

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462757

研究課題名(和文) AutophagyによるARDS制御機構解明とmicroRNAによる治療法開発

研究課題名(英文) Analysis of ARDS regulation by autophagy and development of its treatment by microRNA.

研究代表者

田代 貴大 (Tashiro, Takahiro)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：00613340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：侵襲下での細胞内の小器官の分解等によるAutophagyにより、ホメオスタシスが維持されている。ARDSの過剰な炎症による肺胞細胞と浸潤白血球のAutophagyによる防御機構の解明ため、肺胞由来細胞株(A549)、単球由来細胞株(THP-1)を用いた。TNFalpha, IL-1beta, LPSにて刺激を行い、Autophagy誘導活性化の蛋白LC3-IIの発現を確認できた。この反応はAutophagy阻害剤により抑制された。また、ARDSの患者血清を用いて、microRNAのプロファイリングを行い、ARDSおよびAutophagyに起因するmicroRNAの同定を行った。

研究成果の概要(英文)：Homeostasis is maintained by autophagy due to decomposition of cellular organelles under biological stress. Alveolar-derived cell line (A549) and monocyte-derived cell line (THP-1) were used to elucidate the defense mechanism by alveolar cells and infiltrating leukocytes autophagy due to excessive inflammation of ARDS. Cells were stimulated with TNFalpha, IL-1 beta, LPS and the expression of protein LC3-II in autophagy induction was confirmed. This reaction was suppressed by the autophagy inhibitor. MicroRNAs were also profiled using serum from ARDS patients and microRNAs attributed to ARDS and Autophagy were identified.

研究分野：Critical Care Medicine

キーワード：ARDS Autophagy microRNA Exosome Inflammation

1. 研究開始当初の背景

敗血症などによりSIRS が遷延すると、多臓器不全が成立し救命することが困難になることを救急・集中治療の現場でよく遭遇する。その中でもARDS は治療に最も難渋する臓器障害といえる。ARDS Network が推奨するLow Tidal Volume Ventilation(NEJM,2000)、prone position (NEJM2013)が予後を改善させた。一方で、他に明らかに有効な治療法はなく、全身管理を主体とした集中治療が行われている現状である。薬物治療に関してはステロイドが一部で有効性を示す(controversial)以外、ほとんど有効性はない。ARDS を救命するためには早期診断・治療を行うことが重要であり、新たな診断・治療法の開発が必要である。ARDS 発症にはalveolar microenvironment における活性化好中球浸潤による急性炎症が主体となっている。好中球やマクロファージからのcytokines やmediators の産生により肺胞上皮や血管内皮細胞などの周囲組織が傷害を受け、alveolar-capillary barrier の破綻から血管透過性亢進による間質の浮腫が病因である。この急性炎症を制御する観点からの、ステロイド使用や好中球エラスターゼ阻害剤などの創薬が行われてきたが有効性は乏しい。

一方、生命現象と密接に関わる現象として、Autophagyによる浄化作用が明らかになってきた。細胞内ではhomeostasisを維持するために、ミトコンドリアを中心として代謝が活発に行われ細胞生存を支援している。代謝を恒常的に継続させるためには、細胞内にある核、小胞、ゴルジ体などorganelleの機能のqualityを保つ必要がある。生体にストレスを受けるとこの恒常性を保つためにはorganelleは最大に稼働することになる。これに必要なのはエネルギーを産生するための材料が必要であり、特に蛋白質の合成のためにはアミノ酸が必須となる。ストレス受けるとそれに反応するために通常以上に蛋白合成が必要となり、アミノ酸が枯渇する。飢餓などの摂取不良が継続すると、体内の骨格筋などからアミノ酸の供給を受ける。細胞内においてもorganelleを分解し、アミノ酸を

産出することとなる(自食作用→再利用→新規合成)。このAutophagyの自食作用はユビキチン・プロテアソーム系とは異なり、非選択的分解される。一方、ストレスにて細胞内のorganellesが傷害されたり、Agingの問題にて不良となった場合のqualityを担保するためにorganelleも交換が必要となる。この自浄作用のために、organelleは貪食され処理される(自浄作用→処理・破棄→新規交換)。さらに、代謝の中では合成の過程で不要な代謝産物が産生され蓄積される。これが過剰となると細胞の機能に障害をきたすために、不要な老廃物の処理が恒常的におこなわれる必要がある(自浄作用→処理・破棄)。細菌感染・毒物は細胞に傷害を与え続ける。放置すると状況が進展し細胞死・生体死へとつながる可能性があるために、生体防御反応として原因物質を貪食し処理・破棄する。この反応は病原体の分解産物のペプチドを認識し、免疫担当細胞への情報を発信することにもなる(生体防御反応→処理・破棄→免疫応答)。以上の生命現象にてhomeostasisが維持できない場合、つまり細胞内で過剰なAutophagyが誘導され続けると細胞内の機能を維持することができなくなり細胞死が誘導されることとなる。今回、炎症を主体としたARDSが、Autophagyの浄化作用がどのように関連しているかを検証することは、新たなARDSへの診断・治療法への開発する可能性が示唆される。

2. 研究の目的

肺を中心として感染・外傷等が発生し、ARDS の病態が成立するまでにalveolar microenvironmentでは、過剰は炎症反応により細胞、組織が損傷されていく。病態成立の過程の中で、免疫担当細胞、肺胞上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞などから活性酸素等の酸化ストレスのため、inflammasome を主体としたサイトカインやプロテアーゼ(MMP)等が産生され、血管透過性が亢進し肺胞組織障害がさらに進行する。この病態の遷延化は組織線維化を合併し不可逆的状况となる。病態の進行を制御するためには、早期の

原因の除去と過剰な炎症からの回避につける。破綻したミトコンドリアの存在は細胞環境を増悪させ、Autophagy (Mitophagy)により早期の除去されることが過剰な酸化ストレスの発生を予防する可能性がある。さらにミトコンドリア等の organelle の処理に苦慮した場合には細胞死を惹起し細胞自らが犠牲となり周囲組織の恒常性を維持する。このようにAutophagy は柔軟な生理活性選択を有しており、この多彩な機能によりARDSの制御に関与していることを明らかにすることを目的とする。さらに、ARDS は急性炎症を中心とした病態であるので、Cytokine およびMediatorの制御と白血球(特に好中球)の活性制御の視点から、Autophagy 関連分子とそれを標的とする microRNA の同定を明らかにする。

また、我々はこれまでexosome 内にmicroRNA が濃縮されて存在し、生物活性を有することを食道癌患者からの検体で解析し報告してきた (CCR2009, Cancer 2013)。本件球において、ARDSの患者血清中のexosome を同定、分離し、Autophagy に関連したmicroRNA の同定し検証する。microRNA は多くの遺伝子の発現を同時に制御できるので、薬剤としてmicroRNA は単剤もしくは複数投与による急性炎症関連のあらゆる分子に対して治療することができ、microRNA の臨床応用への可能性を追求することも将来への目標としたい。

3. 研究の方法

A. ARDS と非ARDS 患者から血液の採取保存と白血球分離

健常者とARDS の患者からの血液・白血球・喀痰を採取していく。血液は血清分離し精製まで-80 にてストックしておく。また、血清の検体中に細胞成分の含有を予防するため、0.45 μ m の Filter 処理を行う。

また、血液についてはlymph prep を用いて白血球(neutrophil, monocyte, lymphocyte)を各分離し各種実験の用途に対応する。

B. 白血球からの蛋白・遺伝子の精製、血液中 Exosome の精製

白血球はlysis bufferを用いて蛋白分離し、TrizolにてmRNAを分離する。また、MegaMax nucleic acid isolation kitを用いて、DNase I処理を追加し、miRNAの精製を行う。Exosomeの精製には、表面markerのanti-CD63、anti-EpCAM Absにmagnetic beadsを連結させ、MACSによりsortingを行う。洗浄遠心後、100,000 g による超遠心器を4、1時間行い、pelleted exosomeを回収し、一部をin-vitroの解析のため-80 保存する。

C. ARDSと関連したmicroRNAの発現解析と網羅的解析

microRNA はSanger Institute から配信されているヒトのmicroRNA のsequence を参考に、数百種類のmicroRNA を選定し、original designed primer を用いて、Multi-qRT-PCR を行う。具体的には、Poly A tailed RT-PCR を用いて検証する。microRNA にpoly A polymerase を用いてpoly A を付加する。Poly A配列を考慮したRT primer を用いてRT を行う。次に、microRNA のcDNA に対して、特異的primer を用いてSYBR green based real time PCR を行う。また、発現の確証として、TaqMan probe を用いて発現も実施する。さらに、microRNA の発現を網羅的に解析するため、microRNA のmicroarray を用いて検討していく。microRNA の発現profile とARDSとの関連性については、Genespring soft 等を用いて解析する。microRNA の標的遺伝子の検索については、Sanger Institute のTarget Scan を用いてAutophagyに特異的な標的遺伝子予想しmicroRNA を絞りこむ。

D. ARDS におけるAutophagy誘導機構の解析

ARDS発症における炎症とAutophagyの関連性を明らかにするため、培養細胞株である肺胞上皮細胞株(A-549)および白血球系細胞株(THP-1)を用いて検証した。細胞株は37、5% CO₂下の加湿された培養器で、10%FBSを含んだ培養液RPMI1640

で培養維持した。炎症誘導因子として、LPS, TNF alpha, IL-1 betaにより一定期間の刺激を行い、氷冷下において、Lysis buffer (20mM Tris buffer, 50mM NaF, 30mM Sodium Pyrophosphate, 1% Triton, 5 mM EGTA, 50 mM NaCl, 1 mM Sodium Orthovanadate)により細胞溶解させ、高速超遠心後に上清を回収し、-20℃にて保存した。Autophagy関連蛋白(LC-3I/II, p62等)の発現解析にはWestern blottingにより検証した。

4. 研究の成果

ARDSにおいて肺胞上皮細胞、血管内皮細胞、浸潤白血球による相互作用により急性炎症病態が発症している。このメカニズムを明らかにするため、肺胞上皮細胞由来のA549細胞株と白血球の単球由来のTHP-1細胞株を用いて検討した。炎症誘導因子とした、LPS(0, 0.1, 1, 10, 50 mcg/ml)にて刺激を行い、24時間後の細胞をLysis bufferにて融解させ、蛋白を回収した。Autophagy誘導化の指標のLC-3IIの発現はLPS刺激により促進された。また、TNFalpha(0, 0.1, 1, 10, 50 ng/ml), IL-1 betaにより、刺激を行いLPSと同様にLC-3IIの発現が誘導されていることが確認できた。肺胞上皮細胞に生じた炎症反応に対して、Autophagyを活性化させ、炎症を制御するメカニズムが存在している可能性が示唆された。また、Autophagosomeとlysosomeのfusionを抑制することによりAutophagyを阻害させるBafilomycin A1により抑制された。

以上より、肺胞上皮細胞における炎症制御においてAutophagyが介在していることが判明した。また、THP-1細胞株においても同様の実験検証を行い、同様な傾向を呈した。ARDSにおける急性炎症病態において、炎症局所では炎症誘導とそれを負に制御するAutophagy誘導のメカニズムが存在していることが示唆された。

次に、炎症を終息化するための戦略として、遺伝子発現の干渉作用により発現を負に制御するmicroRNAを用いた治療法を開発することを目的とした。ARDSの患者血清と健常者血清中のExosome内のmicroRNAの発現の比較検証を行

い、ARDSに特異的なmicroRNAの網羅的解析をmicroRNAのmicroarrayを用いて行った。その結果、Primary ARDSにおいて特異的に発現している複数のmicroRNAが同定された(let-7b, miR-141, miR-142, miR144, miR-330, miR-409など)。今後、ARDSとの関連についてTaqManによるReal time RT-PCRを継続して確認中である。さらに、Autophagyを介したmicroRNAによる標的治療の開発のため、Autophagyの関連分子の発現に関するmicroRNAを同定中である。これまでの報告等によりAutophagy関連分子のLC-3発現にmiR-183, miR-204が関与し、また、Beclin-1の発現にmiR-30a, miR-376bの関与が分かっており、A-549, THP-1をLPS等にて刺激下におけるAutophagy誘導との関連性について現在検証中である。最終的には、ARDSの炎症惹起するmicroRNAおよびautophagyを誘導させるmicroRNAを組み合わせたARDSへの治療へ応用していく。

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8件)

- 1) Aerosoled tobramycin pseudomonas aeruginosa ventilator-associated pneumonia in patients with acute respiratory distress syndrome Migiyama Y, Hirosako S, Tokunaga K, Migiyama E, Tashiro T, Sakishima K, Kamohara H, Kinoshita Y, Korigi H Plum. Pharamcol. Ther. 2017; 45: 142-47. 査読有
- 2) Refractory peritonitis by spontaneous perforation of the common bile duct in a patient receiving peritoneal dialysis. Hayata M, Yamashita J, Kentaro Tokunaga, Ejima M, Sagishima K, Nakagawa S, Hashimoto D, Baba H, Maruyama K, Kohroggi Y, Mizumoto T, Mukoyama M, Kamohara H. Renal Replacement Therapy, 2017 3:53. 査読有
- 3) Pupil diameter for confirmation of brain death in adult organ donors in Japan. Sagishima K, Kinoshita Y.

Acute Medicine & Surgery 2017;4:19-24. 査読有
4) Hyperammonemia crisis following parturition
in a female patient with ornithine
Transcarbamylase deficiency.

Kido J, Kawasaki T, Mitsubuchi H, Kamohara H,
Ohba T, Matsumoto F, Endo F, Nakamura K.

World J, Hepatol. Vol9(6), 2017, 343-348. 査読有
5) 長時間腹臥位が奏功した敗血症性急性呼吸促進
症候群の1例

田代貴大, 長崎愛, 田中貴子, 吉里孝子, 小寺厚志,
鷲島克之, 興相博次, 木下順弘

人工呼吸, Vol33(1), 2016, 85-90. 査読有

6) Infective endocarditis caused by odontogenic
infection with dentinogenesis imperfecta in
Jeune syndrome.

Naito H, Kamohara H, Oshima T, Yamashita J,
Tokunaga K, Niimori D, Kotera A, Sagishima K,
Nakayama H, Kinoshita Y.

J. Clin. Case Rep. Vol5, 2015, 604-606. 査読有

7) Healthy baby delivered vaginally from a
brain-dead mother.

Kinoshita Y, Kamohara H, Kotera A, Sagishima
K, Tashiro T, Niimori D.

Acute Med. Surg. Vol2, 2015, 211-213. 査読有

8) A case of successful weaning from mechanical
ventilation after inhaled tobramycin therapy
for refractory pseudomonas aeruginosa
infection.

Migiyama Y, Hirotsako S, Yamaguchi E, Tashiro
T, Sagishima K, Kamohara H, Korigi H,
Kinoshita Y.

J. Jpn. Soc. Intensive Care Med. Vol22, 2015,
122-126. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

1) 肺炎による呼吸不全に対して、Nasal High
Flow Therapy により気管挿管を回避できた脳性
麻痺症例の検討

第45 回日本集中治療医学会学術集会(2018 年2
月21 日~23 日 幕張メッセ 他)

蒲原英伸, 中原智史, 徳永健太郎, 早田学, 江嶋正
志, 成松紀子, 鷲島克之, 山本達郎

2) 食道手術後の呼吸不全に気胸を合併した2 症
例

第45 回日本集中治療医学会学術集会(2018 年2
月21 日~23 日 幕張メッセ 他)

江嶋正志, 中原智史, 早田学, 徳永健太郎, 成松紀
子, 鷲島克之, 蒲原英伸, 山本達郎

3) 当院における Neurally Adjusted Ventilatory
Assist(NAVA)使用での反省点・注意点

第1 回日本集中治療医学会九州支部学術集会
(2017 年5 月13 日 長崎ブリックホール)

徳永健太郎, 山下大輔, 山下淳二, 早田学, 江嶋正
志, 鷲島克之, 蒲原英伸

4) 悪性黒色腫に対する抗PD-1 抗体療法により重
症筋無力症を発症し人工呼吸離脱不能となった一
例

第44 回日本集中治療医学会学術集会(2017 年3
月9 日~11 日 ロイトン札幌 他)

蒲原英伸, 山下淳二, 徳永健太郎, 早田学, 江嶋正
志, 鷲島克之

5) 食道癌に対する胸骨後胃管再建術後に心タンポ
ナーデを来した3 症例

第42 回日本集中治療医学会学術集会(2015 年2
月9 日~11 日 東京都)

田代貴大 他

〔図書〕(計 1 件)

1) 周術期管理, 集中治療室. わかりやすい外科学.
蒲原英伸. 文光堂38(3): 363 - 369, 2014. (分担執
筆)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

5. ホームページ等: なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

田代貴大 (Tashiro Takahiro)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤医師

研究者番号：00613340

(2)研究分担者

蒲原英伸 (Kamohara Hidenobu)

熊本大学・生命科学研究部・准教授

研究者番号：90398222

鷺島克之 (Sagishima Katsuyuki)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40336235

廣佐古進 (Hirosako Susumu)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：70432995

(3)連携研究者：なし

(4)研究協力者：なし__