

令和 2 年 5 月 30 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18084

研究課題名（和文）敗血症の新たな治療薬の開発；骨格筋におけるタンパク質のファルネシル化に着眼して

研究課題名（英文）Development of the new therapeutic drug for sepsis, focusing on protein farnesylation in the skeletal muscle

研究代表者

中澤 春政（Nakazawa, Harumasa）

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号：10458888

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）：本研究は、敗血症に合併する骨格筋でのミトコンドリア機能障害に対するファルネシル化変換酵素阻害薬（FTI）の効果を検証するために行った。マウスの敗血症モデルを作成し、FTIを投与することで、マウスの生命予後が改善することを示した。また、FTIの投与は、敗血症によって惹起されたマウス腓腹筋のミトコンドリア形態異常を改善し、血清中のミトコンドリアDNAを減少させる傾向がみられた。このことより、敗血症モデルマウスにおいてFTIの投与は、ミトコンドリア形態異常を抑制し、それに伴い血清中のミトコンドリアDNAの減少させることで、全身への炎症の波及を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症は、発症率と死亡率が高く、その要因がさまざまであるため治療が困難な病態である。とくに敗血症に伴う骨格筋のミトコンドリア機能障害の合併は、患者のよごを増悪させる因子として重要である。本研究で、我々はファルネシル化変換酵素阻害薬（FTI）が、ミトコンドリア機能を完全させる可能性に注目し、敗血症モデルマウスに対するFTIの効果について検討した。その結果、FTIの投与は敗血症マウスのミトコンドリア形態異常を改善し、生命予後を向上させることが示された。本研究の結果は、今後の敗血症治療においてミトコンドリア機能をターゲットとした新しい治療法につながる可能性があり意義深いと考える。

研究成果の概要（英文）：This study is aimed to investigate the effect of farnesyltransferase inhibitor on sepsis-induced mitochondrial dysfunction/integrity in mouse skeletal muscle. Our data indicate that FTI treatment reverses sepsis-induced mitochondrial dysfunction/disintegrity in skeletal muscle, and tends to decrease circulating-mitochondrial DNA in plasma. As the result, FTI improved a mortality of sepsis model mouse. These data highlight FTI as a potential new strategy to prevent mitochondrial damage and metabolic dysfunction in sepsis patients.

研究分野：ミトコンドリア機能障害

キーワード：敗血症 ミトコンドリア機能障害 ファルネシル化変換酵素阻害薬 ミトコンドリアDNA

1. 研究開始当初の背景

敗血症は発症率が高く、また死亡率が高い病態である。Angus らの報告では米国では人口 1000 人当たり 3.0 人の重症敗血症患者が発生し、その死亡率は 28.6%であったと報告している (Angus DC. et al, Crit Care Med. 2001)。しかし、敗血症は原因疾患や病態も多岐にわたるため効果的な治療薬が存在しない。近年、敗血症患者において HMG-CoA 還元酵素阻害薬であるスタチンの投与が予後を改善するとの報告があり注目されているが、コホート研究ではその有効性が認められるものの、無作為化比較試験ではほとんどで死亡率の改善は認められていない。敗血症におけるスタチンの効果は抗炎症作用、抗酸化作用、免疫修飾作用、抗アポトーシス作用、肝ミトコンドリア機能不全の改善といったコレステロール異化作用以外の多面的作用が報告されているが、その作用機序はメバロン酸の下流にあるファルネシルピロリン酸を介した低分子 G タンパク質のファルネシル化が重要な役割を担っていると考えられる (図 1)。ファルネシル化とは蛋白質の脂質修飾のひとつで、C 末端にコンセンサス配列 CAAX motif (C;システイン、A;脂肪族アミノ酸)を持つ蛋白質のシステイン残基に、ファルネシル基が結合する反応である。ファルネシル化は FTase (Farnesyltransferase) という酵素によって誘導されるため、FTase の阻害薬である FTI (Farnesyltransferase inhibitor) の敗血症患者

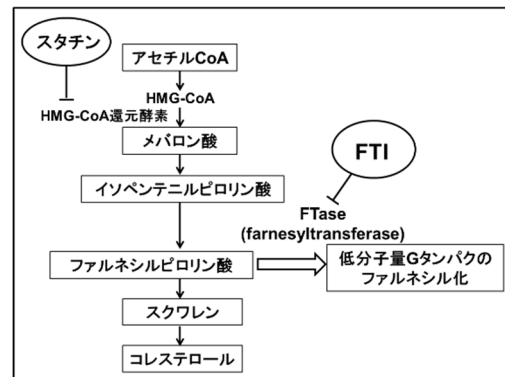


図 1. コレステロールの合成経路と FTI

者への投与はスタチンと類似の予後改善効果が期待でき、さらにはコレステロールの合成経路に影響を与えないためスタチンよりも有害事象を減少させることが期待できる。敗血症における FTI の効果に関する報告は過去にほとんどなく、本研究は敗血症治療におけるまったく新しい治療薬の開発という面で意義深いと考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、敗血症によって惹起された骨格筋のミトコンドリア機能障害発生のメカニズムを探求し、それに対する FTI の効果を検証することである。

申請者はこれまでに、熱傷マウスモデルにおける FTI の作用に関する研究に従事しており、熱傷が骨格筋のインスリン抵抗性や全身性の炎症反応、高乳酸血症を引き起こし、また FTI の投与がそれらを抑制することを示した (Nakazawa H. et al, PlosOne. 2015)。またその後の研究において熱傷によって誘導された骨格筋のミトコンドリア機能障害が FTI の投与によって改善することを発見した。骨格筋は最大重量の臓器であり、その中でエネルギー産生の中樞を担うミトコンドリア機能異常が患者の予後を左右することは想像に難くない。実際、多くの臨床研究においても、重症患者のミトコンドリア機能障害は患者の予後を悪化させる重要な因子であると報告されている。そのため、敗血症においても、骨格筋にでのミトコンドリア機能障害は患者の予後を左右する重大な合併症であり、FTI の投与によりそれらの合併症の予防が可能となれば、

今後の敗血症患者の短期及び長期予後を改善する可能性が高い。本研究の目的は、敗血症によって惹起されるマウス骨格筋のミトコンドリア機能障害におけるタンパク質のファルネシル化の関与と、それらに対する FTI の効果、作用機序を明らかにして、敗血症に対する新しい治療薬を開発する事である。

3 . 研究の方法

1) マウスの敗血症モデルの作成

本研究においてマウスは CD1 (生後 8 週、雄) を使用し、敗血症モデルとして CLP モデルを用いた。CLP 施行後、マウスの体重変化、摂食量、死亡率を測定し、CLP 施行 1 週間後の死亡率が約 25 ~ 30% となるようなモデルを作成した。

2) 敗血症モデルマウスの生存率

CLP モデルマウスに対して、5mg/kg の FTI (FTI 群) もしくは生理食塩水 (コントロール群) を CLP 後 2 時間から 3 日間、皮下注射する。両群での生存率を比較した。

3) 敗血症モデルマウスにおける骨格筋ミトコンドリアの形態評価

CLP を施行したマウスとシャム手術を行ったマウスに 5mg/kg の FTI、もしくは生理食塩水を 3 日間連続で投与し、CLP (もしくはシャム手術) 施行 3 日後に腓腹筋を採取し、腓腹筋内のミトコンドリア形態を電子顕微鏡を用いて評価した。シャム + 生食、シャム + FTI、CLP + 生食、CLP + FTI の 4 群で、ミトコンドリアの大きさや、Cristae 構造を比較した。

4) Circulating ミトコンドリア DNA の測定

シャム + 生食、シャム + FTI、CLP + FTI の 3 群のマウスに対して、CLP (もしくはシャム手術) 施行 3 日後に血清を採取し、血清中の DNA を市販のキット (Qiagen、DNA 抽出 kit) を用いて抽出した。抽出した DNA から、ミトコンドリア DNA を塩基配列をターゲットとしたプライマーを用いて PCR 法にて増幅し、血清中のミトコンドリア DNA 量を 3 群間で比較した。

4 . 研究成果

図 2 に示すように、FTI の投与は有意に CLP モデルマウスの生存率を改善させた。電子顕微鏡による腓腹筋のミトコンドリア形態の観察では、CLP モデルマウスにおいて、巨大化し Cristae 構造が欠損したミトコンドリアが多く観察された (図 3)。また、それらのミトコンドリア形態異常は FTI の投与によって抑制されていることが示された。更に、シャム手術を行ったマウスに FTI を投与してもミトコンドリア形態に明らかな変化は認めず、敗血症刺激を受けていないマウスへの FTI 投与はミトコンドリアへの影響が少ない可能性が示された。

血清中のミトコンドリア DNA は、DAMPs (Damage associated molecular patterns) として働き、局所の炎症を全身へ波及させることが報告されている。我々は、敗血症モデルマウスの腓腹筋でのミトコンドリア形態異常により、ミトコンドリア DNA の細胞内から血中への漏出が増加し全身の炎症を増悪させる可能性があるのではないかと考え、血中のミトコンドリア DNA 量を測定した。CLP 刺激によって血中ミトコンドリア DNA が増加し、FTI の投与によってその増加が

抑制される傾向を認めた。

本研究において、敗血症モデルマウスに対する FTI の投与は、敗血症によって惹起されたミトコンドリア形態異常を抑制し、生存率を向上させる可能性が示された。本研究の結果は、今後の敗血症治療における新たな治療薬としての FTI の効果をしめす重要な基礎的データとなると考える。しかしながら、FTI がどのようなメカニズムでミトコンドリア形態変化を抑制しているのかに関しては、まだ未知の部分であり今後の継続的な研究が必要である。

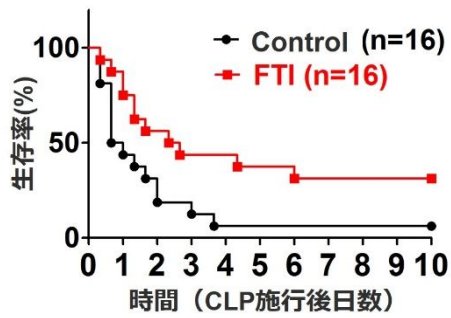


図2. CLPモデルマウスの生存曲線

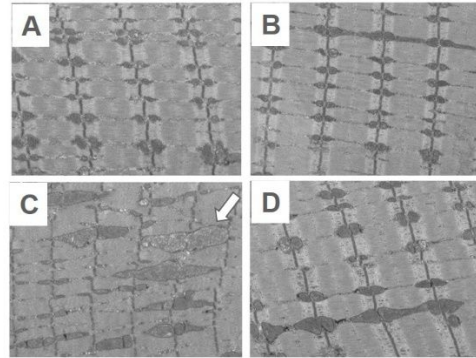


図3. 腓腹筋の電子顕微鏡画像 (2,500 ×)
A: シヤム+生食、B: シヤム+FTI、C: CLP+生食、D: CLP+FTI
CLPにより、巨大化し内部に空洞を伴ったミトコンドリアが観察される (C: 矢印)。FTIの投与によりミトコンドリアの形態変化が抑制されている (D)

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 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakazawa Harumasa, Ikeda Kazuhiro, Shinozaki Shohei, Yasuhara Shingo, Yu Yong-Ming, Martyn J.A. Jeevendra, Tompkins Ronald G., Yoroza Tomoko, Inoue Satoshi, Kaneki Masao	4. 巻 9
2. 論文標題 Coenzyme Q10 protects against burn-induced mitochondrial dysfunction and impaired insulin signaling in mouse skeletal muscle	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 348 ~ 363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12580	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 Nakazawa Harumasa, Ikeda Kazuhiro, Shinozaki Shohei, Kobayashi Masayuki, Ikegami Yuichi, Fu Ming, Nakamura Tomoyuki, Yasuhara Shingo, Yu Yong-Ming, Martyn J. A. Jeevendra, Tompkins Ronald G., Shimokado Kentaro, Yoroza Tomoko, Ito Hideki, Inoue Satoshi, Kaneki Masao	4. 巻 7
2. 論文標題 Burn-induced muscle metabolic derangements and mitochondrial dysfunction are associated with activation of HIF-1 and mTORC1: Role of protein farnesylation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-07011-3	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 中澤春政	4. 巻 3
2. 論文標題 重症敗血症治療の新たな可能性：偽性低酸素血症とミトコンドリア機能障害の改善を目指して	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床麻酔	6. 最初と最後の頁 471-477
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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中澤春政
2. 発表標題 敗血症に伴う骨格筋ミトコンドリア機能障害に対するファルネシル化変換酵素阻害薬の効果とメカニズムの解明
3. 学会等名 第47回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2019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
研究協力者	辻 大介 (Tsuji Daisuke)		
研究協力者	岡田 智香子 (Okada Chikako)		