様　式　C－19、F－19－1、Z－19　(共通)

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 29 年　 5 月 30 日現在

機関番号：13901
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2013～2016
課題番号：25293365

研究課題名（和文）敗血症性多臓器不全における主要臓器再生への遺伝子治療とiPS細胞の応用

研究課題名（英文）Gene therapy and application of iPS cells to major organ regeneration in septic multiple organ failure

研究代表者
松田　直之（Matsuda, Naoyuki）

名古屋大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：50332466

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　14,200,000円

研究成果の概要（和文）：敗血症病態は，感染症による炎症の後に，さまざまな臓器に線維芽細胞増殖を生じる。この病態と治療を考案するために，マウス敗血症モデルとヒト線維芽細胞培養で線維芽細胞に対する研究を施行した。敗血症モデル動物には8~12週齢の雄性BALB-Cマウスを用い，盲腸結紮穿孔による敗血症に類似する病態を評価した。S100 calcium-binding proteinなどを用いた繊維芽細胞の分布の解析では時系列で肺や心房筋膜境界面への線維芽細胞の増加を認めた。また，ヒト線維芽細胞の培養検討では，カテコラミンのβ受容体作用および炎症に関与するトロンビン活性が，線維芽細胞増殖に強く関与することが評価できた。

研究成果の概要（英文）：Sepsis causes fibroblast proliferation in various organs following systemic inflammation due to infection. For this process, we studied growth control of fibroblasts in mouse sepsis model and human fibroblast cell culture system. Male BALB-C mice of 8 to 12 weeks as a sepsis animal model were used to evaluate pathology by cecal ligation and puncture (CLP). Analysis of the distribution of fibroblasts using S100 calcium-binding protein, etc. showed an increase in fibroblasts in the lungs and the atrial fascia interface in the time course after CLP. In the study of cell culture of human fibroblast IMR-90, it was possible to evaluate that the β receptor activation by catecholamine and thrombin activity in systemic inflammation are strongly involved in fibroblast proliferation. It was revealed that fibroblast proliferation and organization was observed in association with inflammation of sepsis in the lung and heart.

研究分野：救急医学

キーワード：敗血症　多臓器不全　線維芽細胞　転写因子

１．研究開始当初の背景

敗血症（sepsis）は，感染症による全身性炎症による多臓器不全である。敗血症では，Toll-like受容体やtumor necrosis factor受容体などの炎症を惹起する受容体を介して，炎症性サイトカインや炎症性分子が新たに産生される(Matsuda N and Hattori Y. J Pharmacol Sci 2006:101: 189-198)。敗血症は，国内外で罹患率と死亡率が高い病態として知られている。

このような敗血症は,炎症改善期に tumor growth factor β などの増殖性サイトカインとその細胞内情報伝達シグナルの増強により，線維芽細胞増殖が生じる。敗血症病態における線維芽細胞増殖の機序を解明し,敗血症病態における多臓器不全の不可逆化と器質化を抑制する必要がある。

２．研究の目的

敗血症病態において，線維芽細胞が増殖する機序を評価し,転写因子制御および iPS 細胞を含めた治療策を検討し，敗血症病態のより一層の病態解明と新規治療の提案を行うことを研究の目的とした。

３．研究の方法

研究は，名古屋大学の動物研究施設の承認および倫理指針に準じて施行された。

（１）敗血症モデル動物の作成

研究動物には，雄性 BALB-C マウス（8-10 週，体重 25-35 g）を用いた。敗血症病態の誘導には，盲腸結紮・穿孔（cecum ligation and puncture : CLP）法を用いた。CLP は，イソフルラン麻酔下で左臍下に約 5 mm の切開を行い，虫垂の先端を剖出し，虫垂先端に糞便を充満させ，先端を結紮し，21G 針で穿孔を加える方法とした。対照群(Sham 群)は，腹部切開と虫垂先端の膨出のみを行ったものとし，虫垂を腹腔内に戻した後，皮膚切開部を縫合する方法とした。

（２）ヒト繊維芽細胞の培養細胞研究

ヒト胎児肺由来線維芽細胞株 IMR-90 を，10％ウシ胎児血清含有 E-MEM 培地（2 mM Glutamine, 1％Penicillin / Streptomycin)（TAKRA 株）を使用して 37℃，5%CO_2の条件で細胞培養し，その増殖に与える影響として，敗血症病態で高まるアドレナリンβ受容体刺激薬としてドブタミン，さらに炎症と凝固の模倣としてトロンビンの作用を検討した。ドブタミンとトロンビンにより発現する炎症性分子を RT-PCR 法と免疫組織染色で評価した。

（３）繊維芽細胞増殖と転写因子の解析

繊維芽細胞の増殖に関与する転写因子について，細胞培養系にデコイ核酸を導入し，増殖に関与する転写因子を評価した。用いたデコイ核酸は以下の配列である。

AP-1 デコイ核酸：5’-GGA TCC ATG ACT CAG AAG ACG ACA CAC GTC TTC TGA GTC AT-3’

AP-1 スクランブル核酸：5’-GGA TCC ATC GAG AAG AAG ACG ACA CAC GTC TTC TGA GTC AT-3’

NF-κB デコイ核酸：5’-CCT TGA AGG GAT TTC CCT CC-3’

NF-κB スクランブル核酸：5’-TTG CCG TAC CTG ACT TAG CC-3’

CRE デコイ核酸：5’-TGA CGT CAT GAC GTC ATG ACG TCA-3’

CRE スクランブル核酸：5’-TGT GGT CAT GTG GTC ATG TGG TCA-3’

また，転写活性は抽出した核蛋白のゲルシフト法で，以下のプローブを用いて評価した。

AP-1 ゲルシフトアッセイ用プローブ：5’-TGAGTCA-3’

NF-κB ゲルシフトアッセイ用プローブ：5’- GGGACTTTCC-3’

CRE ゲルシフトアッセイ用プローブ：5'-TGACGTCA-3'

４．研究成果

（１）敗血症病態における繊維芽細胞増殖

CLP 後のマウス肺において線維芽細胞は LYVE-1/S1004A 陽性細胞として CLP24 時間後（図 1A）から 48 時間後（図 1B）において正常状態と比較して肺胞周囲に増加する傾向を認めた。CLP の時系列で肺を摘出し，イムノブロット解析をした結果，LYVE-1 および S1004A は，正常状態と比較して CLP48 時間後で増加し，α-smooth muscle actin（αSMA）の増加を約 3.8 倍として認めた（図 1C）。

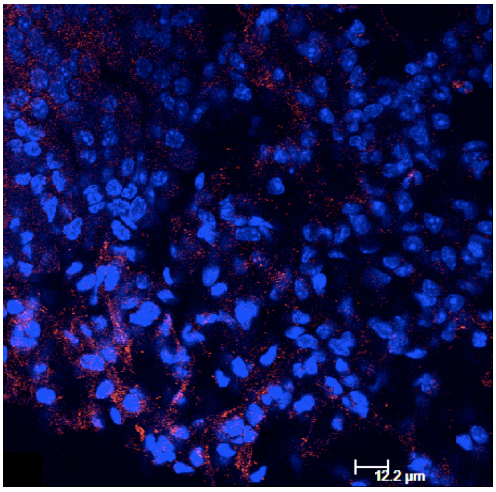

図 1A. CLP マウス 24 時間の肺の LYVE-1 陽性細胞

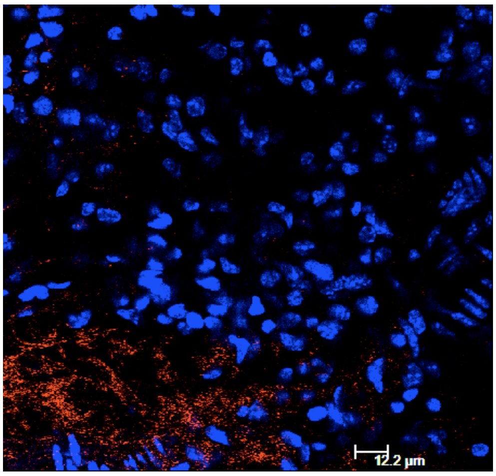

図 1B. CLP マウス 48 時間の肺の LYVE-1 陽性細胞（赤）

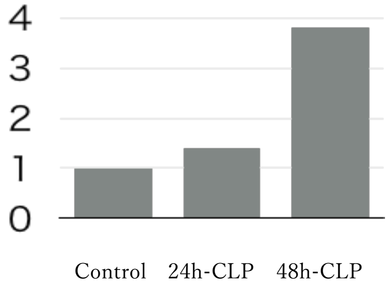

図 1C. Relative level of αSMA/GAPDH

CLP マウスでは，時系列で肺におけるαSMA の増加が認められた。

（２）ヒト繊維芽細胞の培養細胞研究

ヒト肺繊維芽細胞株 IMR-90 には，トロンビン受容体１（protease activated receptor-1：PAR1）および PAR2，さらにアドレナリン作動性β受容体が発現していた。

トロンビンは 10μg/mL までの濃度において，暴露後 3 時間をピークとして濃度依存的に PAR1 の発現を高めた。また，トロンビンによる刺激により IMR-90 は，刺激 3 時間の段階で iNOS，IL-8，組織因子，vWF の蛋白発現を高めた。さらに，トロンビン 10μg/mL は，刺激の 48 時間後にαSMA を優位に発現させ，IMR-90 を myofibroblast として増殖させることが，免疫組織染色法で確認できた。

トロンビン刺激後の IMR-90 におけるゲルシフト法による転写因子解析では，特に NF-κB と AP-1 に活性化が認められた。トロンビン刺激後の IMR-90 において，AP-1 デコイ核酸で AP-1 活性を抑制すると，myofibroblast への増殖を抑制できた。AP-1 活性を担う cJun の免疫組織染色においても，トロンビン 10μg/mL の暴露 3 時間で，cJun の増加と強い核内への集積が観察された（図 3A および図 3B）。一方，DOB による IMR-90 の増殖作用は，CRE デコイ核酸で抑制できた。

一方，DOB は 10^{-7}M の濃度において，暴露 24〜48 時間で濃度依存的に IMR-90 の増殖を加速し，暴露 48 時間で約 5.8 倍に増殖させ，さらに myofibroblast として α SMA を発現させた。この DOB10^{-7}M による 48 時間後の IMR-90 の α SMA の発現作用は，選択的 β 1 受容体作動薬 CGP201712A およびランジオロールの IC_{90} レベルの濃度で約 40%に抑制された（図 3C）。

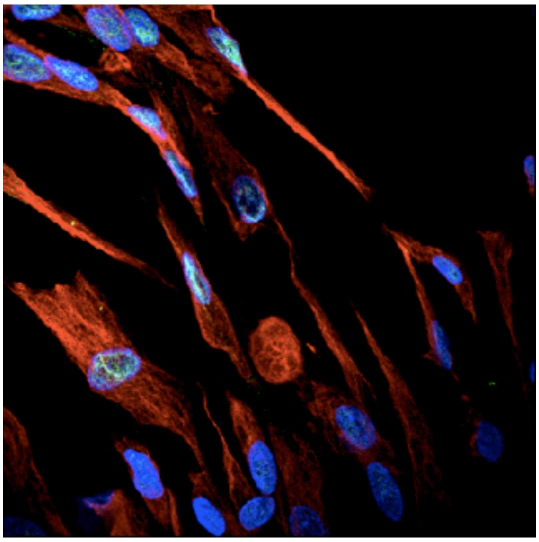

図 3A. IMR-90 における正常時の cJUN の免疫組織染色（赤：Vimentin，青：核のヘキスト染色，緑：cJUN）

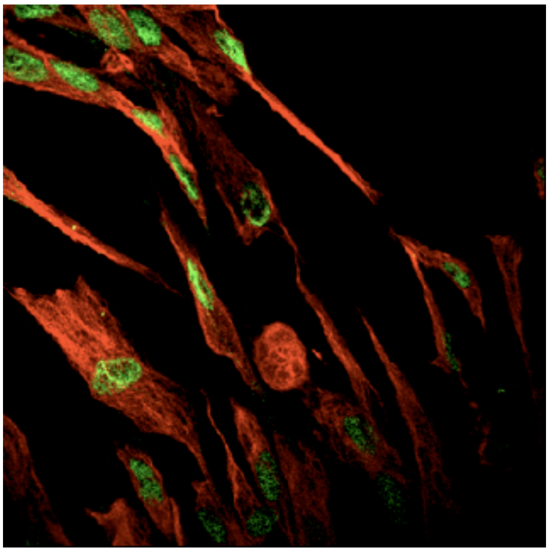

図 3A. IMR-90 におけるトロンビン 10 μg/mL 暴露後 3 時間における cJUN の免疫組織染色（赤：Vimentin，青：核のヘキスト染色，緑：cJUN）

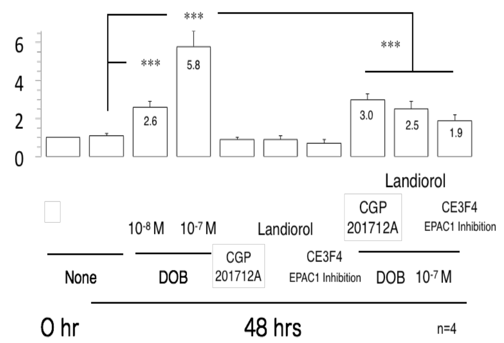

図 3A. IMR-90 におけるドブタミン刺激 48 時間後の α SMA/GAPDH の発現比率および拮抗薬の効果。***p<0.001

（4）まとめ

敗血症病態では，肺において線維芽細胞が増加することをマウス敗血症 CLP モデルを用いて確認した。ヒト肺繊維芽細胞株 IMR-90 には，PAR およびアドレナリン作動性 β 受容体が発現しており，特に PAR はトロンビンを作動分子として，iNOS，IL-8 などの炎症性分子の産生を高めた。IMR-90 は，PAR および β 受容体を介して，増殖傾向を高め，さらに α SMA を発現させ，myofibroblast に変容する傾向がある。このような敗血症病態では，炎症と交感神経緊張を制御することで，組織における線維芽細胞増殖と筋芽細胞としての組織器質化を抑制できる可能性がある。また，増殖する線維芽細胞を iPS 細胞としてリセットし，組織再生に役立てることができる可能性を確認した。

5．主な発表論文等
（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 7 件）

① Hattori Y, Hattori K, Suzuki T, Matsuda N. Recent advances in the pathophysiology and molecular basis of sepsis-associated organ dysfunction: Novel therapeutic implications and challenges. Pharmacol Ther. 査読有，2017 Feb 21. pii: S0163-7258(17)30064-5. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.040.

PMID:28232275

② Sakai M, Suzuki T, Tomita K, Yamashita S, Palikhe S, Hattori K, Yoshimura N, Matsuda N, Hattori Y. Diminished Responsiveness to Dobutamine as an Inotrope in Mice with Cecal Ligation and Puncture-Induced Sepsis: Attribution to Phosphodiesterase 4 Upregulation. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 査読有, 2017 Apr 28:ajpheart.00828.2016. doi: 10.1152/ajpheart.00828.2016. PMID: 28455289

③ Hattori Y, Hattori K, Matsuda N. Regulation of the Cardiovascular System by Histamine. Handb Exp Pharmacol. 査読有, 2016 Nov 13. [Epub ahead of print] PMID: 27838850

④ Hattori M, Yamazaki M, Ohashi W, Tanaka S, Hattori K, Todoroki K, Fujimori T, Ohtsu H, Matsuda N, Hattori Y. Critical role of endogenous histamine in promoting end-organ tissue injury in sepsis. Intensive Care Med Exp. 査読有, 2016 Dec;4(1):36. Epub 2016 Nov 8. PMID: 27822777

⑤ Matsuda N. Alert cell strategy in SIRS-induced vasculitis: sepsis and endothelial cells. J Intensive Care. 査読有, 2016 Mar 23;4:21. doi: 10.1186/s40560-016-0147-2. eCollection 2016. PMID: 27011790

⑥ Wang Q, Yokoo H, Takashina M, Sakata K, Ohashi W, Abedelzaher LA, Imaizumi T, Sakamoto T, Hattori K, Matsuda N, Hattori Y. Anti-Inflammatory Profile of Levosimendan in Cecal Ligation-Induced Septic Mice and in Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophages. Crit Care Med. 査読有, 2015 Nov;43(11):e508-20. doi: 10.1097/CCM.0000000000001269. PMID: 26468714

⑦ Yamamoto S, Niida S, Azuma E, Yanagibashi T, Muramatsu M, Huang TT, Sagara H, Higaki S, Ikutani M, Nagai Y, Takatsu K, Miyazaki K, Hamashima T, Mori H, Matsuda N, Ishii Y, Sasahara M. Inflammation-induced endothelial cell-derived extracellular vesicles modulate the cellular status of pericytes. Sci Rep. 査読有, 2015 Feb 17;5:8505. doi: 10.1038/srep08505. PMID:25687367

〔学会発表〕（計３件）

① 松田直之、吉田拓也、高谷悠大、稲葉正人、東　倫子、山本尚範、沼口　敦. 線維芽細胞におけるアドレナリン作動性β受容体作用の解析. 第 44 回日本救急医学会総会・学術集会 2016 年 11 月 18 日，グランドプリンスホテル新高輪（東京都品川区）.

② 山本尚範，松田直之，久保寺 敏，吉田拓也，東 倫子，江嶋正志，沼口 敦. 線維芽細胞に対するトロンビンと AP-1 の作用. 第 42 回日本救急医学会総会・学術集会 2014 年 10 月 28 日，福岡国際会議場（福岡県・博多市）.

③ 山本尚範，松田直之，吉田拓也，東 倫子，江嶋正志，沼口 敦.線維芽細胞に対するドブタミンの増殖性作用の解析. 第 42 回日本救急医学会総会・学術集会 2014 年 10 月 28 日，福岡国際会議場（福岡県・博多市）.

６．研究組織

(1) 研究代表者

松田　直之（MATSUDA Naoyuki）

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50332466

(2)研究分担者

　なし