, 約 18 時間後で最大活性となると評価された。この STAT3 の最大活性レベルを, 作成した STAT3 デコイ核酸で正常レベルに抑制できることが確認された。

(3) サイトカイン濃度の解析

酵素免疫測定法を使用して, CLP 後のマウスの炎症性サイトカインの血中濃度の変化を調べた結果, IL-1, IL-6, TNF-, MCP-1 の顕著な増加が確認できた。これらサイトカインの血中濃度の上昇は, STAT3 デコイ核酸で抑制された。IL-6 のマウス血中濃度は CLP 18 時間後に約 30,000pg/mL を超えるレベルに増加したが, STAT3 デコイ核酸の CLP 1 時間後の投与により 2,000pg/mL 以下に抑制できた。

また, 肺, 肝臓, 腎臓および心臓において施行されたリアルタイム PCR 解析では, これら炎症誘発性サイトカインの mRNA レベルは CLP 作成後に著明な上昇となったが, STAT3 デコイ核酸による治療により, 各組織での mRNA レベルの増加を抑制できた。IL-6 mRNA は基準レベルに対して, 全肺と全肝臓では 170 倍以上, 全腎臓では 300 倍以上, そして全心臓では約 100 倍に増加していた。上昇した IL-6 mRNA レベルは, STAT3 デコイ核酸の投与によりすべて対象臓器で抑制されたが, 特に肺と肝臓で強い抑制が確認された。

(4) STAT3 活性

ウエスタンブロット解析では、STAT3 リン酸化は CLP 後のすべての組織で時間依存的に大きく増加し、肺では CLP の 3 時間後から 18 時間後まで基準レベルの 10 倍以上に増加した。一方、心臓では、他の臓器に比較して STAT3 リン酸化は遅れる傾向があり、CLP12 時間後でピークを示した。これは、心房筋と心室筋を分けて評価する必要がある評価されたが、心房のみの評価が組織量の少なさより困難だった。さらに、敗血症後の JAK2 および Src の活性化においては、CLP マウスの肝臓において基準値の 3 倍を超える JAK2 のリン酸化の増加を認めたが、Src のリン酸化は亢進しないことが確認された。他の臓器における JAK2 の評価をまとめることはできていない。

(5) 組織学的評価

CLP マウスにおいては、これまでの当該研究において肺、心臓、血管内皮、脾臓等の障害を論文報告してきたが、今回の研究においてもさまざまな臓器の障害の進行が確認された。肺のヘマトキシリン・エオジン染色の切片の組織学的評価では、大量の炎症細胞の浸潤、うっ血、不規則な肺泡領域の障害などが確認できた。CLP18 時間後では肺泡出血が確認されたが、この肺泡出血や肺組織障害を STAT3 デコイ核酸が抑制することを明らかとした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hattori Y, Hattori K, Machida T, Matsuda N	4. 巻 197
2. 論文標題 Vascular endotheliitis associated with infections: Its pathogenetic role and therapeutic implication	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem Pharmacol	6. 最初と最後の頁 114909
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bcp.2022.114909. Epub 2022 Jan 10.	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 -
1. 著者名 Suzuki T, Yamashita S, Hattori K, Matsuda N, Hattori Y	4. 巻 394
2. 論文標題 Impact of a long-term high-glucose environment on pro-inflammatory responses in macrophages stimulated with lipopolysaccharide	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol	6. 最初と最後の頁 2129-2139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00210-021-02137-8. Epub 2021 Aug 17	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 -
1. 著者名 Tomita K, Saito Y, Suzuki T, Imbaby S, Hattori K, Matsuda N, Hattori Y	4. 巻 393
2. 論文標題 Vascular endothelial growth factor contributes to lung vascular hyperpermeability in sepsis-associated acute lung injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol	6. 最初と最後の頁 2365-2374
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00210-020-01947-6	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 -
1. 著者名 Imbaby S, Matsuda N, Tomita K, Hattori K, Palikhe S, Yokoo H, Hattori Y	4. 巻 10
2. 論文標題 Beneficial effect of STAT3 decoy oligodeoxynucleotide transfection on organ injury and mortality in mice with cecal ligation and puncture-induced sepsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 15316
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-72136-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松田直之
2. 発表標題 敗血症と線維化の病態生理学：リドカインストームとサイトカインストーム
3. 学会等名 第49回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松田直之
2. 発表標題 集中治療におけるサイトカインストームの病態生理
3. 学会等名 日本集中治療医学会第6回東海北陸支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naoyuki Matsuda
2. 発表標題 Transcriptional Regulation and the Management in Sepsis
3. 学会等名 the 12th Critical Care Conference, the Thai Society of Critical Care Medicine
4. 発表年 2022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	服部 裕一	北海道医療大学・その他・客員教授	
	(Hattori Yuichi)		
	(50156361)	(30110)	

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
---------	---------