

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22249059

研究課題名（和文）

敗血症病態に合併する蛋白異化病態の分子生化学的解明と遺伝子治療の開発

研究課題名（英文）

Role of Autophagy and the Molecule Targeting in Sepsis

研究代表者

松田 直之 (Matsuda Naoyuki)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50332466

研究成果の概要（和文）：敗血症は、救急・集中治療の対応する重症病態として知られている。敗血症は、菌やウイルスに対する全身性炎症であるが、未だに抗菌薬以外に炎症を制御する有効な治療法が確立されていない。本研究では、敗血症モデルマウスおよびヒト血管内皮細胞培養細胞の敗血症病態の急性期において、オートファジー関連分子が増加し、特に LC3 が活性化し、オートファゴソーム形成が促進することを見出した。これらは、アミノ酸投与により抑制される程度は低く、炎症系転写因子により制御されると結論された。血管内皮細胞のオートファジーは、FADD, TAK-1, さらに NK- $\kappa$ B や AP-1 などの転写因子の活性に影響を受け、これらの抑制により、敗血症病態のオートファジーが抑制されることが確認された。

研究成果の概要（英文）：Sepsis, known as a inducer of severe multiple organ diseases, has no established effective treatment except for antibiotics. Sepsis can lead multiple organ failure due to amid acid transformation to acute phase proteins such as inflammatory cytokines. In this study, I have found that some parts of autophagy-related gene family were increased at transcriptional and translated levels in the acute terms of sepsis of cultured human vascular endothelial cells and sepsis mouse models. LC3 was activated in particular, and promoted an autophagosome formation. It was concluded that FADD, TAK-1 and transcriptional activity of NF- $\kappa$ B and AP-1 were significantly related with autophagy acceleration in the cultured human vascular endothelial cells and sepsis mouse model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	20,700,000	6,210,000	26,910,000
2011年度	11,700,000	3,510,000	15,210,000
2012年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
総計	37,500,000	11,250,000	48,750,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：敗血症，セプシス，オートファジー，蛋白異化，全身性炎症反応症候群

### 1. 研究開始当初の背景

敗血症 (sepsis, セプシス) は、1991年の米国胸部疾患学会 (American College of Chest Physicians) と米国集中治療医学会 (Society of Critical Care Medicine) の合同会議による定義に従い、本邦でも感染症

を基盤とした全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome: SIRS) と理解されるようになり、救急・集中治療領域の緊急性の高い病態として診療されている。このような敗血症病態は、炎症性サイトカイン血症および抗炎症性サ

イトカイン血症を基盤とし、多臓器不全、ショック、播種性血管内凝固症候群（disseminated intravascular coagulation: DIC）を合併しやすく、世界レベルの死亡率30%レベルで推移し、未だに治療成績が高められていない。

このような敗血症は、現在も国内外で罹患率が高い病態として知られており、Angus等の2001年の報告（Crit Care Med 2001; 29:1303-10）では米国における敗血症罹患患者数は年間75万人を超え、罹患患者数は2020年までに年間100万人、そして2050年までには年間200万人を越えると推定されている。本邦においても、2010年以降には肺炎に伴う敗血症が死因の第2位となると予測されており（日本臨牀 2004;62:2184-8）、特に55歳以上の肺炎に合併する敗血症の致死率は極めて高い（N Engl J Med 2005;353:1685-93）。このように、敗血症は罹患率とともに死亡率の高い病態であり、現在も、本邦の集中治療領域の死因の第1位は、多臓器不全を合併した重症敗血症や敗血症性ショックである。

私は、これまでの科学研究費助成により、敗血症病態の転写因子活性の制御に関する研究を遂行し、敗血症病態を解釈する理論として、警笛細胞戦略（alert cell strategy）を公表した（循環制御 2004;25:276-84など）。主要臓器の一部の基幹細胞は、転写因子活性を高めることでケモカインや接着分子などを産生し、免疫担当細胞を誘導する「炎症警笛機能」を持つ。これまでの主要臓器細胞の転写因子活性化の網羅解析では、2004年には転写因子 nuclear factor- $\kappa$ B（NF- $\kappa$ B）による炎症性分子（tumor necrosis factor- $\alpha$  や interleukin-1 $\beta$  や interleukin-6 などの炎症性サイトカイン、誘導型 NO 合成酵素、誘導型シクロオキシゲナーゼ、組織因子、plasminogen activator inhibitor-1、ICAM-1 などの接着分子、interleukin-8 などのケモカインなど）の過剰産生機構を確認し（J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004; 287: L1248-55 など）、さらに主要臓器の基幹細胞で転写因子 activator protein-1（AP-1）が警笛細胞にアポトーシス誘導分子を合成促進させることを確認した。一方、このような分子の転写活性後の蛋白合成のために、主要臓器の警笛細胞は十分なアミノ酸を必要とするものの、この入手経路は必ずしも解明されていなかった。

本研究の開始に際して、敗血症病態の細胞死について、Alert 細胞理論の観点から、オートファジーの進行を解明する必要があると評価された。

## 2. 研究の目的

本研究は、これまでに私が評価してきた敗血症モデルマウスの主要臓器研究やヒト血

管内皮細胞培養細胞系を用いて、オートファジー誘導蛋白の発現を、敗血症進行の時系列で明らかとすることを目的とした。敗血症病態におけるオートファジーの変化に対して、どのような細胞内情報伝達蛋白が影響をあたえるのかを、細胞内情報伝達蛋白の時系列変化とともに siRNA を用いた分子ノックダウンを行い評価し、さらに転写因子のデコイ核酸（おとり核酸）を導入した系で評価することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### （1）敗血症モデル動物の作成

研究動物には、これまでの研究で使用してきた雄性 Balb-C マウス（8-12週、体重25-35 g）を用い、以下の方法でマウス盲腸結紮穿孔モデルを作成し、敗血症モデル動物とした。イソフルラン麻酔下で左臍下に約5 mmの切開を行い、虫垂を膨出した後、虫垂の先端に糞便を充満させ、先端約5 mmを結紮し、23G針で2箇所穿孔を加えた。対照群は腹膜切開と虫垂先端の膨出のみを行ったものとし、虫垂を腹腔内に戻した後、皮膚切開部を縫合した。研究対象は、対照群および敗血症作成48時間までとした。また、これらの群に対して、遺伝子治療群を併設した。遺伝子導入には、主にリポゾーム法を用い、尾静脈からの静脈内投与とし、新たにリポゾームのみを静注した群を対照群とした。これまでの私の研究により、核酸の投与量を50  $\mu$ g以上とすることにより、主要臓器への導入が高まることが確認されている。

### （2）ヒト血管内皮細胞における敗血症病態の作成

ヒト肺動脈血管内皮細胞の培養系において、Tumor necrosis factor- $\alpha$ （TNF- $\alpha$ ）を100 ng/mLレベルまで投与し、血管内皮細胞における細胞内情報伝達蛋白の遺伝子変化をRT-PCR法で解析し、オートファジー現象を電子顕微鏡像で観察した。

### （3）ATG siRNA、およびLC3 siRNAの作成

上記の研究の結果を参考として、敗血症病態でオートファジーを誘導すると評価されるATGサブタイプのsiRNAを、敗血症病態マウスに導入し、オートファジー現象の抑制を評価した。オートファジー現象の抑制の評価には、電子顕微鏡像でのオートファジーの進行抑制、LC3活性のwestern blot解析に加えた。

### （4）NF- $\kappa$ Bデコイ核酸、およびAP-1デコイ核酸の作成

主要臓器で転写活性を高める転写因子

NF- $\kappa$ B およびAP-1のオートファジー現象に関する影響を評価した。

イソフルラン麻酔下で摘出した肺、腎臓および大動脈より抽出した核蛋白を用いて、それらのNF- $\kappa$ B 活性とAP-1活性をゲルシフトアッセイで評価し、これらの転写因子活性を敗血症病態で評価し、デコイ拡散で抑制されるかを合わせて評価した。

核酸による炎症増強や臓器障害を評価するために、ランダムな塩基配列を持つ同長のスクランブル核酸を新たに対照群として用いた。

#### (5) siRNAおよびデコイ核酸の遺伝子導入効率の定量的確認

オートファジー関連蛋白のsiRNAによる発現抑制や上記デコイ核酸による転写制御は、以下に記したATG遺伝子プライマーなどを用いた定量的RT-PCR法を用いて、mRNA発現として評価した。さらに、敗血症の進行過程で増加する細胞内情報伝達蛋白を、敗血症モデルマウスの肺と大動脈で同定した。

ATG1 (L, 5' - cagaactaccagcgcattga -3' ),  
(R, 5' - tccaccagagacatcttcc -3' )  
Product size: 180 base

ATG5 (L, 5' - agatggacagctgcacacac -3' ), (R,  
5' - gctgggggacaatgctaata -3' ) Product  
size: 194 base

ATG6 (L, 5' - aggttgagaaggcgagaca -3' ), (R,  
5' - aattgtgaggacaccaagc -3' ) Product  
size: 196 base

ATG7 (L, 5' - tccgttgagtccctctgctt -3' ), (R,  
5' - ccactgaggttcaccatct -3' ) Product  
size: 179 base

ATG10 (L, 5' - cagcatgaagaatccaaga -3' ),  
(R, 5' - gccctgatgacgtcagaaat -3' ) Product  
size: 218 base

ATG12 (L, 5' - cccagaccaagaagtggaaa -3' ),  
(R, 5' - cagcaccgaaatgtctctga -3' ) Product  
size: 153 base

LC3 (L, 5' - ggtgccgtagctttcttgag -3' ),  
(R, 5' - actgtgtccagtgaggagac -3' )  
Product size: 201 base

GAPDH (L, 5' - aactttggcattgtggaagg -3' ),  
(R, 5' - acacattggggtaggaaca -3' ) Product  
size: 223 base

$\beta$ -Actin (L,  
5' - agccatgtacgtagccatcc -3' ), (R,  
5' - ctctcagctgtggtggtgaa -3' ) Product  
size: 228 base

#### (6) ATG siRNA, およびLC3 siRNAの投与による敗血症生存率の検討

盲腸結紮穿孔術後10時間後にATG siRNA, を投与したマウスの生存率を, siRNAを投与しない群やcontrol scrambled siRNAを投与した群と比較した。さらに, 2)および5) の細胞内情

報伝達蛋白の解析において, 増加傾向を認められた蛋白のsiRNAの投与により, 敗血症生存率を調べ, 敗血症生存率の高まる分子に対しては, オートファジーの抑制をLC3活性で評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1)敗血症モデルマウスにおける研究結果

敗血症モデルマウスの肺では, 盲腸結紮先行による敗血症作成後の10時間と16時間レベルで2相性にNF- $\kappa$ Bの活性化が認められた。一方, 転写因子AP-1の活性化は敗血症24時間で緩徐に高まっていく傾向が認められた。このAP-1活性は, 他の臓器では, 肺より腎臓の皮質領域で高く認められた。以上より敗血症病態に合併するオートファジーの転写因子活性抑制効果については, 肺におけるNF- $\kappa$ B活性と腎におけるAP-1の活性を抑制する研究として遂行した。

電子顕微鏡によるオートファジー観察では, 肺では2型肺胞上皮細胞や血管内皮細胞にオートファゴソーム形成の増加として観察された。脳の血液脳関門領域でも毛細血管領域にオートファゴソーム形成が認められたばかりか, 大動脈血管内皮細胞をはじめ, 全身のさまざまな血管内皮細胞にオートファゴソーム形成が増加していた。

敗血症モデルマウスの肺や大動脈の解析では, ATG5とLC3のmRNAおよび蛋白発現の増加が観察でき, さらにLC3はLC3IIへの活性化を認めた。

この敗血症モデルマウスにおけるオートファジー促進は, 敗血症作成の10時間レベルで生じはじめていた。

##### (2) 培養細胞系による研究結果

ヒト血管内皮培養細胞として, 肺動脈血管内皮細胞を用いて, TNF- $\alpha$  100 ng/mL添加による炎症培地を敗血症モデル状態とした。このような細胞培養系において, さまざまな分子のうち, 特にLC3, FADD, Bcl-2, c-Jun, STAT3の転写が亢進していた(図)。

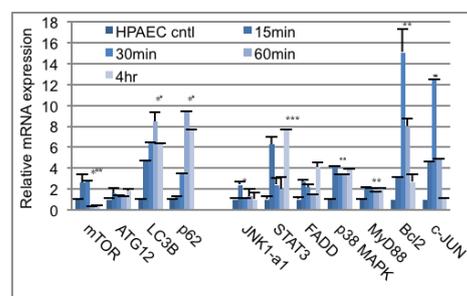


図. 肺動脈血管内皮培養細胞における TNF- $\alpha$  100 ng/mL 添加後の転写活性の変化

さらに、その他、ILAK-1, TAK-1, MAPK14 の発現が極めて高まる結果を得た。

培養細胞系においても、TNF- $\alpha$  100 ng/mL 添加後にオートファゴソーム形成が認められ、LC3 蛋白は増加するのみではなく、LC3-II に活性化することが確認された。さらに、ATG ファミリーの中では、減少傾向を示すものは認めず、LC3 に加えて、ATG1 と ATG7 が増加傾向を示し、この転写は 15-30 分で高まることが確認された。

### (3) 敗血症マウスにおける siRNA の効果

敗血症病態マウスに対する siRNA 治療は、投与量を 25 g のマウスあたり、50  $\mu$ g の投与としてリボゾーム法で施行された。特にターゲットとした分子は、上述の血管内皮細胞培養系で増加を認め、さらにマウス敗血症モデルでも様々な臓器で増加を認めたものとした。様々な siRNA は、肺や腎臓の解析では、敗血症で増加するレベルを約 30%に減少させるものであり、それらの分子の発現を完全にノックダウンできるものではなかった。

本研究のマウスは、結果として、48 時間以内に死亡するモデルとなったが、FADD siRNA と TAK-1 siRNA の著明な敗血症モデルマウスの生存率を改善する効果が認められた。これらにおいては、肺、腎臓、大動脈の LC3 発現量と活性化の両者が抑制されており、電子顕微鏡像においても敗血症病態でのオートファゴソーム形成が亢進しておらずに、正常化していた。

一方、NF- $\kappa$ B デコイ核酸は、敗血症モデルマウスの肺、動脈などの NF- $\kappa$ B 活性を著明に抑制でき、LC3 の発現増加を抑制できたが、LC3-II への活性化を抑制できず、敗血症病態のオートファゴソーム形成を完全に抑制できなかった。

また、AP-1 デコイ核酸は、敗血症モデルマウスの生存率を改善した。特に、AP-1 デコイ核酸は、腎臓において LC3 発現および LC3-II への活性化を抑制する傾向が認められた。結果として、AP-1 デコイ核酸は、腎臓におけるオートファゴソーム形成を抑制していた。

### (4) 結論

本研究は、敗血症マウスモデルとヒト肺動脈血管内皮細胞を用いた研究より、敗血症病態で肺、腎臓、血管内皮細胞をはじめとする全身のさまざまな臓器でオートファジーが加速する可能性を示した。この細胞内情報伝達の解析より、オートファゴソーム形成を促進する要因を抑制するためには、FADD, TAK-1, さらに転写因子 NF- $\kappa$ B, AP-1 の活性を抑制する効果が期待される結果となった。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. 松田直之, 小西裕子, 伊藤理恵, 枡久保順平, 足立裕史, 村瀬吉郎. 敗血症性多臓器不全に対する遺伝子治療 ~ Alert Cell Strategy ~. 実験医学 31:773-779, 2013 (査読無)

2. 松田直之. 敗血症性ショックの病態と治療. 名古屋内科医会誌 137:69-80, 2011(査読無)

3. 松田直之, 都築通孝, 市川 崇, 枡久保順平, 田村哲也, 足立裕史. 敗血症性急性肺傷害における Alert 細胞戦略. 日本薬理学会誌 138:151-154, 2011(査読有)

[学会発表] (計 6 件)

1. 松田直之. 共催セミナー「救急領域における好中球の役割」. 第 40 回日本救急医学会・学術集会 2012 年 11 月 14 日 国立京都国際会館 京都

2. Matsuda N, Tochikubo J, Tamura T, Tsuzuki M, Murase K, Adachi Y. TAK-1 siRNA normalises autophagy and apoptosis in septic mouse lung. European Society of Intensive Care Medicine 25th Annual Congress, Oct 13-17, 2012, Lisbon, Portugal

3. 松田直之. 教育セミナー「感染症性多臓器不全の病態と治療」. 第 39 回日本集中治療医学会学術集会・総会 2012 年 2 月 29 日 幕張メッセ 千葉

4. 松田直之. 招待講演「周術期全身性炎症の病態と治療」 第 31 回日本臨床麻酔学会 2011 年 11 月 4 日 琉球大学 沖縄

5. 松田直之. 教育セミナー「敗血症の病態と治療～組織再生におけるニッチ理論～」 第 39 回日本救急医学会学術集会 2011 年 10 月 20 日 京王プラザホテル 東京

6. Matsuda N and Teramae H. FADD siRNA reduces autophagy and apoptosis in septic mice. Society of Critical Care Medicine 40th Critical Care Congress, Jan 15-19, 2011, San Diego, USA

[図書] (計 1 件)

1. Hattori Y, Matsuda N. Protection from lethal cell death in cecal ligation and

puncture-induced sepsis mouse model by in vivo delivery of FADD siRNA. In: Targets in Gene Therapy. ed. by Yongping You. pp.409-422, In Tech-Open Access Publisher 2011.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田直之 (Matsuda Naoyuki)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号 : 50332466

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者なし