

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 5 月 27 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659326

研究課題名（和文）敗血症におけるオートファジーの役割とその制御

研究課題名（英文）The role of autophagy in sepsis and the control over the autophagy-associated pathophysiology

研究代表者

渡邊 栄三 (Watanabe Eizo)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：40375639

研究成果の概要（和文）：

敗血症の病態で、オートファジーが重要臓器細胞で如何に関与しているかを解明し、その制御による病態の改善を企図した。マウス盲腸結紮穿孔腹膜炎（敗血症）モデルの肝においてオートファジー誘導を示す LC3-II タンパク発現は一過性に上昇しその後下降した。GFP-LC3 トランスジェニックマウス肝では、術後 6-24 時間におけるオートファゴソームとリソソームとの癒合を免疫染色法で確認し、それらは電子顕微鏡所見とも矛盾しなかった。一方、オートファジー阻害薬投与による肝障害と生存率低下を確認した。よって、敗血症においてオートファジーは生体保護的に働いていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

It is not well understood whether the process of autophagy is accelerated or blocked, and whether it is beneficial or harmful to the immune defense mechanism over a time course during sepsis. Our aim was to determine both the kinetics and the role of autophagy in sepsis. We examined autophagosome and autolysosome formation in a cecal ligation and puncture (CLP) mouse model of sepsis (in C57BL/6N mice and GFP-LC3 transgenic mice), using western blotting, immunofluorescence, and electron microscopy. All autophagy-related processes are activated in a mouse model of early sepsis. Also, inhibition of autophagy process by chloroquine administration immediately after CLP resulted in liver injury and higher mortality; autophagy appears to play a protective role in septic animals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	1,000,000	0	1,000,000
23 年度	900,000	270,000	1,170,000
24 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	540,000	3,340,000

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：オートファジー，敗血症，細胞死，腹膜炎，盲腸結紮穿孔

1. 研究開始当初の背景

‘Infection induced SIRS’ として定義される sepsis (敗血症) の重症化プロセスにおいて，早期の予後を決定する因子としては高 cytokine 血症を背景とする全身性炎症反応 (systemic inflammatory response syndrome; SIRS) の程度が重要である．そして過剰な高 cytokine 血症を制御することが，敗血症急性期治療の鍵であると考えられている．一方でその急性炎症反応の時期を乗り越え，運良く SIRS が治まった後の敗血症個体は，今度はさらに克服困難な anti-inflammatory phase を迎える (CARS; compensatory anti-inflammatory response syndrome)．その際，免疫麻痺 (immunoparalysis) の状態にしばしば陥り，それが敗血症の後期予後に悪影響を及ぼすと考えられている．その敗血症における CARS, immunoparalysis の病態の中で重要な役割を果たしているのが，リンパ球と腸管上皮のアポトーシスであり，それらの制御が敗血症の救命率改善に繋がると期待されている．一方，オートファジーは，栄養飢餓に対する適応機能の一つであるが，II型プログラム細胞死ともいわれ，神経変性疾患や悪性腫瘍など様々な病態への関与が報告されている．また，オートファゴソーム形成に必須な Beclin-1 は，アポトーシスの制御因子である Bcl-2 の相互作用分子として知られている．Bcl-2 トランスジェニック (Tg) マウスでは，リンパ球のアポトーシス制御を介して敗血症モデルの生存率が改善し，さらにアポトーシス促進因子である Bim の制御による敗血症マウスの生存率改善も報告されている．しかし敗血症の病態におけるオートファジーの関与については未解明である．一方，研究代表者は，敗血症患者の肝標本にて，オートファジー小胞の増加を電子顕微鏡で確認しており (*Lab. Invest.*, 2009; 89: 549-61)，これは敗血症とオートファジーの関与を示した研究開始当初では唯一の論文であった．そこで，その機序を解明するために，急性細菌性腹膜炎のマウス CLP (盲腸結紮穿孔) モデルと細菌性肺炎モデルの2種類の敗血症モデルを用いて敗血症におけるオートファジーの機能的関与を検討することとした．

重症病態である敗血症の病態生理は未だ十分に解明されていない．そのなかで，細胞ネクロシスやアポトーシスの病態への関与

は多く検討されてきているが，オートファジーの関与は未知である．最近，genome-wide association study によって，炎症性腸疾患の一つであるクローン病が，マクロファージ系細胞のオートファジー欠損により，腸管の炎症制御不能となって発症することが確認された．我々は，敗血症においても，オートファジーは抑制されているとの仮説を立てた．実際，細胞内寄宿細菌の排除にオートファジーが役立っていることが既に報告されており，この点からも，オートファジーを，誘導することが，細菌感染症および敗血症の治療・創薬のターゲットにもなり得ると見込まれる．

2. 研究の目的

敗血症の急性期の病態において，オートファジーは亢進しているのか抑制されているのかを，敗血症マウス (腹膜炎および肺炎モデル) を用いて検討する．そして，その結果次第で，現在までに知られているオートファジー抑制もしくは促進因子を用いて，敗血症モデルの生存率の変化を分析し，同モデルの重要臓器における細胞死，すなわち，ネクロシス，アポトーシス，オートファジーにつき，形態学的に観察する．またオートファジーについては，分子生物学的手法を用いて動態を検証する．そして，オートファジーの促進もしくは抑制といったコントロールによって，敗血症病態を改善させることを目的とする．

3. 研究の方法

敗血症モデルマウス (CLP (盲腸結紮穿孔) ; 腹膜炎モデル) を用いて，*in vivo* で，重要臓器 (特に，心・肝・脾臓) におけるオートファジーの動向をモニタリングする．それら重要臓器に対し，遺伝子発現やプロテイン発現を定量・解析し，オートファジーに関わる分子のうちどの分子が敗血症において重要であるかにつき検討する．そして，今後のオートファジー制御の側面からの敗血症治療の可能性につき考察する．そして，オートファジー機構におけるいずれかの制御因子を抑制もしくは増強させることによる，敗血症モデルの生存率への影響までを調査する．その際，オートファジーの動向を GFP-LC3 Tg マウスを用いて *in vivo* でモニタリングすることとする．

【敗血症モデルマウス作成 ; CLP (盲腸結紮穿孔) モデル】

7 週齢以上の C57B/6 雄マウスに対し CLP

(25 ゲージ針 2 回穿刺) 手術を施行し、腹膜炎モデルを作成する。コントロールには同部位を開腹し、盲腸を露出するのみで穿孔せず還納する (Sham モデル)。以上は全て、イソフルレンによる全身麻酔下にて施行する。

【敗血症モデルにおける遺伝子およびタンパク発現解析】

敗血症モデル作成手術後、6 時間と 24 時間後のオートファジー、アポトーシスおよび cytokine 関連遺伝子 (既に 24 種類選出) 発現を、qRT-PCR 法にて肝で検討する。そして、有意な発現変化が現れているマーカーを統計学的に抽出する。

オートファジーの定量として、敗血症モデルの各臓器標本で各々オートファゴソームとリソソームのマーカーである抗 LC3 抗体および抗 LAMP1 抗体を用いた免疫組織染色を行うと同時に、同抗体を用いてウェスタンブロットを行う。

【敗血症モデルにおける重要臓器細胞の形態学的検討】

電子顕微鏡を用いて、CLP モデルの各臓器標本で sham 手術との細胞の形態学的相違を検討する。オートファジーが認められた場合には、視野内の核の数とオートファゴソーム数との比からオートファジー比を算出し、これもオートファジー定量として検討する。2) および 3) の結果の検証として、ここまでのいずれかの段階で GFP-LC3 Tg マウスに敗血症手術を施すことによって、オートファジーのモニタリングを *in vivo* で行う。

【オートファジー制御による重症敗血症治療への実験的アプローチ】

クロロキンやラパマイシンなどオートファジーの制御効果が知られている薬剤の投与により、敗血症モデルで実際にオートファジー、細胞死、さらには全身性炎症反応が制御されているかにつき詳細な検討を加える。その一手段として、我々が現在まで、敗血症患者の治療効果判定に用いている interleukin-6 (IL-6) 血中濃度も評価する。敗血症マウスモデルにおける IL-6 血中濃度は、既報で多く報告されており、それらと矛盾しない値でかつ、治療に反応して減少するか否かが主な検討項目になる。そして、腹膜炎モデルでのオートファジー制御可否について前向き survival study を行う。

4. 研究成果

【敗血症における重要臓器別オートファジー発現およびその経時的変化】

ウェスタンブロッティング法を用いて肝、心、脾臓、腎、腸間膜リンパ節における LC-3 タンパク発現を検討した。細胞質遊離型の

LC3-I (分子量 17kDa) と膜結合型の LC3-II (分子量 15kDa) から LC3-II/LC3-I 発現比を定量し、オートファジー動態の経時的変化を臓器別に解析した。

肝では CLP3, 6, 12 時間において LC3-II 発現が著明に上昇し、LC3-II/LC3-I 比は、CLP 後 6 時間で、2.6 倍 ($p < 0.001$) と peak level に達し、24 時間では sham 群と同程度に収束した。一方、心・脾・腎においても肝と同様の傾向を認めたが、術後急性期、6 時間後での LC3-II/LC3-I 発現は肝の発現上昇が最も顕著であった。

同様の現象が GFP-LC3 Tg マウスを用いた CLP モデルから採取した組織標本においても認められた。CLP6 時間での肝組織標本では、GFP-LC3 ドットが細胞質に多数発現し、細胞あたりの GFP-LC3 のドット数の定量では、sham 群に比して CLP 群で有意に増加していた。GFP-LC3 ドット数は CLP6 時間で 23.7 ± 9.5 個/cell (mean \pm SD) でピーク、CLP24 時間で 13.4 ± 3.2 個/cell と若干低下した。一方、sham 群ではいずれも GFP ドット発現数と経時的変化について有意差はなかった。以上より 6 時間を peak に各臓器でオートファジーが強く誘導され、24 時間の時点で収束していることが示唆された。

【オートファジー動態】

敗血症刺激によるオートファジーの動態について、免疫染色法を用いて解析した。GFP-LC3 Tg を用い同様に組織標本を作成しリソソームマーカーである LAMP1 を共染色し、GFP とともに二重染色 (co-localize) されるものを観察・定量した。その結果、CLP6 時間では組織中の LAMP1 発現は軽度であったが、CLP 後 24 時間で、より増強する傾向を認めた。さらに、GFP-LC3 とともに二重染色されるドットは CLP6 時間で 4.6 ± 1.7 個/cell (mean \pm SD) から、CLP24 時間では 8.6 ± 4.0 個/cell へと著明に増加した。全 GFP-LC3 dot 数に対する LAMP1 で共染色されるドットが占める割合は CLP6 時間 19.2% に対して、CLP24 時間では 64.2% へ上昇した。以上の結果から、時間経過に従い、オートファゴソームがリソソームと融合していることが示唆された。すなわち CLP 刺激によりオートファジーは急性期に強く誘導されており、これにより著明に増加したオートファゴソームは、時間経過に従いリソソームと融合し、分解過程に至っていると考えられた。しかしながら、オートファジーの誘導は 24 時間時点では収束しており、少なくとも持続的なオートファジーの亢進は認められなかった。

【オートファジー阻害剤投与による実験】

CLP および sham 手術を施行したマウスに、術後 1 時間でオートファジーの阻害剤として知

られるクロロキシン (60mg/kgBW) を腹腔内投与した。対象群としては、生理食塩水を腹腔内投与した。

クロロキシン (CQ) 投与によるオートファジー動態への影響を確認するために、ウエスタンブロッティングと免疫組織染色を行った。B6 マウスを用いたウエスタンブロッティングでの LC3-II/LC3-I 比は、CLP6h+CQ 投与において CLP+生理食塩水投与群に比し有意に低下した。さらに Tg マウスを用い、CQ 投与による変化を観察したところ、CLP6h と 24h ともに細胞質中に GFP-LC3 ドットと LAMP1 の発現が多数認められたが、そのほとんどは二重染色されておらず、CLP 後 24 時間の肝組織においても同様であった。GFP-LC3 と LAMP1 で共染色されるドットは、CQ が投与された CLP 群の 6 時間後では 12.3% であったものが 24 時間後には 11.1% と有意に減少していた。以上より、CLP によりオートファジーは急性期に著明に誘導されるが、CQ 60mg/BW 投与により、オートファゴソームとリソソームとの融合阻害を来し、オートファジープロセスが抑制されていることが確認された。

次にこのクロロキシン (CQ) 投与実験系を用い、6 時間、および 24 時間のタイムポイントにおいて、マウスの血清を採取し、全身性炎症の指標として急性期の炎症性サイトカインであるインターロイキン (IL)-6 の血清濃度とともに、臓器障害 (肝障害) の指標として、AST と ALT 値を測定した。さらに CLP マウスに対する、CQ 投与群と非投与群とで Kaplan-Meier 法による生存分析を行った。その結果、CQ 投与により IL-6 は増加傾向を認めた。また AST はコントロール群に比して有意に増加、ALT も有意差はないもの増加傾向を認めた。さらに CQ 投与群ではコントロール群に比し 36 時間生存は有意に低かった ($p < 0.05$)。したがってオートファジー阻害により、敗血症病態の悪化・臓器障害が助長し、生存率が低下することが示唆された。

以上をまとめると、敗血症病態急性期においては、オートファジー flux の停滞による空胞の蓄積が主因でオートファゴソームが増加するのでは必ずしもなく、少なくとも一過性にはオートファジープロセスが亢進していることが確認された。さらに同モデルではクロロキシンによるオートファジー阻害により、CLP マウスの死亡率上昇と肝細胞障害増悪が確認され、腹膜炎敗血症においてオートファジーは生体保護的に働いていることが示唆された (Takahashi W, *et al* 投稿中)。マウス CLP モデルにおける心、肺での検討でも同様に、オートファジーは敗血症急性期では善玉であるとの報告が散見される。しかしながら、CLP における、脾臓などの免疫担当細胞や腸管、腎などの重要臓器でのオートフ

ァジー動態は、筆者の知りえる限り未解明であり、一定の結論を得るには、さまざまな重症度や病期でのさらなる検討を要する。

一方、最近の重症敗血症患者の形態学的検討では、腎近位尿細管で著明なオートファゴソームの増加が認められ、この現象が、過剰なオートファジーによる細胞質の著明な空胞化、甚大な organelle の喪失、細胞死からの臓器不全を惹起するのかどうかという点は興味深い。

また、敗血症患者の骨格筋におけるミトコンドリア 'biogenesis' 活性化が良好な転帰に寄与するとの報告もあり、オートファジーによるミトコンドリアの品質管理は重要臓器保護の観点から重要な働きをしているのは現時点での共通見解であろう。

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 4 件)

1) Takasu O, Gaut JP, Watanabe E, To K, Fagley RE, Sato B, Jarman S, Efimov IR, Janks DL, Srivastava A, Bhayani SB, Drewry A, Swanson PE, Hotchkiss RS: Mechanisms of cardiac and renal dysfunction in patients dying of sepsis. 査読有, Am J Respir Crit Care Med 2013;187:509-17.

2) 渡邊栄三, 高橋和香, 高須 修, 織田成人: 侵襲後の apoptosis, autophagy の制御による臓器不全の回避は可能か? 査読無, 侵襲と免疫 2013; 22: 41-5.

3) 渡邊栄三, 織田成人, 高橋和香, Swanson PE, Hotchkiss RS, 平澤博之: 敗血症における細胞死の様式—特に Autophagy をめぐって. ICU と CCU 査読無, 2011; 35: 389-99.

4) 渡邊栄三, 織田成人, 高橋和香, Swanson PE, 平澤博之, Hotchkiss RS: Sepsis の病態における Autophagy の Tissue Dysoxia への影響. 査読無, Shock 2011; 26: 26-33.

[学会発表] (計 6 件)

1) 高橋和香, 織田成人, 幡野雅彦, 渡邊栄三, 安部隆三, 中田孝明, 幸部吉郎, 大島 拓, 服部憲幸: マウス盲腸結紮穿孔 (CLP) モデルを用いた重要臓器における autophagy 発現解析. 第 25 回日本外科感染症学会総会 2012 年 11 月. 千葉

2) 高橋和香, 渡邊栄三, 幡野雅彦, 安部隆三, 中田孝明, 幸部吉郎, 大島 拓, 服部憲幸, 織田成人: マウス盲腸結紮穿孔 (CLP) モデルにおける autophagy 動態解析. 第 40 回日本救急医学会総会・学術集会 2012 年 11 月. 京都

3) Watanabe E, Kimura T, Teratani A, Sakamoto T, Ikeda T, Ikeda K, Kotani J,

Kitamura N, Oda S: IRGM polymorphisms were associated with mortality and IL-6 blood levels of severely septic patients. The 6th International Symposium on Autophagy 2012, Oct 2012. 沖縄

4) Watanabe E, Oda S, Waka, Takahashi W, Kimura T: Autophagy-Associated Cellular Injury and Inflammation in Sepsis. 日本外科代謝栄養学会第 49 回学術集会 2012 年 7 月. 千葉

5) 渡邊栄三, 高橋和香, 幡野雅彦, 織田成人: 敗血症性臓器障害における Autophagy—臨床および基礎医学的研究— 第 21 回日本 Cell Death 学会学術集会 2012 年 7 月. 愛知

6) Watanabe E: Autophagy-Related Cellular Injury and Inflammation in Sepsis. The Shock Society' s 34th Annual Conference on Shock, Plenary Symposium I (Invited), June 2011. Virginia U. S. A.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊栄三 (WATANABE EIZO)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：40375639

(2) 研究分担者

織田成人 (ODA SHIGETO)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：90204205