

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17892

研究課題名(和文) 脂肪特異的Atg5KOマウスを用いた敗血症病態におけるオートファジーの機能解明

研究課題名(英文) Elucidating the Function of Autophagy in Septic Pathology Using Adipose Tissue-Specific Atg5 Knockout Mice

研究代表者

蛭原 健 (Ebihara, Takeshi)

大阪大学・医学部附属病院・特任助教(常勤)

研究者番号：10813975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症において重篤な症例では代謝障害がみられる。オートファジーは高度に保存された異化機構であることから、重篤な敗血症ではオートファジーの機能不全が生じていると考えられた。今回、エネルギー基質の貯蔵庫として重要な脂肪細胞のオートファジーを評価することで敗血症におけるオートファジーの役割を評価した。LPSを投与したマウスにおいてオートファジーを阻害しても、代謝動態に変化は見られなかった。一方、脂肪細胞特異的にオートファジーをKOしたマウスではLPS耐性と血中でいくつかの炎症性サイトカイン、ケモカインが低値であった。脂肪細胞のオートファジーは炎症の惹起や増幅の一役を担っている可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の医療水準の向上にも関わらず、全世界で年間2500万人以上が敗血症に罹患し、そのうち4人に1人が死亡する。敗血症の治療は抗生剤投与に加えて輸液や強心薬投与などの対処療法が主体であるが、それだけでは救命することが困難な症例が存在する。これらの病態として過剰な炎症による関与が疑われている。更なる敗血症病態の解明や治療法の創出が急務である。今回、いままでに評価されてこなかった脂肪細胞のオートファジーが炎症の惹起や増幅に関与している可能性を明らかにすることができた。オートファジーを薬剤を持ちいて阻害することは可能であり、今後炎症制御の新たな治療法の創出につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In severe sepsis, there are still cases where patients cannot be saved. These cases often exhibit metabolic disorders. Since autophagy is a highly conserved catabolic mechanism, it was hypothesized that autophagy dysfunction might occur in severe sepsis. This study evaluated the role of autophagy in severe sepsis by assessing autophagy in adipocytes, which are crucial for energy substrate storage. In mice administered with LPS, inhibition of autophagy using pharmacological agents did not result in changes in metabolic dynamics. However, mice with adipocyte-specific autophagy knockout showed resistance to LPS and had lower levels of several inflammatory cytokines and chemokines in the blood. These findings suggest that autophagy in adipocytes may play a role in the initiation and amplification of inflammation.

研究分野：救急医療

キーワード：敗血症 オートファジー 脂肪細胞 サイトカイン

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

近年の医療水準の向上にも関わらず、全世界で年間 2500 万人以上が敗血症に罹患し、そのうち 4 人に 1 人が死亡する。敗血症の治療は抗生剤投与に加えて輸液や強心薬投与などの対処療法が主体であるが、それだけでは救命することが困難な症例が存在し、更なる敗血症病態の解明や治療法の創出が急務である。

オートファジーはその分子機構解明という功績に対して 2016 年ノーベル生理学・医学賞の対象となった。オートファジーと各種疾患との関係に関する研究は盛んに行われており、敗血症患者や敗血症モデルにおいてもいくつかの報告がなされている。しかしこれらの報告では、オートファジーの経時的な評価がなされていないことや、ノックアウト (Knock out、以下 KO) 動物モデルを用いたオートファジーの生理的な機能評価がほとんど行われていないなどの問題がある。肝組織特異的にオートファジーを KO した CLP マウスモデルでの研究では、KO マウスでの生存時間の短縮や肝細胞でのアポトーシスの増加などが報告されており (Ohami T et al. SHOCK 2018)、敗血症におけるオートファジーが重要な役割を担っている可能性が示唆されている。重症の敗血症患者を数多く治療していく中で、ある一定数激烈な経過を辿り救命することができない症例を経験する。それらの症例は低血糖、低体温を呈することが多い。オートファジーは高度に保存された異化機構であり様々な病態との関連が指摘されている。我々は敗血症病態において脂肪組織でオートファジーが誘導され、エネルギー基質 (遊離脂肪酸) の供給や体温の維持に関与しているとの仮説をもとに研究を開始した。

2. 研究の目的

敗血症における脂肪細胞でのオートファジーの機能を解明する

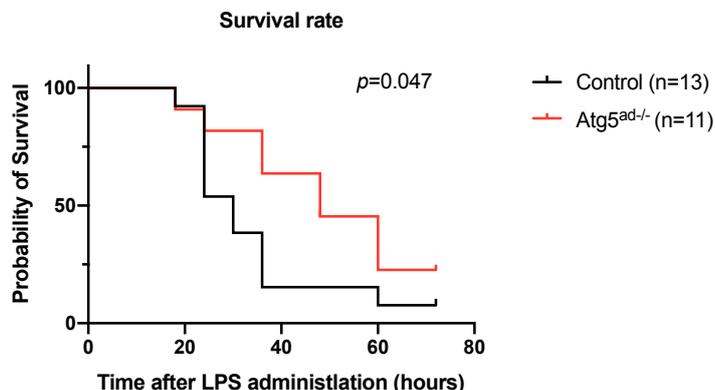
3. 研究の方法

- 1) 野生型マウス、脂肪細胞特異的 *Atg5* KO マウスに LPS (15mg/kg) を腹腔内に投与し生存時間を評価した。
- 2) 敗血症における脂肪細胞でのオートファジーがエネルギー基質の供給に関与しているか評価するために、野生型マウス、脂肪細胞特異的 *Atg5* KO マウスにおける、LPS 投与後の血糖 (BS)、中性脂肪 (TG)、遊離脂肪酸 (FFA) を測定した。
- 3) 野生型マウス、脂肪細胞特異的 *Atg5* KO マウスに LPS を投与し血清中の炎症性サイトカイン、抗炎症性サイトカインを ELISA で測定した。
- 4) 野生型マウスに LPS を投与し脂肪組織での炎症性サイトカイン、抗炎症性サイトカインの遺伝子発現を qPCR にて経時的に評価した。
- 5) 野生型マウスと脂肪細胞特異的 *Atg5* KO マウスに LPS を投与し投与前と投与 3 時間後の脂肪組織を採取し RNA の網羅的解析を行なった。

4. 研究成果

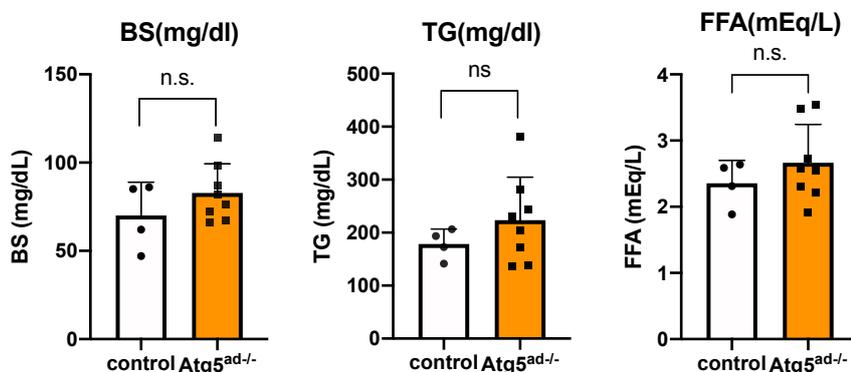
1) 野生型マウス (n=13) と脂肪細胞特異

的 *Atg5* KO マウス (n=11) に LPS 15mg/kg を腹腔内に投与したところ、脂肪細胞特異的 *Atg5* KO マウスの方が生存時間の有意な延長を認めた (一般化ウィルコクソン検定、 $p=0.047$)。



2) 野生型マウスと脂肪細胞特異 *Atg5* KO

マウスに LPS (15mg/kg) 投与し、24 時間後に血清中の BS、TG、FFA を測定したところ、両群で有意な差は認めなかった。



3) 野生型マウスと脂肪細胞特異 *Atg5* KO マウスに LPS (15mg/kg) 投与し、3 時間後と 24 時間後

の血清の IL-1 β 、IL -6、KC、TNF- α 、MCP-1、IL-10 の濃度を、ELISA を用いて測定した。LPS 投与 3 時間後においては、両群で有意な差は見られなかったが、24 時間後には脂肪細胞特異 *Atg5* KO マウスの IL-1 β と MCP-1 は野生型と比較して有意に低値を示した。

4) 野生型マウスと脂肪細胞特異 *Atg5* KO マウスに LPS (15mg/kg) 投与し、3 時間後に脂肪組織

を採取し IL-1 β 、IL -6、KC、TNF- α 、MCP-1、IL-10 の RNA 発現量を qPCR 法で測定した。脂肪細胞特異 *Atg5* KO マウスの MCP-1 の RNA 発現量は野生型マウスと比較して有意に低値を示した。

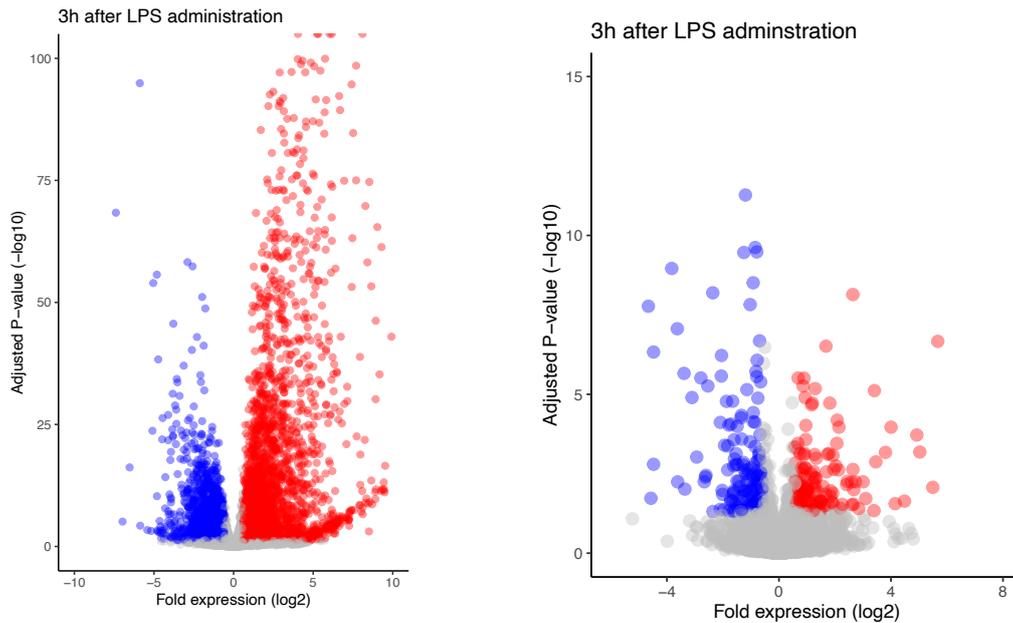
5) 野生型マウスと脂肪細胞特異 *Atg5* KO マウスに LPS (15mg/kg) 投与し、投与前と、投与 3 時間

後に脂肪組織を採取し RNA の網羅的解析を行なった。野生型マウスにおける投与前と投与 3 時間後の RNA 発現は大きく異なっていた (volcano plot)。log₂ Fold change > 1、Adjusted P-value < 0.05 としたとき、有意に上昇していた RNA を用いてエンリッチメント解析 (Gene Ontology) を行なったところ、positive regulation of cytokine production や positive regulation of immune response などのパスウェイがエンリッチされていた。一方有意に低下していた RNA を用いてエンリッチメント解析 (Gene Ontology) を行なったところ、generation

of precursor metabolites and energy や energy derivation by oxidation of organic compounds などのパスウェイがエンリッチされていた。

LPS 投与 3 時間後における野生型マウスと脂肪細胞特異 *Atg5* KO マウスにおける RNA 発現を評価したところ、異なる RNA 発現を認めた (volcano plot)。

脂肪細胞特異 *Atg5* KO マウスで野生型マウスと比較して有意に発現が低下していた RNA を用いてエンリッチメント解析を行なったところ positive regulation of immune response のパスウェイがエンリッチされていた。



以上の研究から、LPS 投与により脂肪組織では免疫反応が活性化し、代謝は低下する。脂肪細胞のオートファジーは以前の研究 (科学研究費補助金(若手研究)平成 30 年~令和 2 年「侵襲時生体反応におけるオートファジーの役割とその制御: エネルギー供給の観点から」) から高容量の LPS 投与により阻害されることがわかっており、今回の研究からも LPS 投与モデルにおける代謝動態への関与は少ないと考えられた。一方脂肪組織が、炎症を惹起、増幅する免疫反応にも関与している組織であることが明らかになった。さらに、脂肪細胞のオートファジーを deletion することで、炎症反応が増強されることが明らかになった。以上より、脂肪細胞のオートファジーは炎症制御に関与している可能性が考えられ、今後の敗血症治療の新たな治療ターゲットになりうる可能性が考えられた。

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 2件）

1. 著者名 Ebihara Takeshi, Matsumoto Hisatake, Matsubara Tsunehiro, Togami Yuki, Nakao Shunichiro, Matsuura Hiroshi, Onishi Shinya, Kojima Takashi, Sugihara Fuminori, Okuzaki Daisuke, Hirata Haruhiko, Yamamura Hitoshi, Ogura Hiroshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Resistin Associated With Cytokines and Endothelial Cell Adhesion Molecules Is Related to Worse Outcome in COVID-19	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.830061	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 -

1. 著者名 Ebihara T, Matsumoto H, Matsubara T, Togami Y, Nakao S, Matsuura H, Kojima T, Sugihara F, Okuzaki D, Hirata H, Yamamura H, Ogura H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Cytokine Elevation in Severe COVID-19 From Longitudinal Proteomics Analysis: Comparison With Sepsis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontier in immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Ebihara Takeshi, Matsumoto Hisatake, Matsubara Tsunehiro, Matsuura Hiroshi, Hirose Tomoya, Shimizu Kentaro, Ogura Hiroshi, Kang Sujin, Tanaka Toshio, Shimazu Takeshi	4. 巻 Publish Ahead of Print
2. 論文標題 Adipocytokine Profile Reveals Resistin Forming A Prognostic-Related Cytokine Network In The Acute Phase of Sepsis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Shock	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/SHK.0000000000001756	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 虻原 健
2. 発表標題 敗血症における脂肪組織でのオートファジーの役割
3. 学会等名 救急医学会
4. 発表年 2020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
---------	---------