

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：19K18320

研究課題名（和文）敗血症時に亢進する血管透過性における個人差の原因となる遺伝子を同定する。

研究課題名（英文）Identifying the genes responsible for individual differences in increased vascular permeability during sepsis.

研究代表者

瀬尾 英哉（Seo, Hideya）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：40782652

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：当初の研究計画での実験系の安定性の問題から、研究対象を敗血症による血管透過性から敗血症によるICU-AWへと変更した。ICU-AWにおける主病態である筋特異的UPS（Ubiquitin-Proteasome System）の活性化に着目し、UPS低活性化群と高活性化群での発現遺伝子を比較することで個人差の原因となり得る遺伝子を特定した。さらに、Pathway解析で病勢を左右する病態を絞り込み、予後増悪メカニズムを示すと同時に予防法や治療法の開発につながる貴重なデータを得た。本研究では、敗血症時の個人差を探索することで原因メカニズムの同定が可能であるというコンセプトを示すことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ICU-AWの病態の詳細は未だ不明であり、効果的な治療や予防法がないことから、現代の集中治療が解決すべき大きな課題であった。本研究はICU-AW研究を加速させる基礎データを提供することに成功した。また、これまでの研究は個体によるばらつきが少なくなる条件に限定して実験を行っていた。この“ばらつき”にこそ病態を解明するうえでの重要な情報が隠されており、病勢の個体差利用した本研究では病態野探索のみならず、臨床的に介入可能な予防法、治療法を提示できることを示した。本研究手法は停滞する敗血症研究にとってブレイクスルーとなるであろう。

研究成果の概要（英文）：Due to the instability of the experimental system, the initial plan was modified, and the research focus was changed from vascular permeability caused by sepsis to ICU-acquired weakness (ICU-AW) caused by sepsis. With a focus on the activation of the muscle-specific Ubiquitin-Proteasome System (UPS), a primary pathology in ICU-AW, we identified genes that could be responsible for individual differences by comparing the expression of genes between UPS low-activation and high-activation groups. Furthermore, through pathway analysis, we narrowed down the pathological factors influencing disease progression, while simultaneously obtaining valuable data that could contribute to the development of preventive and therapeutic measures by elucidating mechanisms exacerbating prognosis. This study successfully demonstrates the concept that identification of causal mechanisms is feasible through exploring individual differences during sepsis.

研究分野：集中治療

キーワード：ICU-AW 遮断薬 敗血症 血管透過性

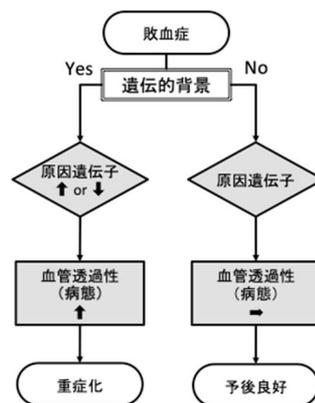
1. 研究開始当初の背景

敗血症の致死率は依然約 30%と非常に高く、特に高齢化の進む現代社会においてその予後の改善はこれからの医療が取り組むべき重大な課題である。しかしながら敗血症は患者背景と様々な環境因子が複雑に交絡して発症することから、生命学的予後に影響を与える病態の全貌解明は困難を極め、根治的治療法の確立にも至っていないのが現状である。

一方で、敗血症は感染に続発する全身性炎症反応とそれに伴う血管透過性の亢進が病因の 1 つとして挙げられている。血管透過性は種々の刺激により、血管内皮細胞の接着分子や細胞間隙の形成に関与するタイトジャンクション (VE cadherin) の変化や内皮細胞上のグリコカリクスの剥離により亢進し、組織還流異常による多臓器不全だけでなく Acute respiratory distress syndrome の原因となり、敗血症患者の短期的予後を悪化させるとされる。近年、ゲノムワイド研究によって、敗血症患者の転機に影響を与える 1 塩基多型等の遺伝的背景を明らかにすることが可能となった。しかし、遺伝的背景と病態との因果関係を証明するためには膨大な臨床データ、実験、煩雑な統計学的手法が必要なことから、現状その臨床的有用性は限定的である。

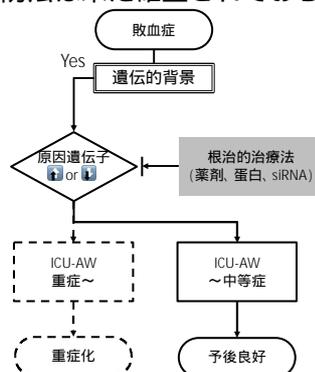
そこで我々は敗血症時に亢進する血管透過性の個人差の原因となる遺伝子群を明らかにすることで患者転機に影響を与える因子を明らかにする研究を発案した (右上図)。この原因遺伝子群をもとに Pathway 解析を行うことで、敗血症重症化メカニズムの解明や、根治的治療法開発につなげるとともに、「敗血症時における個人差を検索することで原因遺伝子の同定が可能である」とのコンセプトの証明を目指す。当初、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (以下 HUVEC) を用いた敗血症における血管透過性を実験対象としたが、安定的な定量化は困難であったため (後述) マウスを用いた敗血症における ICU-Acquired Weakness (以下 ICU-AW) を対象に変更した。

ICU-AW は集中治療を要する患者に発症する四肢のびまん性筋力低下を特徴とする症候群で、特に重症敗血症患者で発症する (*Intensive Care Med* 2000; 26: 1360-1363.)。その発症は長期的生命予後のみならず (*Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178: 261-268.)、人工呼吸管理の遷延 (*Intensive Care Med* 2004; 30: 1117-1121.)、ICU 滞在や在院日数の延長および長期にわたる QOL の低下 (*Crit Care Med* 2003; 31: 1012-1016.) と強く関連することが知られる。生化学的に ICU-AW は骨格筋の消耗と衰弱で骨格筋細胞における過剰な全身性炎症反応をトリガーとした筋特異的ユビキチンリガーゼである Muscle Ring Finger1 (以下 MuRF-1) と Atrogin1 を介した ATP 依存性ユビキチン・プロテアソーム系 (ubiquitin-proteasome system: 以下 UPS) の活性化に起因するミオシンタンパクの分解 (*Science*. 2001; 294: 1704-1708.) と説明されるが、その発症メカニズムや病態は不明で、効果的な治療法および予防法は未だ確立されておらず近年関心が高まっている未解決の課題である。

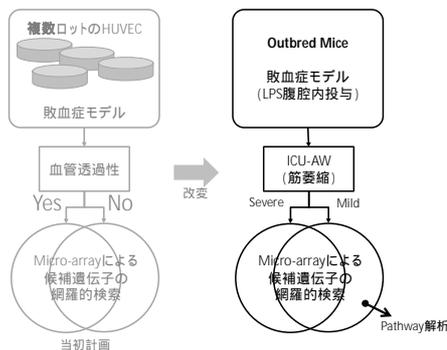


2. 研究の目的

本研究の目的は、個体差に基づく敗血症時の遺伝子 (mRNA) 発現を網羅的に測定、敗血症予後を増悪させる原因遺伝子群を明らかにすることで、「敗血症時における個人差の原因遺伝子の同定が可能」とのコンセプトを証明するとともに、未知なる ICU-AW の発症機序の一端を解明し、その治療法や予防法の開発にとって重要な基礎データを得ることにある。(右図)



3. 研究の方法

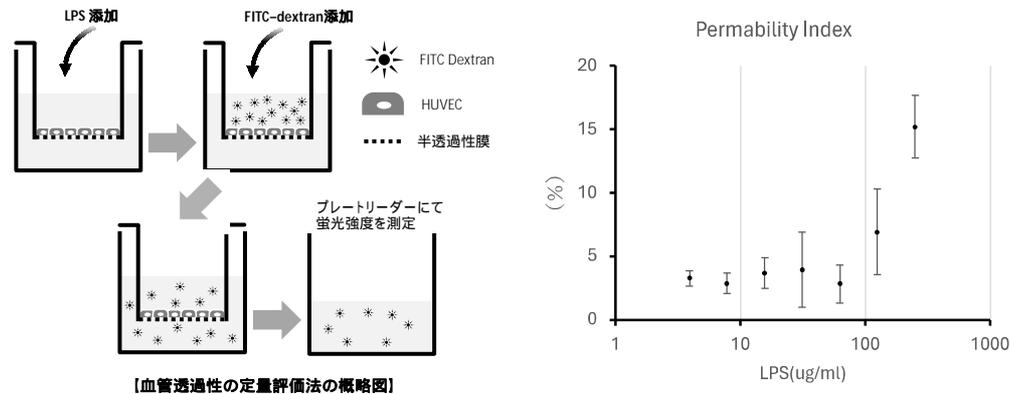


当初の予定した計画 (左図左) を変更し、Outbred マウス (ICR) に対し、リポポリサッカライド (以下 LPS) を腹腔内投与した敗血症モデルマウスを用い、UPS の活性化を定量化した。次いで RNA シーケンスを用いて発現遺伝子を網羅的に測定し、UPS 活性化に関連のある遺伝子群に対し Pathway 解析を行った。(左図右)

生化学手法としてはウエスタンブロッティング、PCR 法、ELISA 法、免疫染色法、RNA-seq などを用いた。

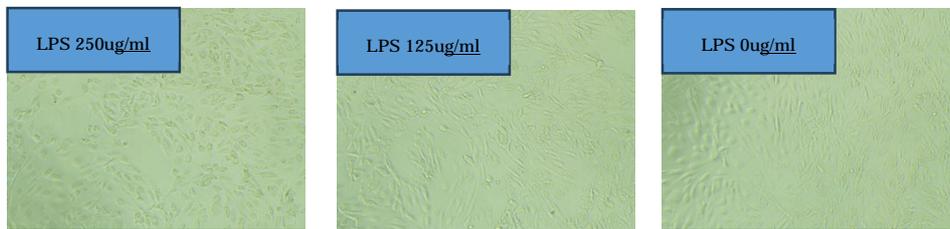
#### 4. 研究成果

##### HUVEC を用いた透過性定量評価系構築の失敗



【血管透過性の定量評価法の概略図】

トランスウェル上に単相培養した HUVEC に対し LPS、FITC-dextran を投与し、透過した FITC をプレートリーダーにて測定、permeability index として評価する実験系を構築した(上図左)。本実験系において、高濃度 LPS (250ug/ml) において index の上昇を認めた(上図右)。

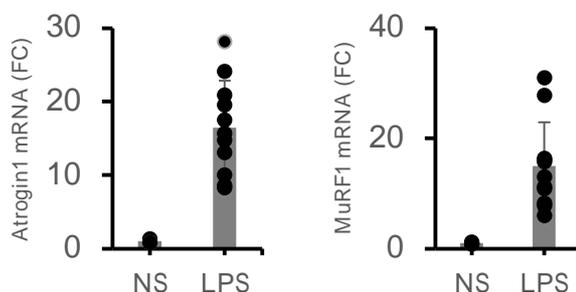


次いで 96well dish 上に HUVEC を単相培養し種々の濃度で LPS を添加した後、光学顕微鏡にて観察した。LPS125ug/ml 以上では細胞層が培養皿より剥離し、細胞死によるものと考えられた(上図)。

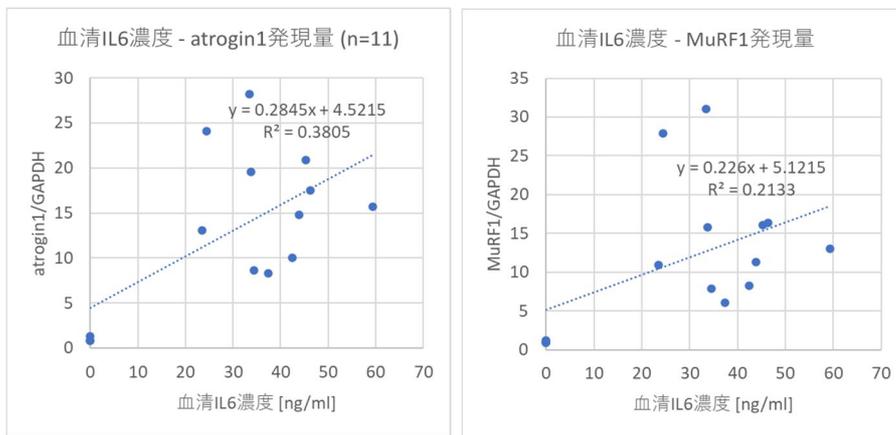
#### 考察

HUVEC を単層培養し LPS を添加した後、細胞層を透過する FITC-Dextran の蛍光強度を血管透過性として定量化、さらに複数ドナー由来の HUVEC 間での透過性の動態を比較することで個体差を再現する実験系の樹立を試みた。しかし、本実験系において蛍光強度の差を検出するには LPS125ug/ml を要し、この濃度は臨床的に有意とされるエンドトキシン濃度 (pg/ml オーダー) と比して遥かに高い濃度であった。加えて当該 LPS 濃度を添加した群で HUVEC は培養皿底面より剥離し、細胞死が誘導されることが確認された。つまり、本実験系において定量化される透過性とは、LPS により誘導された細胞内のシグナル伝達経路や細胞外の因子の相互作用、細胞間ジャンクションやグリコカリクス等の変化ではなく、物理的に細胞が剥離することで露出したトランスウェルの底面を介したデキストランの拡散を反映していると考えられた。これらより、細胞死とならない LPS 濃度で安定的に透過性の個体差を検出する実験系の構築は困難であり、本実験系を用いて臨床的に観察される血管透過性を正確に評価することはできないとの結論に至った。そこで敗血症によって誘導される病態として対象を血管透過性から ICU-AW に変更して研究を継続した。

敗血症モデルマウスにおいて筋特異的 UPS 活性化の程度は個体差が大きく、血清 IL-6 濃度とも関連しない。



ICR、オス 11w に対して LPS5ug/g もしくは生理食塩水(以下 NS)を腹腔内投与、4 時間後に血清 IL-6 を ELISA 法にて測定、24 時間後腓腹筋を採取、qPCR により Atrogin1 と MuRF1 の mRNA 発現量を定量化した。

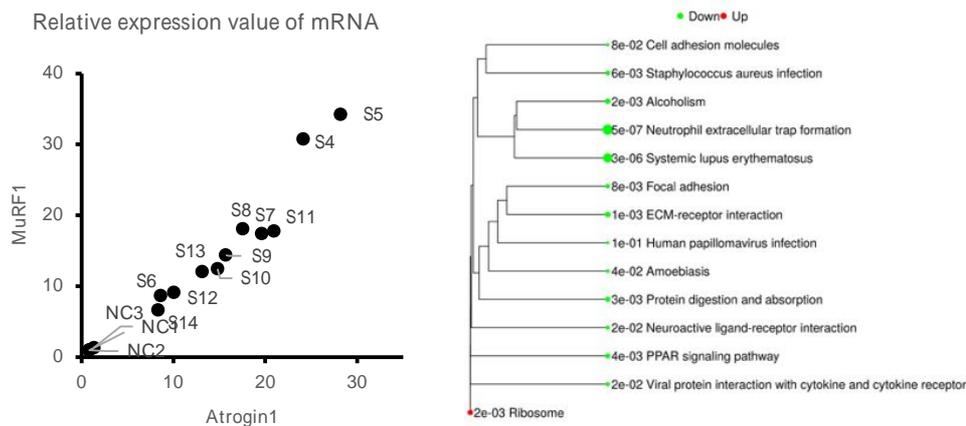


ICU-AW の病態は敗血症により惹起される筋特異的 UPS である Atrogin1 と MuRF1 の活性化に起因したミオシン蛋白の分解と理解されている。一方で、敗血症時には IL-6 が産生され、高い血清 IL-6 は予後不良因子とされる。そこで、一般的に敗血症モデルとして用いられる LPS 腹腔内投与モデルにおいて筋特異的 UPS の発現量を定量化し、血清 IL-6 との相関を調べた。

結果、本敗血症モデルにおいても筋特異的 UPS の活性化が誘導されることがわかった。同時に、筋特異的 UPS 活性化の程度には個体差が大きかった。先の in Vitro 研究において IL-6 は筋特異的 UPS 活性化の一因であったが、in Vivo の本実験系においては IL-6 と UPS の活性化には相関を認めなかった。生体においては IL-6 以外に UPS を活性化する何らかの機序の存在が示唆された。

#### 筋特異的 UPS 高発現群に比して低発現群で複数の Pathway が抑制されていた。

臨床的に介入可能で有用な筋特異的 UPS の制御メカニズムの詳細は明らかにされていない。前述の実験結果において、サンプルを筋特異的 UPS 高発現群 (S5, S4, S11) と低発現群 (S14, S6, S12) に分類 (下図左)、RNA sequence を用いて網羅的に mRNA 発現量を定量、Pathway 解析を行った。



ICR、オス 11w に対して LPS5ug/g もしくは生理食塩水 (以下 NS) を腹腔内投与、24 時間後に e 腓腹筋を採取、RNA sequence にて網羅的測定、iDEP2.0 にて Pathway 解析を行った。  
(<http://bioinformatics.sdstate.edu/idep/>)

| Direction | GSEA analysis: LG vs HG Pathways        | NES     | Genes | adj.Pval |
|-----------|---|---------|-------|----------|
| Down      | Neutrophil extracellular trap formation | -0.5681 | 119   | 4.7e-07  |
|           | Systemic lupus erythematosus            | -0.6415 | 67    | 2.8e-06  |
|           | ECM-receptor interaction                | -0.5803 | 62    | 1.4e-03  |
|           | Alcoholism                              | -0.4899 | 113   | 1.7e-03  |
|           | Protein digestion and absorption        | -0.5877 | 53    | 2.5e-03  |
|           | PPAR signaling pathway                  | -0.5741 | 52    | 3.8e-03  |

|    |   |         |     |         |
|----|---|---------|-----|---------|
|    | Staphylococcus aureus infection                               | -0.6283 | 34  | 5.6e-03 |
|    | Focal adhesion  | -0.4082 | 171 | 8.1e-03 |
|    | Viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor | -0.5748 | 42  | 1.8e-02 |
|    | Neuroactive ligand-receptor interaction                       | -0.4942 | 76  | 2.2e-02 |
|    | Amoebiasis  | -0.4889 | 69  | 4.2e-02 |
|    | Cell adhesion molecules                                       | -0.4534 | 78  | 8.3e-02 |
|    | Human papillomavirus infection                                | -0.3359 | 261 | 9.5e-02 |
| Up | Ribosome  | 0.4558  | 126 | 1.7e-03 |

結果、UPS 低活性化群において、複数の Pathway が抑制されていた(上図右、上表)。これら Pathway への介入は UPS 活性化を低減する可能性が示唆された。

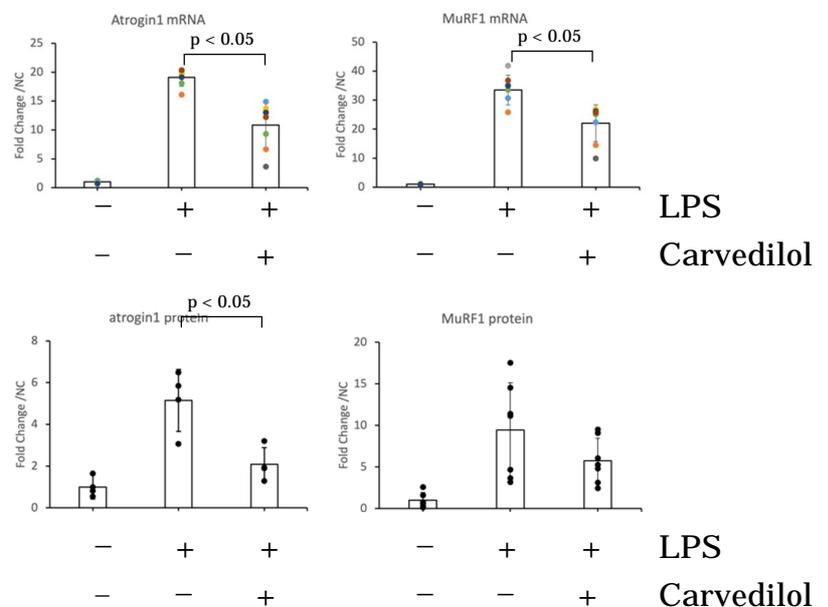
### Beta adrenergic receptor 拮抗薬である Carvedilol は筋特異的 UPS の活性化を抑制した。

我々は前述 Pathway 解析において、筋特異的 UPS 低発現群で "Neuroactive ligand-receptor interaction" が抑制されていることに着目した。近年、敗血症では過剰な アドレナリン受容体刺激 AR 刺激は免疫異常、糖代謝異常、心機能異常、血小板機能異常など様々な臓器障害を惹起する(Intensive Care Med. 2016; Vol. 42(Issue 9): 1387-97) ことが知られるようになり、敗血症治療薬としての 遮断薬の有効性についての報告も散見されている。

我々は筋肉も他臓器同様、AR によって直接的もしくは間接的に障害が惹起される臓器の1つでその表現系が ICU-AW で、遮断薬が ICU-AW に対して有効であるとの仮説を立てた。

そこで、カルベジロールもしくは生理食塩水経口投与群に対して、LPS を腹腔内投与し 24 時間後に腓腹筋を採取、qPCR もしくは WB にて筋特異的 UPS の活性化を定量化した。

結果、遮断薬である Carvedilol は筋特異的 UPS の活性化を抑制することがわかった(右図)。一方で アドレナリン受容体刺激は前述 Pathway の細胞接着 (Clin Cancer Res (2012) 18 (5): 1201-1206.) 細胞外マトリックス、ペルオキシソーム増殖剤活性化レセプターなどにも影響を与えることから、遮断薬がこれら経路を抑制している可能性は否定できない。



### 考察

我々は敗血症による ICU-AW の原因とされる筋特異的 UPS 活性化に対し、重症群と軽症群において発現する遺伝子を比較することにより、個体差の原因となる遺伝子群の絞り込みに成功した。敗血症時における個人差を検索することで原因遺伝子の同定が可能であるとのコンセプトを示すことができた。さらに Pathway 解析により病勢を左右する病態を絞り込み、プレリミナリーではあるが敗血症による予後を増悪させるメカニズムを絞り込むと同時に、予防法、治療法開発につながる貴重なデータを得ることができた。今後は、詳細なメカニズムを解明するとともに因果関係を明らかにする。さらに、遮断薬が ICU-AW に与える有効性についても検証する計画である。

これまで、個体によるばらつきが少なくなる条件に限定して実験を行っていた。この”ばらつき”にこそ病態を解明するうえでの重要な情報が隠されており、病勢の個体差利用した本研究手法は病態野探索のみならず、臨床的に介入可能な予防法、治療法を提示できることを示しており、停滞する敗血症研究にとってブレイクスルーとなるであろう。

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<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|