

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15461

研究課題名（和文）カイコを用いたサイトカインストーム発症メカニズムの解明

研究課題名（英文）Study of cytokine storm using the silkworm model

研究代表者

宮下 惇嗣（Miyashita, Atsushi）

帝京大学・付置研究所・講師

研究者番号：40818308

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では緑膿菌の加熱死菌や黄色ブドウ球菌の加熱死菌を材料として、それらのカイコの血管内に投与することによって全身性の炎症を誘導し、数時間以内に死に至る「サイトカインストーム」の病態モデルを構築することができた。特に、それらの加熱死菌をジメチルスルホキシドなどの有機溶媒と同時投与したり、実験に用いるカイコに飢餓ストレスを与えることによって症状が増悪することや、ヒトの臨床で用いられているナファモスタット（プロテアーゼ阻害薬）やステロイド（抗炎症薬）によって症状の改善がみられたことから、今後同モデルを用いてヒトの臨床応用が見込まれる化合物の探索を行う基盤を整備することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果によって、これまで不明点が多く残されていた全身性・急性の炎症性ショック反応の進行メカニズムを研究するための基盤を提供することができた。特に、ヒトの臨床で一定の症状改善効果が得られているナファモスタットやステロイド等の薬剤がカイコモデルでも治療効果を示したことから、ヒトへの外挿性が期待できるモデルとして今後の新規治療薬スクリーニングへの応用が期待される。将来的には本モデルを用いてサイトカインストームを含む炎症性疾患に対する創薬を加速し、感染症に苦しむ人々の健康に貢献できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we were able to construct a systemic inflammation model in silkworms that leads to death within a few hours due to a "cytokine storm," by administering heat-killed *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* into their bloodstream. Particularly, the severity of the symptoms increased when these heat-killed bacteria were co-administered with organic solvents such as dimethyl sulfoxide, or when the silkworms used in the experiments were subjected to starvation stress. Improvements in symptoms were observed with the use of nafamostat (a protease inhibitor) and steroids (anti-inflammatory drugs), which are used in human clinical settings. This allows us to establish a foundation for using this model to explore compounds that may have clinical applications in humans.

研究分野：免疫学

キーワード：自然免疫 サイトカインストーム カイコ 炎症性疾患 ショック 敗血症 細菌 緑膿菌

## 1. 研究開始当初の背景

免疫システムは自己と非自己を認識し、異物を排除する重要な機能を担う。しかし、免疫システムが暴走すると、「サイトカインストーム」と呼ばれる致死的な病態に陥る。この現象は、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の重症例でも観察され、その致死率は極めて高い。サイトカインストームに対する有効な治療法は限られており、現状では輸液、酸素吸入、大量のステロイド投与などが行われているが、根本的な治療法は確立されていない。このような背景から、免疫システムの暴走を制御するためには、分子レベルでの理解が不可欠である。本研究では、カイコをモデル動物として用い、サイトカインストームの発症とその治療方法を探索することを目的とした。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、以下の3点に集約される：

1. **自然免疫システムの「破壊」と「修復」**：自然免疫システムを人工的に「破壊」し、その後「修復」する方法を確立すること。
2. **分子ネットワークの包括的理解**：破壊された自然免疫システムが「修復」される過程を、分子ネットワークの観点から包括的に理解すること。
3. **新たな創薬シーズの提案**：過剰炎症を病態とするサイトカインストーム等の疾患に対する新たな創薬シーズを提案すること。

これにより、サイトカインストームのような免疫システムの暴走を分子レベルで理解し、根本的な治療法の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究では、カイコをモデル動物として以下の方法を採用した：

1. **カイコを用いたサイトカインストームモデルの確立**：
  - **複数のストレス因子の適用**：飢餓ストレス、酸化ストレス、有機溶媒ストレス、大量の脂質投与など、複数のストレス因子をカイコに与え、致死的ショック反応（サイトカインストーム）を誘導した。
  - **分子機構の解明**：サイトカインストームを起こしたカイコの体液中に強い細胞傷害性因子を同定し、生化学的に精製した。これにより、サイトカインストーム発症に関わる分子機構を明らかにした。
2. **サイトカインストームの治療方法の探索**：
  - **治療法の試行**：給餌、ナファモスタット（セリンプロテアーゼ阻害剤）、ステロイド、トレハロース、内因性サイトカインの前投与など、複数の治療方法を試行し、その効果を評価した。
  - **治療条件の最適化**：投与量、投与経路、投与タイミングの最適化を行い、有効な治療条件を確立した。
3. **トランスオミックス解析**：
  - **サンプル収集と解析**：サイトカインストーム発症と治療条件におけるカイコ体内の転写産物（トランスクリプトーム）と代謝産物（メタボローム）を解析した。

#### 4. 研究成果

本研究の成果は以下の通りである：

##### 1. サイトカインストームモデルの確立：

- **実験モデル確立の試み**：カイコを用いたサイトカインストームモデルを確立し、ストレス因子によって誘導されるショック反応を再現した。これにより、自然免疫システムの破壊とそのメカニズムを詳細に解析することが可能となった。
- **細胞傷害性因子の同定と精製**：カイコの体液中に強い細胞傷害性因子を同定し、生化学的に精製した。その因子の一つは、不飽和脂肪酸であることを見出した（未発表）。この因子の同定により、サイトカインストーム発症の分子メカニズムを解明する足がかりとなることが期待される。

##### 2. 治療方法の最適化：

- **多様な治療法の評価**：給餌やナファモスタット、ステロイド、トレハロース、内因性サイトカインの前投与が、サイトカインストームの治療に有効であることを確認した。
- **治療条件の最適化**：投与量、投与経路、投与タイミングを最適化し、最も効果的な治療条件を確立した。これにより、サイトカインストームの治療法としての有効性が実証された。

##### 3. トランスオミックス解析：

- **包括的なデータ解析**：トランスクリプトーム解析とメタボローム解析を組み合わせ、自然免疫システムの破壊と修復に関与する分子パターンを明らかにした。解析結果は、個体ごとの詳細な分子データを提供し、自然免疫システムの動作原理を深く理解するための基盤となった。

##### 4. 学術的および産業面への貢献：

- **自然免疫システムの理解の深化**：本研究の成果により、自然免疫システムの作動原理とその暴走メカニズムに関する理解が深まった。特に、カイコをモデル動物として用いたことで、今後他のモデル動物（マウスやショウジョウバエなど）での検証結果を補完する知見が得られることが期待される。
- **新たな治療法の可能性**：本研究で見出された治療法の最適化により、サイトカインストームなどの過剰炎症を病態とする疾患に対する新たな治療法の開発が期待される。

#### 今後の課題

1. **さらなる分子メカニズムの解明**：サイトカインストームの発症および修復メカニズムに関与する全ての分子を完全に解明するためには、さらなる研究が必要である。特に、同定された分子がどのようにして免疫システムの暴走を引き起こすのか、その詳細なメカニズムの解明が求められる。この点については、現在ウシ血清中の成分によってカイコのサイトカインストームを誘導する条件を確立し、当該活性因子の精製に着手している。将来的には、当該因子を分子標的とした創薬開発研究への展開が期待される。
2. **治療法の臨床応用**：本研究で得られた知見を基に、実際の臨床現場で使用可能な治療法の開発を進めることが重要である。動物モデルからヒトへの応用には多くの課題があるが、引き続き研究を進めることで、より実用的な治療法を確立することを目指す。

3. **多次元データの統合解析**: トランスクリプトーム解析とメタボローム解析のデータを統合し、自然免疫システムの包括的な理解をさらに深めるためのデータ解析手法の開発が必要である。特に、機械学習を用いた多次元データ解析のさらなる進展が期待される。本研究は、自然免疫システムの理解を深め、サイトカインストームなどの疾患に対する新たな治療法の開発に貢献するものであり、今後の研究の発展が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Li Wenyuan, Miyashita Atsushi, Sekimizu Kazuhisa	4. 巻 12
2. 論文標題 Peanut triacylglycerols activate innate immunity both in insects and mammals	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7464
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-11494-0	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 Miyashita Atsushi, Kataoka Keiko, Tsuchida Toshio, Ogasawara Akihiko, Nakajima Hiroto, Takahashi Megumu, Sekimizu Kazuhisa	4. 巻 3
2. 論文標題 High molecular weight glucose homopolymer of broccoli ( <i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> ) stimulates both invertebrate and mammalian immune systems	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Food Science and Technology	6. 最初と最後の頁 1012121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/frfst.2023.1012121	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 -
1. 著者名 Hamamoto Hiroshi, Miyashita Atsushi, Kamura Koushirou, Horie Ryo, Sekimizu Kazuhisa	4. 巻 16
2. 論文標題 Silkworm arylsulfatase in the midgut content is expressed in the silk gland and fed &lt;i>via</i> smearing on the food from the spinneret	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Drug Discoveries & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 280 ~ 285
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5582/ddt.2022.01088	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 -
1. 著者名 Miyashita Atsushi, Miyauchi Masanobu, Tabuchi Fumiaki	4. 巻 18
2. 論文標題 The prospects of automation in drug discovery research using silkworms	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Drug Discoveries & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 130 ~ 133
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5582/ddt.2024.01013	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 -

1. 著者名 Nabbout Amal El、Ferguson Laura V.、Miyashita Atsushi、Adamo Shelley A.	4. 巻 30
2. 論文標題 Female ticks ( <i>Ixodes scapularis</i> ) infected with <i>Borrelia burgdorferi</i> have increased overwintering survival, with implications for tick population growth	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Insect Science	6. 最初と最後の頁 1798 ~ 1809
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1744-7917.13205	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

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Atsushi Miyashita
2. 発表標題 Immune priming by antimicrobial peptides in the silkworm, with implications for their cytokine-like signaling function
3. 学会等名 Gordon Research Conference on Antimicrobial Peptides (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮下惇嗣
2. 発表標題 昆虫を用いた創薬プラットフォームの創成
3. 学会等名 第95回日本生化学会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮下惇嗣
2. 発表標題 カイコを用いた感染症の理解と克服
3. 学会等名 日本細菌学会関東支部会 インターラボセミナー (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Atsushi Miyashita
2. 発表標題 Primed immune responses in the silkworm ( <i>Bombyx mori</i> ) enhance the immune barrier to fungal and bacterial pathogens
3. 学会等名 Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮下惇嗣
2. 発表標題 カイクモデルを使った自然免疫応答の解明
3. 学会等名 第96回日本生化学会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023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	三上 雄大  (Mikami Kazuhiro)		
研究協力者	石井 雅樹  (Ishii Masaki)		
研究協力者	関水 和久  (Sekimizu Kazuhisa)		

6. 研究組織（つづき）

	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	田淵 史晃  (Tabuchi Fumiaki)		

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