

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19390405

研究課題名（和文）敗血症病態における転写因子群の機能解析と遺伝子治療の確立

研究課題名（英文）Role of Transcriptional factors and Gene Therapy in Sepsis

研究代表者

松田 直之 (MATSUDA NAOYUKI)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：50332466

研究成果の概要（和文）：「敗血症病態における転写因子群の機能解析と遺伝子治療の確立」として、盲腸結紮穿孔を施した敗血症マウスを用いて、転写因子 NF- κ B, AP-1 および CRE の転写活性が時系列で様々な臓器で上昇することをゲルシフト法で確認した。このような転写因子活性に対してデコイ核酸を遺伝子導入し、活性を抑制した結果、NF- κ B は肺、血管系などでケモカインや接着分子などの炎症性分子を、AP-1 は外因性アポトーシス誘導シグナルの転写亢進に関与することが確認され、特に AP-1 活性の抑制により敗血症死亡率が低下することを確認した。しかし、CRE デコイ核酸は、上記の炎症性分子やアポトーシス関連分子の転写に強く関係せず、敗血症マウスの生存率を改善させなかった。

研究成果の概要（英文）：This study was performed in order to analyze the function of transcription factors and the gene therapy in the pathogenesis of sepsis. Transcription factor NF- κ B, AP-1 and CRE increased the activity in various major organs of septic mouse with cecal ligation and puncture. Gene therapy using decoy oligonucleotides of the transcription factors inhibited the activity in septic mice. NF- κ B induced inflammatory molecules such as chemokines and adhesion molecules in septic major organs. On the other side, AP-1 was found to be involved in increased transcription of extrinsic apoptotic signaling molecules including death receptors. Decreased AP-1 activity significantly improved survival of septic mice. However, CRE decoy oligonucleotides did not strongly linked to the transcription of inflammatory molecules and apoptosis-related molecules.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2008年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔科学

キーワード：敗血症, 転写因子, nuclear factor κ B, Activator protein 1, cyclic AMP responsive element, 遺伝子治療, Death 受容体, アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

敗血症は感染症による全身性炎症症候群であり、周術期や集中治療室に高い死亡率を示す病態である。この敗血症病態では過剰に産生された炎症性サイトカインが血中に放出されることにより、ショックや多臓器炎症を合併しやすいことが、さまざまな研究で示されてきた。一方、全身性炎症症候群では主要臓器の炎症性受容体の発現が変化することも知られてきており、私が担当した基盤研究C（平成15-16年度）課題番号15591614や基盤研究C（平成17年-18年度）課題番号17591606においても、これを証明する新たな結果が得られた。基盤研究C（平成17年-18年度）課題番号17591606では、セルレインによる急性膵炎マウスモデルを作成し、グラム陰性菌のリポポリサッカライド（lipopolysaccharide : LPS）の静脈内投与による2次刺激で肺における炎症反応が相乗的に増強することを、炎症性受容体Toll-like受容体4の発現調節の観点から解明した（Matsuda N, et al. Role of MIF in acute lung injury in mice with acute pancreatitis complicated by endotoxemia. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 35:198-205, 2006.）。このように、急性膵炎などの全身性炎症反応症候群ではさまざまな炎症性受容体の発現が増加し、敗血症の合併により、相乗的に炎症やアポトーシスが主要臓器で高まる可能性を見出している。

敗血症では多くの炎症性物質が過剰産生され炎症の進展に関与するため、多くの研究が、その個々の炎症物質を治療のターゲットとしてきた。しかし、敗血症病態では転写因子nuclear factor- κ B (NF- κ B)の活性に依存するだけでも、さまざまな炎症性物質の転写が亢進され、過剰産生される（Matsuda N, et al. Nuclear Factor- κ B decoy oligonucleotides prevent acute lung injury in mice with cecal ligation and puncture-induced sepsis. *Mol Pharmacol*, 67:1018-25, 2005. など）。このように、敗血症病態の個々の炎症物質を転写制御する転写因子活性に介入する治療こそが、敗血症病態の治療に有効となる可能性がある。

研究開始に際して、私は敗血症動物モデルの肺をはじめとするさまざまな臓器で転写領域 activator protein-1 (AP-1) と NF- κ B の活性化が生じることを確認した。また、細胞質内で Fos や Jun と結合することにより AP-1 活性を抑制する効果的な AP-1 デコイ核酸（おとり核酸）の配列を同定し、生存率を高める可能性を確認した。この AP-1 デコイ核酸を用いた AP-1 活性の抑制により敗血症マウスモデルの死亡率は低下する可能性があり、炎症性メディエータやアポトーシス誘

導因子の転写が制御される可能性をつかんだ。

一方、AP-1 結合領域（5'-TGAGTCA-3'）と類似する領域構造を持つ cyclic AMP responsive element (CRE)（5'-TGACGTCA-3'）の活性は敗血症病態の初期で上昇し、アポトーシスの抑制に働く Bcl-2 などを高発現させる可能性がある。

このような転写領域の活性上昇が、敗血症病態における生存率や、組織の炎症と再生にどのような影響を与えるかについての検討は、非常に重要な意義があるものの、未だ、国内外での詳細な研究を認めない。

以上より、本研究では敗血症病態における転写因子活性の変化を検討し、その活性制御の研究を行うことにより、新たな治療指針を提案することが必要と考えた。

2. 研究の目的

敗血症マウスモデル動物を用いて、転写領域 NF- κ B, AP-1, CRE の活性の敗血症病態に及ぼす影響を検討することを目的とした。本研究では、転写因子 NF- κ B, AP-1, CRE の活性を抑制するデコイ核酸を *in vivo* で遺伝子導入し、主要臓器や血管内皮細胞の炎症と再生の組織化学的变化を評価する。摘出した主要臓器では、さまざまな炎症性受容体やアダプター蛋白、アポトーシス関連受容体などの mRNA や蛋白発現解析を行うとともに、これらの転写因子の活性に伴い発現亢進する炎症性蛋白を同定する。また、これらのおとり核酸の遺伝子導入が、*in vivo* で効率よく行われるための方法をあわせて検討する。

3. 研究の方法

1) 敗血症動物の作成

研究動物には雄性 Balb-C マウス（8-12週、体重 25-35 g）を用いる。敗血症モデル動物として、マウスの盲腸を結紮穿孔する。対照群、敗血症 6 時間群、敗血症 10 時間群および敗血症 24 時間を研究対象とし、以下の遺伝子治療効果を評価する。

2) AP-1 デコイ核酸、CRE デコイ核酸および NF- κ B デコイ核酸の作成

DNA 上の AP-1 領域および CRE 領域に類似した配列をもち、AP-1 と CRE の転写活性を競合的に阻害するデコイ核酸（おとり核酸）を作成する。塩基配列は以下とし、北海道システムサイエンス(株)に HPLC 精製での作成を依頼し、アニーリングさせた 2 本鎖を購入し、研究に用いる。

AP-1 デコイ核酸 : 5' -GGA TCC ATG ACT CAG AAG ACG ACA CAC GTC TTC TGA GTC AT-3'

AP-1 スクランブル核酸 : 5' -GGA TCC ATC GAG

AAG AAG ACG ACA CAC GTC TTC TGA GTC AT
 CRE デコイ核酸：5'-TGA CGT CAT GAC GTC ATG
 ACG TCA-3'
 CRE スクランブル核酸：5'-TGT GGT CAT GTG
 GTC ATG TGG TCA-3'.
 NF-kB デコイ核酸：5'-CCT TGA AGG GAT TTC CCT
 CC-3'
 NF-kB スクランブル核酸：5'-TTG CCG TAC CTG
 ACT TAG CC-3'

3) デコイ核酸の導入方法と導入効率と臓器消失半減期の評価

FITC ラベルを施したデコイ核酸を用い、肺、心筋、肝臓、腎臓、脾臓および大動脈における導入効率と臓器消失半減期を評価する。また、デコイ核酸の投与量を 10 μ g, 50 μ g, 100 μ g, 300 μ g に設定した場合の主要臓器における AP-1 活性と CRE 活性の低下を時系列で評価する。

4) 主要臓器における AP-1 活性, CRE 活性および NF-kB 活性の測定

肺、心房筋、肝臓、腎臓、脾臓および大動脈より抽出した核蛋白を用いて、それらの AP-1 活性と CRE 活性をゲルシフトアッセイで評価する。AP-1 活性と CRE 活性測定に用いるプローブの塩基配列は以下である。

AP-1 ゲルシフトアッセイ用プローブ：
 5'-TGAGTCA-3'

CRE ゲルシフトアッセイ用プローブ：
 5'-TGACGTCA-3'

5) AP-1 デコイ核酸あるいは CRE デコイ核酸の投与による敗血症マウスの生存率の検討

4. 研究成果

盲腸結紮穿孔を施した敗血症マウスにおいて、転写因子 NF-kB, AP-1 および CRE の転写活性が時系列で様々な臓器で上昇することをゲルシフト法で確認された。CLP マウスの NF-kB 活性は、肺、心房筋、脾臓、大動脈、大腿筋で約 10 時間後と 15 時間後の 2 相性にピークを示し、AP-1 活性は 15-24 時間後をピークとし、CRE は 3 時間レベルの短時間で活性のピークを示した。このような転写因子活性に対してデコイ核酸を静脈内投与で遺伝子導入し、転写因子活性を抑制できる最適の条件は、導入方法が liposome 法でも vector 法であろうとも敗血症を盲腸結紮穿孔で生じさせる前ではなく、CLP 作成後 10 時間レベルが最適であるとわかった。このようなデコイ核酸を用いた転写因子抑制の結果、NF-kB は炎症性サイトカイン、ケモカイン、接着分子などの炎症誘導分子を、AP-1 は外因性アポトーシス誘導シグナルの発現亢進に関与することが確認できた。しかし、CRE デコイ核

酸は、上記の炎症性分子やアポトーシス関連分子の転写に強く関係せず、敗血症マウスの生存率を改善させなかった。

このような本研究の過程で論文公表した Crit Care Med 2009;37:2791-27991 では、敗血症に合併する耐糖能異常に NF-kB 活性が関与し、NF-kB デコイ核酸の筋肉内投与により、インスリン抵抗性が改善することを報告したものである。敗血症病態のインスリン抵抗性に筋肉の NF-kB 活性が関与することを明らかとした。

次に、J Pharmacol Exp Ther 2010;109:1635-1643 では、脾臓の NF-kB 活性の基礎値は他の臓器より高いことに注目し、この NF-kB 活性によりヒスタミン H4 受容体 (HR-4) の転写が多臓器より高く保たれ、一方で HR-4 により NF-kB 活性の上限が規定されることを示した。脾臓の NF-kB 活性は、他の臓器と異なる傾向を示し、これは主にリンパ球系の特徴であると評価された。

一方、Am J Physiol Heart Circ Physiol 2010;298:92-101 では、敗血症病態の大動脈において Death 受容体の転写が高まり、外因系アポトーシスが進行することを明らかとした。このような Death 受容体の細胞膜発現の亢進には敗血症病態で活性化する AP-1 活性が関与することが肺で明らかで (図 1)、AP-1 デコイ核酸の投与により敗血症肺の caspase8 および caspase3 の活性化が抑制され (図 2)、敗血症マウスの肺のアポトーシスが抑制され、マウスの生存率が増加した。

以上のように、敗血症病態では様々な炎症性分子が病態進行に寄与するが、本研究ではその根底に転写因子 NF-kB および AP-1 が強く関与することが確認された。

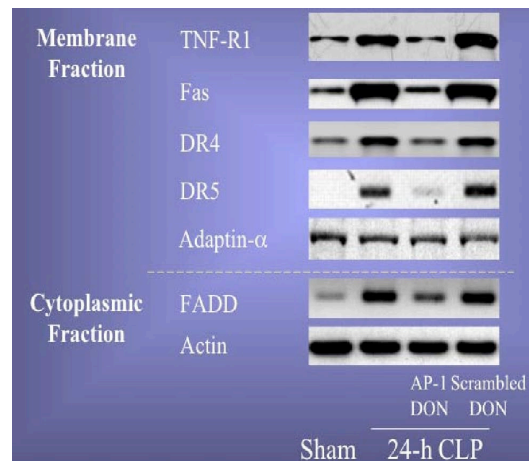


図 1 敗血症マウスで発現亢進する Death 受容体群に対する AP-1 デコイ核酸の抑制効果 (Western blot 解析結果)

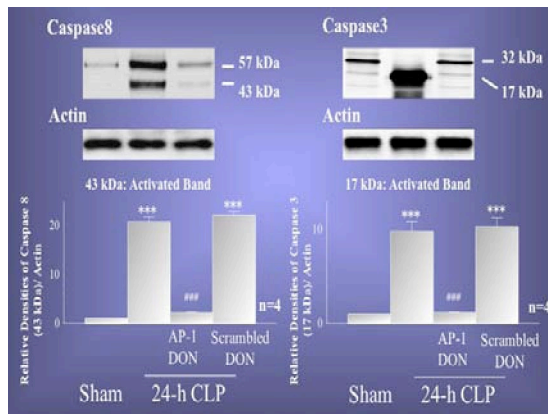


図2 敗血症マウスで活性化する caspase8 および caspase3 に対する AP-1 デコイ核酸の抑制効果

(Western blot 解析結果)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1) Matsuda N, Teramae H, Yamamoto S, Takano KI, Takano Y, Hattori Y. Increased death receptor pathway of apoptotic signaling in septic mouse aorta: effect of systemic delivery of FADD siRNA. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;298:92-101. 査読有

2) Matsuda N, Teramae H, Futatsugi M, Takano KI, Yamamoto S, Tomita K, Suzuki T, Yokoo H, Koike K, Hattori Y. Regulation of histamine H4 receptors contributes to splenic apoptosis in septic mice: counteraction of the anti-apoptotic action of nuclear factor- κ B. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;109:1635-1643. 査読有

3) 松田直之, 山本誠士, 寺前洋生, 高野健一, 別府賢, 山崎弘美, 横尾宏毅, 畠山登, 小池薫, 服部裕一. 敗血症性ショックにおけるアポトーシスの治療. *日本薬理学会誌* 2010;134:198-201. 査読無

4) Matsuda N, Yamamoto S, Yokoo H, Tobe K, Hattori Y. Nuclear factor- κ B decoy oligodeoxynucleotides ameliorate impaired glucose tolerance and insulin resistance in mice with cecal ligation and puncture-induced sepsis. *Crit Care Med* 2009;37:2791-2799. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

1) Matsuda N, Hattori Y, Yamamoto S, Teramae H, Koike K. Inhaled TAK1 siRNA improves lung inflammation and apoptosis by reducing transcriptional activity of NF- κ B and AP-1 in septic mice.

Society of Critical Care Medicine 39th Critical Care Congress, Jan 9-13, 2010, Miami

2) Matsuda N, Hattori Y, Yamamoto S, Yamazaki H, Koike K. Impact of transcription factor decoy to AP-1 on the Lung apoptosis of septic mice.

Society of critical Care Medicine 38th Critical Care Congress, Jan 31-Feb 4, 2009, Nashville

3) 松田直之. 教育講演「敗血症病態における血管内皮細胞の炎症と再生」. 第 36 回日本集中治療医学会学術集会 2009 年 2 月 26-28 大阪

4) 松田直之, 寺前洋生, 別府賢, 二木元典, 鈴木崇生, 小池薫. 一般演題「敗血症性急性肺損傷における転写因子 AP-1 の役割に関する動物研究」. 第 37 回日本救急医学会総会・学術集会 2009 年 10 月 29-31 岩手

5) 松田直之. 教育講演「周術期全身炎症反応の分子生物学的メカニズム」. 日本臨床麻酔学会 第 28 回大会 2008 年 11 月 20-22 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 直之 (MATSUDA NAOYUKI)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号 : 50332466