

機関番号：13201

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590250

研究課題名 (和文) 転写因子 AP-1 を分子標的とした敗血症治療とその作用機序の解明

研究課題名 (英文) The transcription factor AP-1 as a molecular target in sepsis therapy

研究代表者

服部 裕一 (HATTORI YUICHI)

富山大学医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：50156361

研究成果の概要 (和文)：

8-12 週齢の雄性 BALB-C マウスに盲腸結紮穿孔 (cecum ligation and puncture: CLP) を行い、敗血症を生じさせた。EMSA ゲルシフトアッセイにより、AP-1 活性は CLP 後時間とともに肺組織において顕著に上昇することが認められ、AP-1 デコイ核酸を CLP マウスに投与しておく、敗血症誘発性の肺 AP-1 活性刺激は大きく低下した。CLP 後 24 時間の肺組織および大動脈において、デス受容体である TNF-R1, Fas, DR4, DR5 の膜表面への発現は増加し、デス受容体経路のアダプター蛋白である FADD の発現も増加した。肺組織におけるこれらの変化は、AP-1 デコイ核酸導入により著明に抑制された。TUNEL および DNA ladder アッセイにより、CLP 誘発性敗血症により肺組織のみならず大動脈、脾臓においてアポトーシスが有意に増加しており、肺でのアポトーシス増加は AP-1 デコイ核酸投与により阻止された。アポトーシスのみならず、炎症反応も AP-1 デコイ核酸導入により抑えられた。すなわち、炎症性受容体や炎症物質である IL-1R, IL-6R, HMGB-1, gp130 の発現は、LPS 刺激をしたマウスの肺組織において著明に増加したが、AP-1 デコイにより減弱した。LPS 10 mg/kg を投与したマウスの生存率は、無処置だと 48 時間以内にすべて死亡したが、AP-1 デコイ核酸により著明に改善した。以上の結果から、AP-1 活性をブロックしてデス受容体ならびにアポトーシス関連蛋白ならびに炎症性関連物質の発現を抑える転写因子デコイを用いた戦略は敗血症にとって新しい治療方法であることが示唆される。さらに、AP-1 により転写されることが見出されたデスシグナルで重要な役割を担っている FADD 遺伝子をノックダウンしたところ、CLP マウスにみられる急性肺傷害や血管内皮障害所見は有意に治療効果が認められ、結果的に生存率も著明に改善した。このことは、FADD siRNA は敗血症治療の効果的な治療戦略として有用であるかもしれない。

研究成果の概要 (英文)：

Polymicrobial sepsis was induced by cecal ligation and puncture (CLP) in BALB/c mice (8-12 wk of age). The DNA binding activity of AP-1, as assessed by electrophoretic mobility shift assay, was time-dependently increased in lung tissues from mice after the onset of CLP-induced sepsis. This increase was effectively eliminated by *in vivo* transfection of AP-1 decoy oligonucleotides (ODNs). Sepsis induction significantly increased surface expression of death receptors, such as TNF-R1, Fas, DR4, and DR5, in lung and aortic tissues after sepsis. Furthermore, the gene and protein levels of FADD, which recruits procaspase-8 into the death-inducing signaling complex, were increased after sepsis induction. These sepsis-induced changes were eliminated by systemic application of AP-1 decoy ODNs. TUNEL assays revealed that the significant appearance of cell apoptosis in lung and aortic tissue sections from septic mice was prevented by systemic treatment with AP-1 decoy ODNs. When endotoxic shock was induced by an intravenous injection of 10 mg/kg lipopolysaccharide (LPS) in mice, expression levels of inflammatory molecules, including IL-1R, IL-6R, HMGB-1, and gp130, were highly increased, which was significantly inhibited by AP-1 decoy ODN treatment. All animals which received LPS died within 48 h, and the animals that were treated with AP-1 decoy ODNs after LPS exhibited a striking improvement of survival. Our results suggest that AP-1 decoy ODN therapy represent an

effective strategy in the treatment of sepsis. In addition, systemic administration of siRNA targeting FADD, which was found to be transactivated by AP-1, prevented the development of acute lung injury in CLP mice, and improved their survival. These findings indicate the potential usefulness of FADD siRNA for gene therapy of the septic syndrome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：炎症・免疫，敗血症，転写因子，アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

感染を基盤とした全身性炎症反応症候群(SIRS)である敗血症は、主要臓器の障害を起し極めて致死性の高い疾患であるが、炎症反応を抑えることを目的とした治療法の臨床的有用性には限界のあることがプロスペクティブに証明され、敗血症性ショックおよび多臓器不全に対する堅固な治療法は未だに確立されていない。

敗血症病態ではエンドトキシンによりToll-like受容体が刺激され、NF-κBの核内移行が誘導されて、多くの炎症性分子の産生が転写段階で亢進される。その結果顕著な血圧低下、血管透過性亢進、心機能低下が起こり、多臓器不全に陥って致命的な状態をもたらす。われわれは治療法の限られている敗血症性ショックに対してNF-κBを標的とした遺伝子治療の開発を目指した。マウスで敗血症作成後、肺組織などで多くの炎症性分子の遺伝子及びタンパクの発現は劇的な増加を示したが、これらはNF-κBデコイ核酸による遺伝子治療により強く抑えられ、肺胞洗浄液中の好中球の増加や肺の組織学的炎症所見も有意に改善した(*Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004, *Mol Pharmacol* 2005)。しかしながら、本研究でのNF-κBデコイ核酸による遺伝子治療は、必ずしも敗血症による致死率を有意に改善させるには至らなかった(*Crit Care Med* 2009)。これは敗血症が抗炎症のみを目的とした治療では優れた効果が期待できないことと一致する。

今世紀になって、アポトーシスによる細胞死が敗血症の病態生理に重要な役割を果たしていることが提唱されるようになった。しかし

ながら、アポトーシス誘導を抑制することを敗血症の治療目的とした試みはこれまで報告されたことはなかった。そこで、われわれは、RNA干渉という遺伝子発現抑制機構を応用し短鎖干渉RNA (siRNA)を導入して標的遺伝子を封じ込めるという方法を用い、アポトーシスに中心的な役割を果たしているcaspase-8/caspase-3のsiRNAsを敗血症マウスに経静脈的に全身投与したところ、100%の生存率が得られ、電顕的に血管内皮細胞の膨隆と基底膜から部分的剥離が劇的に抑制されたことから、遺伝子レベルでのアポトーシスによる細胞死を防止していく治療法を確立していくことが敗血症性ショック時の致死性を改善する上でより有効であるという仮説に至った(*Cardiovasc Res* 2007, *J Smooth Muscle Res* 2007)。

AP-1は、NF-κB同様、エンドトキシンによって劇的に活性化される誘発性転写因子で、免疫および炎症反応に関与する多くの誘発性遺伝子の発現を調節している。AP-1はその役割として、炎症のみならず、Fasのようなデスレセプターを細胞膜表面に移行させて、pro-apoptotic factorsであるcaspasesを動かし、細胞死を促進させることから、AP-1を分子標的とした敗血症性ショックならびに多臓器不全に対する治療の有用性は高く期待でき、本症の治療薬開発に与えるインパクトは大きいものと想定される。

## 2. 研究の目的

敗血症性ショックおよび多臓器不全に対する堅固な治療法の突破口を見出すことが、現在救命救急領域で求められているニーズで

ある。そこで、これまでの炎症反応を抑えることを目的とした限界ある治療法を見直し、本研究では敗血症の病態生理の形成にアポトーシスによる細胞死が重要な役割を果たしていると想定し、アポトーシス促進に寄与すると想定されている誘発性転写因子 AP-1 のおとりデコイ核酸を用いた遺伝子治療の敗血症性ショックならびに多臓器不全に対する有用性を評価し、その作用機構を明らかにすることで、将来臨床応用していくための実用化に向けた基盤作りをすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

多菌性敗血症動物モデルとして、盲腸結紮・穿孔(CLP)により腹膜炎を起こさせたマウスを作成した。雄性8~12週齢のBALB/cマウスに、麻酔下で左臍下に約5 mmの切開を入れ、盲腸を膨出した。盲腸の先端に糞便を充満させた後、先端約2 mmを結紮し、21G針で2箇所を穿孔を加えた。対照群としてCLPのみを行わない、すなわち腹膜切開と盲腸先端膨出に留めたものを設けた。その後、盲腸を腹部にもどし、4.0ナイロン糸で1針の縫合を行った。また敗血症動物モデルとして、大腸菌 lipopolysaccharide (LPS)を10 mg/kg、尾静脈より静注したものも用いた。これらのモデルでは全て48時間以内に死亡することから、24時間後に、過量のペントバルビタールを投与した後、肺や大動脈等の組織を摘出した。

5'-GGA TCC ATG ACT CAG AAG ACG ACA CAC GTC TTC TGA GTC AT-3'の AP-1 デコイ核酸と、その scramble 型 (5'-GGA TCC ATC GAG AAG ACG ACA CAC GTC TTC TGA GTC AT-3')を作成し、滅菌した RNase free の生食に溶解し、HVJ エンベロープベクター法を用いて経静脈的に導入した。導入時間は、予備実験の結果から、敗血症誘発後 10 時間とした。

FADD のために使われた標的シーケンスは、5'-GCA GUC CUC UUA UUC CUA Att-3' (sense)と 5'-UUA GGA AUA AGA GGA CUG Ctt-3' (antisense)であった。Silencer Negative Control #1 siRNA が negative control として使われた。尾静脈より投与するときに、Lipofectamine RNAiMAX が用いられた。CLP 作成後 10 時間でマウスに FADD siRNA あるいは scrambled siRNA が与えられた。

### 4. 研究成果

#### (1) AP-1 デコイ核酸の効果

EMSA ゲルシフトアッセイにより、肺組織における DNA 結合能からみた AP-1 活性は CLP 後時間とともに増加し、10 時間で最大となった(図 1)。AP-1 デコイ核酸を CLP マウスに投

与しておく、敗血症誘発性の肺 AP-1 活性刺激は大きく低下した。

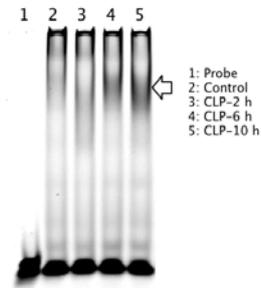


図1 敗血症マウス肺におけるAP-1活性

CLP 後 24 時間の肺組織および大動脈において、デス受容体である TNF-R1, Fas, DR4, DR5 の膜表面への発現は増加し、デス受容体経路のアダプター蛋白である FADD の発現も増加した。肺組織におけるこれらの変化は、AP-1 デコイ核酸導入により著名に抑制された(図 2)。

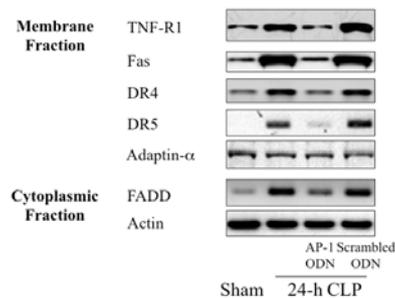


図2 敗血症マウス肺におけるAP-1デコイのデス受容体とFADD発現に対する効果

TUNEL および DNA ladder アッセイにより、CLP 誘発性敗血症により肺組織のみならず大動脈、脾臓においてアポトーシスが有意に増加しており、肺でのアポトーシス増加は AP-1 デコイ核酸投与により阻止された。アポトーシスのみならず、炎症反応も AP-1 デコイ核酸導入により抑えられた。すなわち、炎症性受容体や炎症物質である IL-1R, IL-6R, HMGB-1, gp130 の発現は、LPS 刺激をしたマウスの肺組織において著名に増加したが、AP-1 デコイにより減弱した(図 3)。

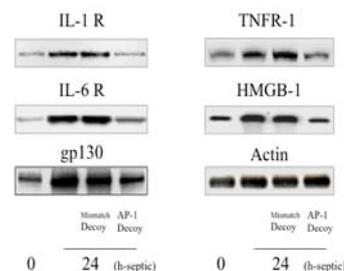


図3 敗血症マウス肺におけるAP-1デコイの炎症性分子発現に対する効果

LPS 10 mg/kg を投与したマウスの生存率は、無処置だと 48 時間以内にすべて死亡したが、AP-1 デコイ核酸により著明に改善した(図 4)。(2) FADD siRNA の効果

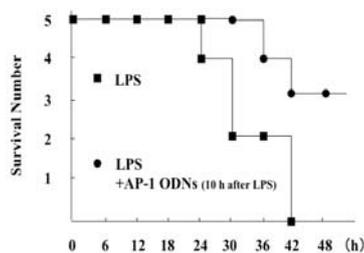


図4 敗血症マウスの生存曲線に対する AP-1 デコイ治療効果

さらに、AP-1 により転写されることが見出されたデスシグナルで重要な役割を担っている FADD 遺伝子を siRNA でノックダウンしたところ、CLP マウスにおける血液ガス分析における低酸素血症、組織学的な肺の炎症所見など急性肺傷害は有意に認められなくなった。また大動脈における血管内皮細胞障害も消失した。結果的に生存率も著明に改善した(図 5)。

## 5. 主な発表論文等

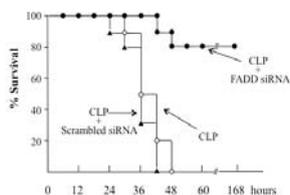


図5 敗血症マウスの生存曲線に対する FADD siRNA の治療効果

(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) Matsuda N, Teramae H, Yamamoto S, Takano K, Takano Y, Hattori Y: Increased death receptor pathway of apoptotic signaling in septic mouse aorta: effect of systemic delivery of FADD siRNA. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H92-H101, 2010. (査読有)

(2) Hattori Y, Takano K, Teramae H, Yamamoto S, Yokoo H, Matsuda N: Insights into sepsis therapeutic design based on the apoptotic death pathway. *J Pharmacol Sci* 114: 354-365, 2010. (査読有)

(3) Matsuda N, Yamamoto S, Takano K, Kageyama S, Kurobe Y, Yoshihara Y, Takano Y, Hattori Y: Silencing of Fas-associated death domain protects mice from septic lung inflammation and apoptosis. *Am J Crit Care Med* 179: 806-815, 2009. (査読有)

(4) 松田直之, 山本誠士, 寺前洋生, 高野健一, 別府賢, 山崎弘美, 横尾宏毅, 畠山登, 小池薫, 服部裕一: 敗血症性ショックにおけるアポトーシスの治療. *日本薬理学雑誌* 134: 198-201, 2009. (査読なし)

[学会発表] (計 3 件)

(1) 高野健一, 大石博史, 服部裕一: アポトーシスからの保護と関連した敗血症性急性肺傷害の治療. 第 84 回日本薬理学会年会. シンポジウム S1C13: 急性肺傷害におけるトランスレーショナルリサーチの現状と展望 (オーガナイザー: 服部裕一, 松田直之). 横浜(震災のため誌上発表). 2011 年 3 月.

(2) 服部裕一, 松田直之: 敗血症性ショックと内皮由来および誘発性 NO 合成酵素: スタチンによる治療効果. 日本薬学会第 129 年会. シンポジウム S28: 血管弛緩機構の異常に基づく疾患と薬物作用 (オーガナイザー: 岡本博, 鎌田勝雄). 京都. 2009 年 3 月 27 日.

(3) 松田直之, 服部裕一: 敗血症病態におけるアポトーシスの治療. 第 82 回日本薬理学会年会. シンポジウム S1C-8: アポトーシス関連分子を標的とした疾病治療に向けて (オーガナイザー: 服部裕一, 田熊一徹). 横浜. 2009 年 3 月 16 日.

[図書] (計 1 件)

Hattori Y, Matsuda N: Protection from lethal cell death in cecal ligation and puncture-induced sepsis mouse model by *in vivo* delivery of FADD siRNA. *In: Targets in Gene Therapy*. ed. by Yongping You. (in press) InTec Open Access Publisher, Austria, 2011.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/pharma/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部 裕一 (HATTORI YUICHI)

富山大学医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：50156361

(2)研究分担者

横尾 宏毅 (YOKOO HIROKI)  
富山大学医学薬学研究部(医学)・准教授  
研究者番号：30332894

(3)連携研究者

高野 康雄 (TAKANO YASUO)  
神奈川県立がんセンター臨床研究所・  
所長  
研究者番号：60142022  
松田 直之 (MATSUDA NAOYUKI)  
名古屋大学医学研究科・教授  
研究者番号：50332466