

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18340

研究課題名（和文）敗血症病態におけるセルフリーDNAの制御とマイクロRNAを用いた遺伝子治療の応用

研究課題名（英文）Control of cell free DNA in sepsis and its application to gene therapy by microRNA

研究代表者

添田 岳宏（SOEDA, Takehiro）

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：30739892

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：LPS投与下に糖濃度の異なる培養液による共培養実験系において、ヒトマクロファージの細胞内小胞体ストレス、アポトーシス発現、及び上流の細胞内情報伝達系変化と、好中球やNETsを貪食する機能（Efferocytosis）の変化、及び培養液中のcfDNA量を解析する事。（マクロファージ系細胞を72時間培養下に、共培養下の好中球にPhorbol myristate acetateを負荷することでNETsを放出させ、マクロファージ系細胞のEfferocytosisを観察した。実験結果として、miR21の遺伝子導入または、炎症脂質レゾルビン投与により、ヒトマクロファージの貪食能亢進が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

健康人にも、血漿中に少量の cfDNA が存在し、その由来は主にアポトーシスした白血球や骨髄細胞の可能性が報告されているが、敗血症病態で、多数の白血球がアポトーシス、ネクローシスや NETosis 等の細胞死をきたすと、多量の DAMPs が血漿中に逸脱して、cfDNA上昇の原因になると考えられている。今まで、間接的にcfDNAの増加と患者予後の相関に関して報告した研究は多数存在するが、cfDNA産生を制御する事で、敗血症治療の可能性を探索する事は、革新的であると考えている。

研究成果の概要（英文）：Co-culture experiment with human macrophages and phorbol myristate acetate stimulated-neutrophils under different glucose concentration was conducted. Changes in ER stress, apoptosis, efferocytosis, their upper stream intracellular pathway of human macrophages, and cell free DNA concentration in culture medium were measured. By gene transfer of microRNA 21 or resolvin administration, efferocytosis was stimulated with decreased expression of PTEN and PDCD4.

研究分野：集中治療、麻酔

キーワード：敗血症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

敗血症患者の死亡率を規定する要因として、急性期の高サイトカイン血症が注目され、サイトカインを抑制する種々の治療の有効性を調べる臨床研究が施行されたが、その結果は否定的であった。近年、敗血症の死亡要因は免疫担当細胞の細胞死や機能低下に伴う免疫抑制による炎症の持続が大きな要因とされている(図1)(Vincent JL, et al. Sepsis definitions: time for change. Lancet. 2013;381:774-5)。一方で、敗血症患者において、生体内で単球、樹状細胞、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、B 細胞等の免疫細胞の細胞死による細胞数減少を認める報告(Skrupky LP, et al. Anesthesiology. 2011;115:1349-62)や、マクロファージの貪食機能低下の報告(Michlewska S, et al. FASEB J. 2009;23:844-54, Feng X, et al. Immunology. 2011;132:287-95.)等があるが、免疫抑制の機序はまだ不明な点が多い。

炎症病態と血中循環 DNA

健常状態での cfDNA の多くは、細胞のアポトーシスに由来する DNA といわれている。一方、病態生理学的には、悪性腫瘍、重症病態時の壊死細胞からの漏出や、好中球から能動的に放出された DNA が、cfDNA に関与していると推察される。特に好中球由来の Neutrophil extracellular traps (NETs) が、cfDNA の量を規定しているという有力な実験結果(Margarf S, et al. Shock. 2008;30:352-8)があるが、異論もある(Hamaguchi S, et al. Mediators Inflamm. 2015;614518)。また、cfDNA は DAMPs として炎症や、凝固を活性化することも広く知られている(Gould TJ, et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2014;34:1977-84.)。

近年、単一血液検体から Isolation Flow Cell 技術を用い、末梢循環細胞と cfDNA を高回収率かつ高精製率で得ることを可能とした新しい血球回収解析装置 Ion Torrent Lipid Biopsy が研究応用できるようになった。得られた末梢循環細胞 DNA と cfDNA を、次世代型シーケンサーで網羅的に解析し、遺伝子情報を相補的に組み合わせることで、細胞の Heterogeneity や希少変異などを含む網羅的な遺伝子情報が得られる研究手技は、腫瘍細胞では確立しているが(Clin Cancer Res. 2018;24:560-568)、今後は血液細胞を用いて様々な病態解明が期待されている。

2. 研究の目的

(In Vitro 系) 共培養細胞実験において、LPS 及び高血糖負荷により、マクロファージの貪食能(Efferocytosis)が低下する事で、培養液中の cfDNA、NETs が増加するが、miRNA21 遺伝子導入または、レゾルビン投与により、マクロファージによる改善効果を検証する事。

3. 研究の方法

(細胞培養実験)

LPS 投与、及び糖濃度の異なる培養液による共培養実験系において、分化単球系 THP-1 細胞、ヒト Macrophage の細胞内小胞体ストレス、アポトーシス発現、及びその上流の細胞内情報伝達系変化と、好中球や NETs を貪食する機能(Efferocytosis)の変化、及び培養液中の cfDNA 量を解析する事。(マクロファージ系細胞を 72 時間培養下に、共培養下の好中球に Phorbol myristate acetate(PMA)を負荷することで NETs を放出させ、マクロファージ系細胞の Efferocytosis を観察する。

また、申請者らの最近の研究で、貪食能亢進が認められた抗炎症脂質レゾルビン投与または、miRNA21 遺伝子導入マクロファージを用いて(図2)、以下の実験結果の改善効果も検討する。

- (1) **貪食能(Efferocytosis)** 蛍光 Cell Tracker で標識後、PMA 負荷した好中球及び NETs のマクロファージによる貪食能を見る。(FCM 法)
- (2) **培養液中の cfDNA 量測定**

cfDNA 濃縮用に設計され、血清や血漿などの生体サンプルに最適化されている MagMAX™ Cell-Free DNA Isolation Kit を用いて、リアルタイム PCR、次世代シーケンシングを含む広範な用途に適した高品質 DNA を高く回収し、DNA を定量する。

- (3) **mitochondrial DNA, nuclearDNA を定量** リアルタイム PCR 法
- (4) **NETs の半定量** ヒストン H1、好中球エラスターゼ、DAPI の3重染色
- (5) **細胞内小胞体ストレス変化** 細胞内 CHOP、BiP 発現変化 (Western Blotting 法、フローサイトメトリー (FCM) 法)
- (6) **細胞内 Akt, p38MAPK リン酸化/Total(比)変化の定量** (WesternBlot 法、FCM 法)。
- (7) **細胞内ミトコンドリア膜電位変化の定量** (JC-1、FCM 法)

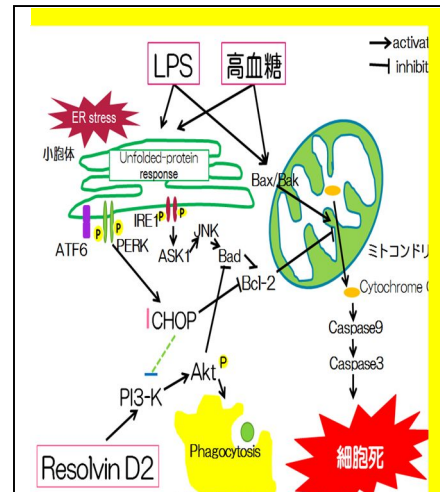
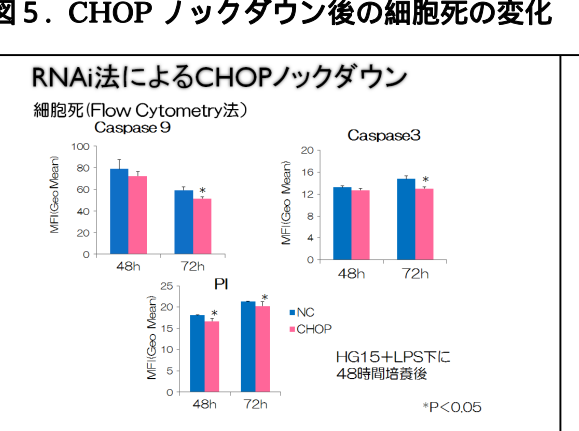
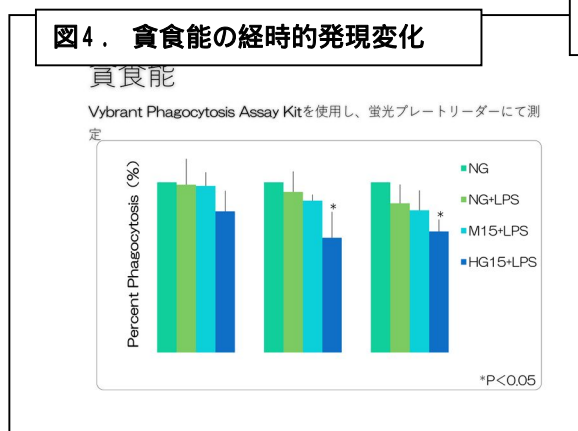
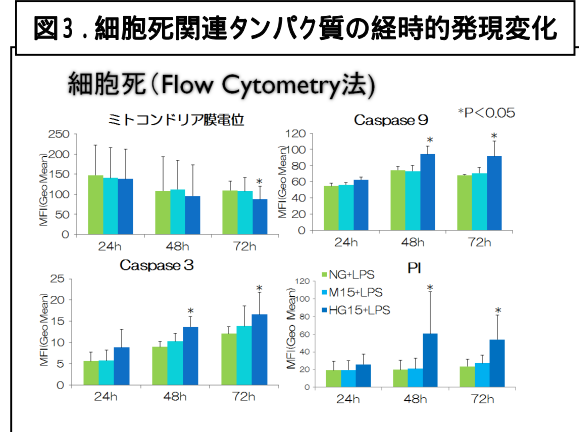
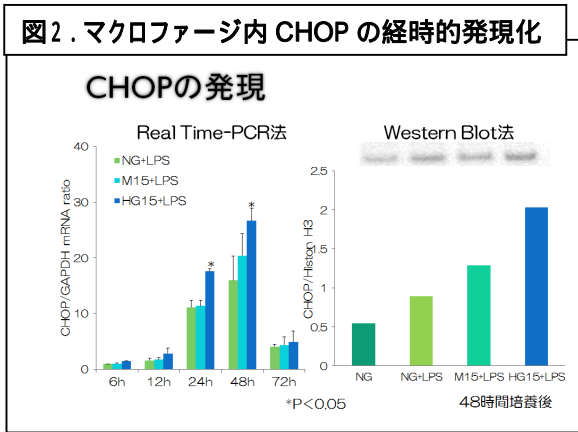


図1 マクロファージの細胞死と貪食能に関連する細胞内情報伝達系

- (8) **細胞内 Bcl-2 ファミリータンパク質発現の変化** Bcl-xl, Bcl-2/Bax, Bak 比の解析 (Western Blotting 法、FCM 法)
 - (9) **細胞内カスパーゼ発現の変化** Caspase 3, 9 (FCM, WesternBlot 法、免疫染色法)
 - (10) **細胞内 LC3-2/1 比、Beclin1 発現の変化** (Western Blotting 法、免疫染色法)
 - (11) **細胞内 PI3K, mTOR activity (ELISA 法)、mTOR のリン酸化/Total(比)変化定量** (Western Blotting 法)
 - (12) **細胞死の形態学的変化及び核染色** (ヘキスト 33342, PI) (光学顕微鏡、FCM 法)
4. 研究成果



ヒトマクロファージを用いた培養細胞培養実験系において、HG (High Glucose 15mM)群が、NG (Normal Glucose 5mM) 群、及び M (Mannitol 15mM, 浸透圧コントロール) 群に比べ、LPS 投与により 24 時間後から有意に小胞体ストレス情報伝達系 (CHOP) の RNA 発現が上昇し、48 時間後から蛋白発現では、貪食能、細胞内ミトコンドリア電位の低下、細胞死の増加をみた。

単球マクロファージの貪食能に変化を及ぼす可能性ある、microRNA21 mimic (Pre-miRTM miRNA Precursor Molecules, Ambion 社)の遺伝子導入、レゾルピン投与をヒトマクロファージに行うと、PTEN 及び PDCD4の発現の低下、及び貪食能の上昇が見られた。

図 6. miR21 導入後の細胞内情報伝達変化

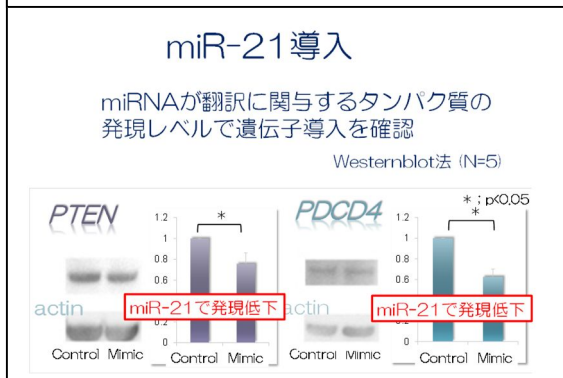


図 7. miR21 導入後の貪食能変化

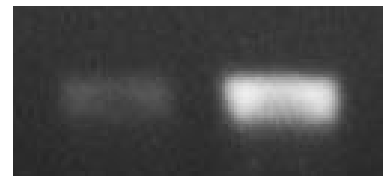
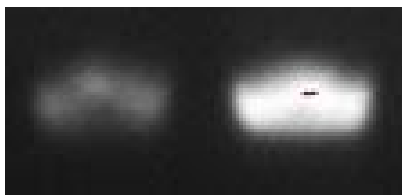
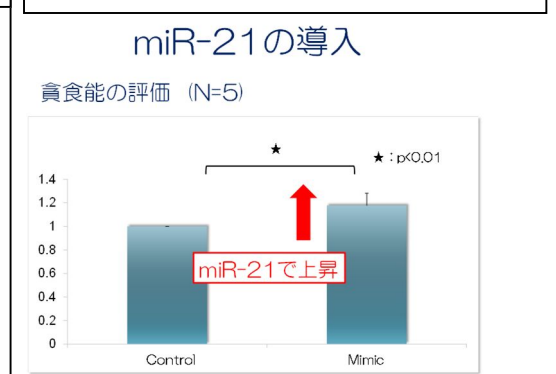


図 8. レゾルピン投与後の細胞内情報伝達変化-1

Semi-quantitative PCR 画像

PTEN, PDCD4 mRNA の発現が、レゾルピンを投与することで、抑制されている。



PTEN



PDCD4



GAPDH

図 9. レゾルピン投与後の細胞内情報伝達変化-2

ウエスタンプロット画像

PTEN, PDCD4 のタンパク質の発現がレゾルピンを投与することで抑制されている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishimoto K, Umegaki T, Ohira S, Soeda T, Anada N, Uba T, Shoji T, Kusunoki M, Nakajima Y, Kamibayashi T.	4. 巻 70
2. 論文標題 Impact of Permissive Hypoxia and Hyperoxia Avoidance on Clinical Outcomes in Septic Patients Receiving Mechanical Ventilation: A Retrospective Single-Center Study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomed Res Int.	6. 最初と最後の頁 7332027
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2021/7332027.	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 Nishimoto K, Umegaki T, Ohira S, Nakajima Y, Soeda T, Kamibayashi T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Relief of cardiac tamponade by a congenital partial left-sided pericardial defect in a patient with ruptured acute type A aortic dissection: a case report	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JA Clin Rep .	6. 最初と最後の頁 4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40981-019-0223-4.	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 Hakata S, Umegaki T, Soeda T, Nishimoto K, Ando A, Anada N, Uba T, Sumi C, Kamibayashi T.	4. 巻 7
2. 論文標題 Bromocriptine use for sudden peripartum cardiomyopathy in a patient with preeclampsia: a case report.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JA Clin Rep	6. 最初と最後の頁 5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40981-019-0256-8.	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 -

〔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 角 千里, 梅垣 岳志, 中島 友理奈, 添田 岳宏, 西本 浩太, 博多 紗綾, 右馬 猛生, 中嶋 康文, 萩平 哲, 上林 卓彦
2. 発表標題 敗血症症例の初期IgG値と退院時転帰の関連についての検討
3. 学会等名 第46回日本集中治療医学会学術集会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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