

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08586

研究課題名(和文)敗血症性播種性血管内凝固(DIC)の分子病態解明に基づいた予防法・治療法の創出

研究課題名(英文) Prophylactic and therapeutic strategy based on the molecular pathology of septic disseminated intravascular coagulation (DIC)

研究代表者

服部 裕一 (HATTORI, Yuichi)

北海道医療大学・その他・客員教授

研究者番号：50156361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：多菌性敗血症動物モデルとして、マウスに盲腸結紮穿孔(CLP)を行い、腹膜炎発症による敗血症を生じさせた。また、DIC時の血液凝固に関わるとされる分子群である組織因子(TF)、PAI-1の発現は敗血症後増加が認められた。また、CLPマウスでは、血小板数が、著明に低下しており、プロトロンビン時間は有意に延長していた。さらに、CLPマウスで認められたDIC所見に対し、種々の炎症性サイトカイン増加を誘発する転写因子であるNF- $\kappa$ Bデコイ核酸を遺伝子導入したが、抑制効果は認められなかったことから、敗血症性DICにNF- $\kappa$ Bは関与していないと示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、盲腸結紮穿孔敗血症マウスは敗血症性DIC病態を研究するうえでよいモデルであることを明らかにした。本研究は、敗血症によるDICの分子病態機構の解明に新たな展開を与えるとともに、現時点で確立されたよい治療法の全くない本病態において、新たなDIC発症予防の開発を模索していくうえでも意義のある研究となったと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We used the cecal ligation and puncture (CLP)-induced sepsis mouse model. In septic mice, the mRNA expression levels of tissue factor (TF) and plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) were greatly increased. In addition, the number of platelets in CLP-induced septic mice were markedly reduced and prothrombin time was significantly prolonged in CLP mice in comparison with controls. These results imply that CLP-induced sepsis is a relevant model of sepsis-associated disseminated intravascular coagulation (DIC). Transfection of NF- $\kappa$ B decoy oligodeoxynucleotides via intravenous injection, when given 1 h after CLP, resulted in a striking reduction in the DNA binding of NF- $\kappa$ B in lungs at 6 h and strongly inhibited elevations in blood levels of pro-inflammatory cytokines in CLP mice. However, NF- $\kappa$ B decoy transfection failed to affect the changes in measures as DIC in CLP mice, suggesting no involvement of the transcription factor NF- $\kappa$ B in the molecular mechanisms underlying septic DIC.

研究分野：医歯学

キーワード：敗血症 播種性血管内凝固 転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

高齢者人口の増加,悪性腫瘍や移植時の化学療法などによる免疫機能の低下,多剤耐性菌の出現などにより,敗血症は現在においてもなお高い死亡率を有している.敗血症(sepsis)は,従来,「感染によって引き起こされた全身性炎症反応症候群(SIRS: systemic inflammatory response syndrome)」とされてきた.しかし,敗血症進展のリスクを回避し,敗血症患者の時宜を得た治療の重要性を考慮する,という観点から,「感染に対する制御不能な宿主反応による生命に関わる臓器不全」と2016年になってその定義が見直された.敗血症はその進行に伴い,炎症と血液凝固の cross-talk によりその過剰状態に至る播種性血管内凝固(DIC: Disseminated Intracelluar Coagulation)を誘発し,多臓器不全の重要な原因の一つと考えられている.すなわち,DICでは,全身の血管に微小血栓が無数に生じ,細血管が詰まるため,血流が妨げられて(hypoperfusion),酸素や栄養などが組織に届かなくなり(tissue hypoxia),虚血性壊死を生じ,腎臓や肺などの主要臓器に障害を起こしてくる.一方で,血栓が全身に継続して起こる結果,凝固反応を抑えようと凝固制御因子のアンチトロンピンがトロンピンに結合して中和し,できた血栓を溶かそうとしてプラスミンが活発に働くようになり,これらの反応が同時かつ無秩序に全身の血管や組織で進行するため,血小板や凝固因子の体内での大量消費による著しい減少により,大出血を起こすようになる.敗血症において DIC の臨床症状が出現すると,予後不良となり,その致死率は 50%を超えるため,臨床症状がない時点でいかに DIC の発症を予防するかが重要な課題となっている.敗血症による DIC の発症原因として,炎症性サイトカインの過剰産生が挙げられるが,これによる炎症と,血液凝固系との cross-talk の分子機構については十分に解明されていない.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- $\kappa$ B や AP-1 といった転写因子の核内移行が誘導されて,炎症性分子ばかりでなく,敗血症病態形成に関与する多くの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,心機能低下など多彩な変化が起こり,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多臓器不全に対してこれら転写因子を標的とした遺伝子治療の開発を目指してきた.近年,敗血症は遺伝子関連疾患として捉えられており,その発症や重症化に関連して,炎症や細胞死を誘導する遺伝子の発現が多彩に変化して病態に重要な役割を果たしていると考えられる.敗血症性 DIC 病態形成のステップにおいて,ある種の転写因子デコイ核酸は,血液凝固異常に関係する遺伝子群の発現を制御し敗血症性 DIC 発症に対し予防効果をあげるものがあることが期待される.

## 2. 研究の目的

感染に対する制御不能な宿主反応による生命に関わる臓器不全と,2016年になってその定義が見直された敗血症においては,敗血症性ショックや多臓器不全への進展を回避するための時宜を得た治療法を見出すことが,現在救命救急領域で求められているニーズである.そこで本研究では,臨床病態に近い敗血症モデルと考えられている盲腸結紮穿孔敗血症マウスを用いて,多臓器不全発症の重要な原因の一つとして考えられている播種性血管内凝固(DIC)の分子病態機構の解明に新たな展開を与え,敗血症病態形成に寄与している転写因子を分子標的とした治療により,DIC の発症を防止でき敗血症治療に新しい方向性を生み出していけるか検証することを目的とする.

## 3. 研究の方法

臨床に近似した盲腸結紮穿孔敗血症マウスを用いて、分子生物学、生化学、病理組織学および生体機能学の手法を駆使して、敗血症性 DIC の病態形成に寄与する遺伝子群の発現や、それらによって起こる生化学的、組織学的あるいは機能学的変化と、転写因子との関連を、デコイ核酸の *in vivo* 投与方法によって評価し、培養血管内皮細胞を用いて、エンドトキシンを投与したときの、DIC に関係する分子群の発現の変化をみるとともに、炎症や血液凝固に寄与する分子群の動態が、NF- $\kappa$ B のような転写因子をノックダウンしたときにどのようにされるか検討し、DIC の発症機序として推測されている血管内皮細胞傷害と転写因子の関係を探っていく。

#### 4 . 研究成果

多菌性敗血症動物モデルとして、マウスに盲腸結紮穿孔(CLP)を行い、腹膜炎発症による敗血症を生じさせた。また、DIC 時の血液凝固に関わるとされる分子群である組織因子(TF)、PAI-1 の発現は敗血症後増加が認められた。また、CLP マウスでは、血小板数が、著明に低下しており、プロトロンビン時間は有意に延長していた。さらに、CLP マウスで認められた DIC 所見に対し、種々の炎症性サイトカイン増加を誘発する転写因子である NF- $\kappa$ B デコイ核酸を遺伝子導入したが、抑制効果は認められなかったことから、敗血症性 DIC に NF- $\kappa$ B は関与していないと示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suzuki T, Sakata K, Mizuno N, Palikhe S, Yamashita S, Hattori K, Matsuda N, Hattori Y	4. 巻 223
2. 論文標題 Different involvement of the MAPK family in inflammatory regulation in human pulmonary microvascular endothelial cells stimulated with LPS and IFN-	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Immunobiology	6. 最初と最後の頁 777-785
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） org/10.1016/j.imbio.2018.08.003	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 Sakamoto T, Ohashi W, Tomita K, Hattori K, Matsuda N, Hattori Y	4. 巻 62
2. 論文標題 Anti-inflammatory properties of cilostazol: Its interruption of DNA binding activity of NF- B from the Toll-like receptor signaling pathways	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int Immunopharmacol	6. 最初と最後の頁 121-131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） org/10.1016/j.intimp.2018.06.021	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 Hattori Y, Hattori K, Suzuki T, Palikhe S, Matsuda N	4. 巻 833
2. 論文標題 Nucleic-acid based gene therapy approaches for sepsis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Eur J Pharmacol	6. 最初と最後の頁 403-410
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） org/10.1016/j.ejphar.2018.06.031	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 Yamashita S, Suzuki T, Iguchi K, Sakamoto T, Tomita K, Yokoo H, Sakai M, Misawa H, Hattori K, Nagata T, Watanabe Y, Matsuda N, Yoshimura N, Hattori Y	4. 巻 391
2. 論文標題 Cardioprotective and functional effects of levosimendan and milrinone in mice with cecal ligation and puncture-induced sepsis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol	6. 最初と最後の頁 1021-1032
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） org/10.1007/s00210-018-1527-z	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 Yuichi Hattori, Kohshi Hattori, Tokiko Suzuki, Naoyuki Matsuda	4. 巻 177
2. 論文標題 Recent advances in the pathophysiology and molecular basis of sepsis-associated organ dysfunction: Novel therapeutic implications and challenges	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pharmacology & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 56-66
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 Yuichi Hattori, Martin C. Michel	4. 巻 10
2. 論文標題 Editorial: G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and -arrestins: New insights into disease regulators	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 1654
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2019.01654	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 該当する

1. 著者名 服部裕一、服部貢士、松田直之	4. 巻 42
2. 論文標題 敗血症病態における血管内皮細胞の活性化と機能障害	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 血管	6. 最初と最後の頁 9-16
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5件(うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 富田賢吾, 服部裕一
2. 発表標題 敗血症モデルマウスにおける各種デコイ核酸を用いた遺伝子治療
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会(シンポジウム: 感染・炎症システムを対象とした定量生命科学研究の最前線と創薬への新展開)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本卓弥, Samar Imbaby, 富田賢吾、服部裕一
2. 発表標題 盲腸結紮穿刺誘発性敗血症マウスモデルにおける播種性血管内凝固症候群(DIC)
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuichi Hattori
2. 発表標題 Histamine as a potential mediator that actively promotes the development of organ injury in sepsis
3. 学会等名 1st Joint Meeting of the European Histamine Research Society and the Japanese Histamine Research Society (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 服部裕一
2. 発表標題 敗血症性急性肺傷害の病態メカニズムと新たな治療戦略
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会 (シンポジウム: 呼吸器疾患研究の最近の動向: 基礎と臨床)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naoyuki Matsuda, Samar Imbaby, Kohshi Hattori, Yuichi Hattori
2. 発表標題 STAT3 decoy oligodeoxynucleotides improve end-organ tissue injury and survival in septic mice
3. 学会等名 Experimental Biology 2020 (国際学会)
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
研究分担者	大橋 若奈  (OHASHI Wakana)  (50381596)	富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教   (13201)	
研究分担者	富田 賢吾  (TOMITA Kengo)  (20758213)	富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教   (13201)	
研究分担者	鈴木 登紀子  (SUZUKI Tokiko)  (10415531)	富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教   (13201)	