

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K17063

研究課題名(和文) ARDS, 敗血症性多臓器不全に対する細胞種特異的なPHD2阻害による治療戦略

研究課題名(英文) The effects of cell-type-specific inhibition of PHD2 in sepsis and ARDS

研究代表者

柏木 静 (KASHIWAGI, Shizuka)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：20596150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、実質臓器を構成する細胞において特異的に低酸素応答を誘導することで、免疫系への影響を最小限に保ちながら、敗血症性の臓器障害を抑制し、生命予後を改善できるのか検討することであった。標的遺伝子等について当初の予定からは変更があったものの、腸管上皮細胞特異的に低酸素応答を誘導することで、敗血症による腸管バリアー破綻を軽減し、生命予後を改善できる可能性が、遺伝子改変マウスを用いた検討により示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症は重症感染症に伴い様々な臓器障害をきたす予後不良な疾患で、新規治療法の開発が期待されている。本研究の成果は、腸管上皮細胞に特異的に低酸素応答を誘導することが、腸管バリアーの保護を介して敗血症の生命予後を改善しうることを明らかにした。この結果によって、腸管特異的なドラッグデリバリーシステム等によって、腸管への低酸素応答誘導を行う介入が、敗血症の新規治療法になりうる可能性があることが示された。

研究成果の概要(英文)：We aimed to investigate whether the induction of hypoxic responses in the specific types of cells constituting parenchymal organs can be a potential therapeutic approach for sepsis. Our animal experiments have demonstrated that the induction of hypoxic responses in intestinal epithelial cells protects the intestinal barrier and promotes survival in sepsis.

研究分野：集中治療医学

キーワード：敗血症 低酸素誘導性因子 低酸素応答 腸管傷害

1. 研究開始当初の背景

近年、低酸素応答の誘導は ARDS や敗血症による傷害から臓器を保護できる方法として、注目されている。細胞の低酸素応答のマスターレギュレーターは低酸素誘導性因子(HIF)であり、酸素が十分に存在する環境下では Prolyl Hydroxylase (PHD) によって修飾された HIF のサブユニットが Von Hippel Lindau (VHL) によってユビキチン化され、分解されることで、その活性が抑制されている。一方で、低酸素環境下では HIF のサブユニットが分解されずに、サブユニットと共に転写因子として働くことで、低酸素応答が引き起こされる。そして、低酸素応答は、解糖系への代謝リプログラミング、活性酸素種の抑制、アポトーシス促進タンパクの抑制といったメカニズムを通して、炎症、虚血などの傷害から実質臓器の構成細胞を保護することが報告されている。

一方で、免疫系の細胞においても低酸素応答は様々な機能に関わっており、免疫抑制作用をもたらす可能性があることが報告されている。例えば、全身性に PHD 阻害薬を投与することで低酸素応答を増強すると、LPS 等を用いた非感染性の敗血症モデルでは予後を改善するものの、盲腸結紮穿孔(CLP)等による感染性敗血症モデルにおいては予後を悪化させてしまうことが報告されている(Hams et al. shock 2011)。

従って、敗血症といった重症感染症病態において全身性の低酸素応答の増強は実質臓器構成細胞の保護と感染症の増悪に繋がらう免疫抑制という“両刃の剣”であると考えられているが、上皮細胞や血管内皮細胞といった実質臓器の構成細胞のみにおいて細胞種特異的に低酸素応答を増強することで、免疫抑制を引き起こさずに、臓器保護効果のみを得ることができる可能性がある。

これを踏まえ、実質臓器の構成細胞に対する細胞種特異的な低酸素応答の増強が、免疫抑制を引き起こさずに臓器を保護できるという仮説を実証することは、感染症を伴う ARDS や敗血症といった重症病態の治療への道を開く基盤的な知見となると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、敗血症モデル動物において実質臓器を構成する細胞種特異的に低酸素応答を誘導することで臓器保護ができるか明らかにすることが目的である。具体的には細胞種特異的なプロモーター下に Cre-ERT2 を発現するノックアウトマウスを用いて、細胞種特異的な低酸素応答を誘導し、敗血症モデルにおける臓器障害、生命予後に違いが見られるのか検討を行う。これらを通して、特定の細胞において低酸素応答を誘導することが敗血症の治療標的となることを明らかにし、創薬標的等としての可能性を示すことが目標である。

3. 研究の方法

(1) PHD2 ノックアウトマウスを用いた検討

細胞の低酸素センサーの役割を果たしている PHD のうち HIF の制御において最も重要と考えられている PHD2 の flox/flox マウスを用いて、低酸素応答を誘導する実験を行った。

まず、上皮細胞特異的に Cre/ERT2 を発現する KRT8-Cre/ERT2 マウス及び、すべての細胞において Cre/ERT を発現する CAG-Cre/ERT マウスを用いて、Cre リコンビナーゼによる遺伝子組み換えの評価を行った。レポーターマウス (C57BL/6N-Gt(ROSA)26Sor<tm1(CAG-EGFP/tDsRed)Utr>/Rbrc 理化学研究所 BRC から譲渡) を用いて、4 日間の経口タモキシフェン投与下(コントロールはコーンオイル投与)に loxP 配列で挟まれた領域の組み換えが生じるかを検討した。

次に、KRT8-Cre/ERT2 マウスと、PHD2 flox/flox マウスを掛け合わせた上で、4 日間の経口タモキシフェン投与を行い、その後の HIF の変化について解析を行った。

(2) 腸管上皮細胞特異的な VHL ノックアウトマウスを用いた検討

(1)の結果を踏まえた上で、HIF のユビキチン化を行う VHL を腸管上皮細胞特異的にノックアウトすることで、低酸素応答を誘導し、敗血症モデルにおける腸管透過性及びその他、臓器障害、生命予後への影響を検討した。

最初に上記(1)と同様に腸管上皮特異的に Cre/ERT2 を発現する villin-Cre/ERT2 マウスとレポーターマウスを掛け合わせ、タモキシフェンを投与後の遺伝子組み換えについて検討を行った。

次に、LPS 腹腔内投与による敗血症モデルマウスを構築し、蛍光色素標識デキストランを経口投与することで、腸管の透過性評価を行った。さらに、villin-Cre/ERT2-VHL flox/flox マウスにタモキシフェンを 4 日間投与し、1 週間後に LPS 誘導性敗血症とした上で、腸管透過性、肝障害マーカーとして血中 GOT、GPT、腎障害マーカーとして Cystatin-C を測定した。コントロールは同腹仔の VHL flox/flox マウスとし、同様にタモキシフェン投与後に LPS 誘導性敗血症モデルとし、上記臓器障害マーカーを比較した。最終的に、腸管上皮細胞特異的な VHL ノックアウトが LPS 誘導性敗血症モデルマウスの生命予後に与える影響について検討を行った。

4. 研究成果

(1) PHD2 ノックアウトマウスを用いた検討

CAG-Cre/ERT マウスにおいては、タモキシフェン経口投与後に、すべての臓器において Cre リコンビナーゼによる遺伝子組み換えが生じることが確かめられた。一方の、KRT8-Cre/ERT2 マウスにおいては腸管上皮において遺伝子組み換えが生じることが確かめられたものの、それ以外の肝細胞、肺胞上皮細胞といった上皮細胞において明らかな遺伝子組み換えが生じていることを確かめることができなかった。

また、KRT8-Cre/ERT2 マウスと PHD2 flox/flox マウスを掛け合わせたマウスに対してタモキシフェン投与後に腸管上皮細胞を採取し、HIF-1 のサブユニット蛋白の定量を行ったが、明らかな増加を認めることはできなかった。過去の論文においても腸管上皮細胞において HIF を活性化させるためには PHD1、2、3 すべてのサブタイプをノックアウトする必要があると報告されており、PHD2 のノックアウトのみでは十分な低酸素応答を引き起こすことができないことが示唆された。

これを踏まえ、下記の(2)腸管上皮特異的な VHL ノックアウトマウスを用いた低酸素応答誘導による臓器保護効果の検討実験を行う方針とした。

(2) 腸管上皮細胞特異的な VHL ノックアウトマウスを用いた検討

C57BL/6N-Gt(ROSA)26Sor<tm1(CAG-EGFP/tDsRed)Utr>/Rbrc レポーターマウスと villin-Cre/ERT2 マウスとを掛け合わせたマウスでは、タモキシフェンを投与後に腸管上皮細胞において GFP 蛍光から DsRed 蛍光への変化が認められ、腸管上皮細胞特異的な遺伝子組み換えが生じることが明らかになった。また、ウェスタンブロットにて腸管上皮細胞のみにおいて VHL 蛋白が消失していることが示された。

次に、LPS 腹腔内投与敗血症モデルマウスに対して蛍光色素標識デキストランを経口投与することで腸管バリアーの評価を行ったところ、LPS 投与 24 時間後には明らかな透過性の亢進を認めることが確認できた。

以上を踏まえ、villin-Cre/ERT2-VHL flox/flox マウス及び同腹仔の VHL flox/flox マウスに 4 日間の経口タモキシフェン投与を行い、投与終了後 1 週間の段階で LPS 誘導性敗血症モデルとし、腸管バリアー透過性の評価を行った。VHL がノックアウトされる villin-Cre/ERT2-VHL flox/flox マウスにおいては、VHL flox/flox マウスと比較して腸管バリアー透過性の亢進が抑制されることが明らかになった。それ以外の臓器障害については有意な差は見られなかった。

(図 1)

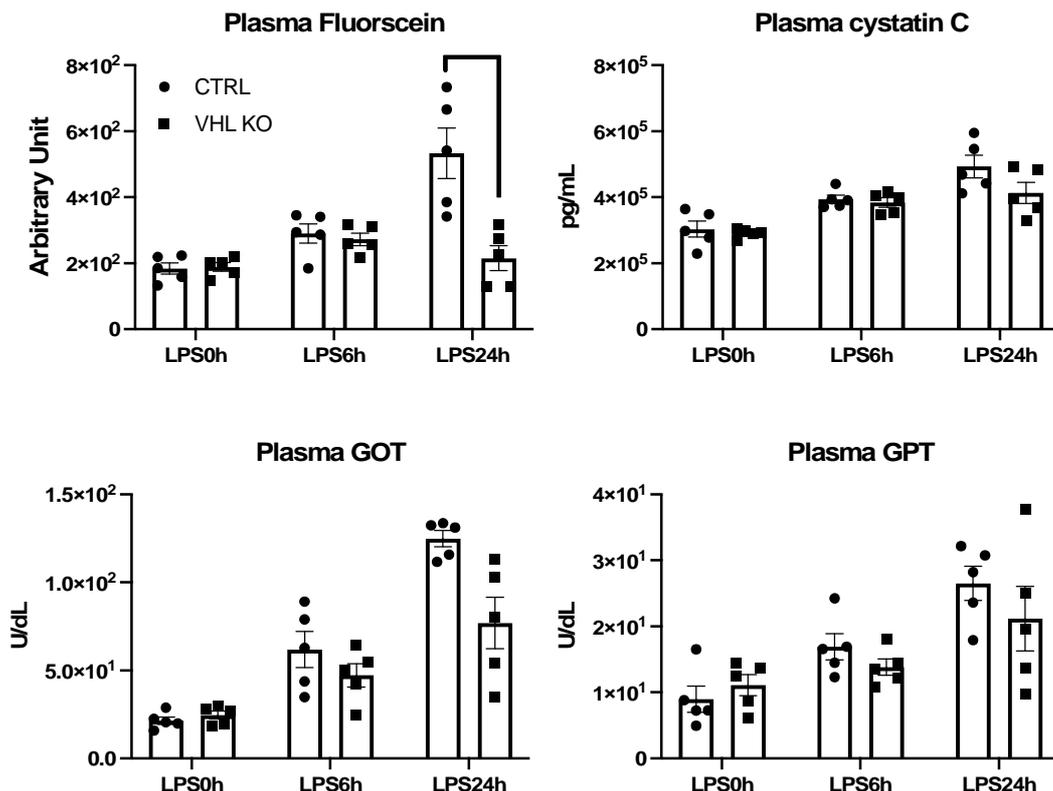


図 1. 腸管上皮細胞特異的 VHL ノックアウトが LPS 誘導性敗血症モデルにおける腸管透過性及び臓器障害マーカーに与える影響

最終的に、タモキシフェン投与 1 週間後の villin-Cre/ERT2-VHL flox/flox マウス及び同腹仔の VHL flox/flox マウスにおける LPS 誘導性敗血症の生命予後を比較したところ、villin-

Cre/ERT2-VHL flox/flox マウスの生命予後は有意に良好であった。(図2)

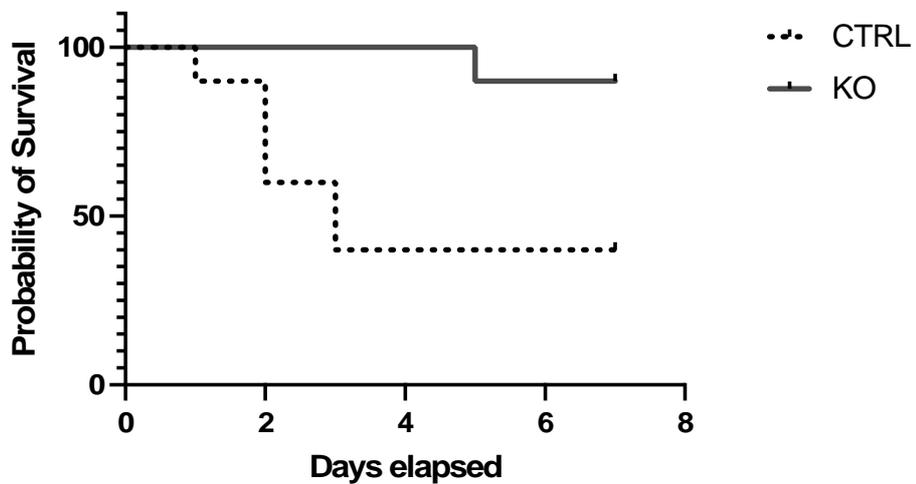


図2. 腸管上皮細胞特異的な VHL ノックアウトが LPS 誘導性敗血症モデルの生命予後に与える影響

以上の結果から、VHL を標的として腸管上皮細胞特異的に低酸素応答を誘導することは、敗血症における腸管障害の軽減を介した敗血症への新規治療のアプローチとなる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------