

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23659843

研究課題名（和文）

敗血症病態における遺伝子認識型受容体シグナルのノックダウン解析

研究課題名（英文）

Analysis using knock-down methods for gene-associated receptor signaling 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、siRNA を投与して FADD、TAK-1 等の遺伝子転写を阻害する事により敗血症モデルマウスの生存率を改善し、これが遺伝子認識型受容体の肺、腎臓、大動脈の LC3 発現量と活性化の両者を抑制する結果である機序を明らかにすると共に、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せずに、正常化している事を見出した。遺伝子認識型受容体シグナルの抑制により、細菌感染症、ウイルス感染症、遺伝子治療に随伴する臓器炎症を軽減できる結果に繋がると考えられ、重症感染症における新規創薬を提案する意義を持つと言える。

研究成果の概要（英文）：Sepsis is well known as a severe disease states corresponding emergency and intensive care. Sepsis is a systemic inflammatory reactions against viruses and bacteria, but effective therapy to control inflammation of the non-antibiotic still has not been established. In this study, to improve the survival rate of sepsis model mice by inhibiting gene transcription FADD, of TAK-1, such as by administering the siRNA, the manipulation reduced the LC3 expression level of lung, kidney, and aorta as gene recognition receptors. Subsequent analysis clarified the mechanism that inhibitions of both activation, autophagosome formation in sepsis pathology were not enhanced. The changes were found as normalized functioning in electron microscope image. It can be said that it is considered by the suppression of gene-aware receptor signaling, leading to results that can reduce the organ inflammation associated bacterial infections, viral infections, in gene therapy, to have the significance of proposed new drug discovery in severe infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：救急医学

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。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。

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- κ B (NF- κ B) による炎症性分子 (tumor necrosis factor- α や interleukin-1 β 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

これまでの細菌感染症による敗血症のみならず, ウイルスや細菌の分解産物である DNA や RNA をリガンドとする ALR3/7/8/9 の主要臓器の基幹細胞への作用を解析を目的とした。これらの主要臓器基幹細胞に於ける細胞内情報伝達シグナルは必ずしも明確では無く, 未だ詳細な解析を必要としている。

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過程を引き継ぐものとした。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 を用いた分子レベルの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

これまで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リポゾームカプセルを用いて導入し, 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。

引き続き, TLR9 リガンドとして CpG DNA (CpG-ODN 1688, CpG-ODN 1168, Invitrogen), TLR3/7/8/9 リガンドとしてインフルエンザウイルス RNA セグメント (Seg1: GenBank: CY075843.1, Seg4: GenBank: CY075845.1 Seg8: GenBank: CY05848.1 など) を受託発注し, これらの 50microg をマウスの尾静脈より静脈内投与し, TLR3/7/8 を活性化刺激した。

以上の敗血症モデルマウスの研究対象は, 敗血症 3 時間, 敗血症 6 時間, 敗血症 10 時間, 敗血症 24 時間, および敗血症 48 時間とし, 各々対照群との比較とした。

さらに, これらの敗血症軍に対して, TLR3/7/8/9 および各細胞内情報伝達蛋白の遺伝子治療群を併設した。遺伝子導入には, 参考文献と同様にリポゾーム法, 並びに HVJ ベクター法を用い, 尾静脈より静脈内投与した。これらの導入効率の評価には, Cy3 ラベル核酸を導入する事で, 肺, 心筋, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 腸管, 膵臓, 副腎および大動脈などにおける遺伝子導入効率と臓器消失半減期を測定した。これまでの私の研究では, 核酸の投与量を 50microg 以上とする事により, 主要臓器の導入効率が高まる事を既に確認しているが, 本研究でも主要臓器における遺

伝子導入効率と消失半減期の測定を繰り返しながら遺伝子認識型 TLR シグナルを解析した。

敗血症病態における遺伝子認識型 Toll-like 受容体シグナルの発現解析に関しては、正常状態、および敗血症病態のマウスより、イソフルラン麻酔下で摘出した肺、心筋、肝臓、腎臓、脾臓、腸管、膵臓、副腎および大動脈などの主要臓器サンプル、および人主要臓器培養細胞(TAKARA (株)より購入)を用いて、TLR3/7/8/9 シグナル分子の mRNA に対して RT-PCR 法、各蛋白分画に対して Western blot 法と免疫沈降法などを併用して主要臓器特異的な細胞内情報伝達系を同定し、それらの敗血症病態に於ける増減を測定した。抗体及びリン酸化抗体は、主に、Cell Signaling Technology (株) などより入手して使用した。

遺伝子認識型 Toll-like 受容体シグナル分子の siRNA の作成と導入効果判定については、前述の研究結果をもとに、TLR3/7/8/9、さらにこれらの細胞内情報伝達系で恒常的に発現を認めていた細胞内情報蛋白を利用し、その siRNA を Gene Bank の遺伝子データに基づいて、設計ソフト siDirect による計算結果を用いて設計した。さらに Ambion (株) に設計結果の作成を発注依頼し、siRNA 導入による主要臓器炎症抑制効果を測定した。siRNA による遺伝子のノックダウンに関しては、標的分子の mRNA 量の減少を測定して確認し、RT-PCR 法と in situ hybridization 法のそれぞれで確認した。

最終的な、遺伝子認識型 Toll-like 受容体シグナル分子ノックダウンによる転写因子活性測定については、遺伝子導入後にイソフルラン麻酔下で摘出した能、心筋、肝臓、腎臓、脾臓、腸管、膵臓、副腎および大動脈などより抽出した各蛋白を用いて、これらの NF- κ B、AP-1、IRF、STAT などの転写因子活性を、ゲルシフト法を用いた blotting により解析した。検出された転写因子バンドの適正さに関しては、各転写因子に対する抗体を用いたスーパーシフト法で確認した。なお、ゲルシフト法に用いる DNA プロブは北海道システムサイエンス社に発注依頼し、32P を 3' 末端にラベリングしたものをを用いた。ゲルシフトを確認した後は、ゲルを X 線フィルムに露光させて画像をデジタル取り込みすると共に BAS5000 システム(Fuji Film 社)プレートを用いて、それらの活性値を相対評価して、定量化した。

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- κ 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- κ 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 LC3 II 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- α 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

(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 μ g の投与としてリポ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- κ B デコイ核酸は、敗血症モデルマウスの肺、動脈などの NF- κ 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) Toll-like 受容体への影響

CLP 作成後の時系列において、転写因子 nuclear factor- κ B (NF- κ B) や activator protein-1 (AP-1) の活性が高まる事を、摘出した肺と心房筋などで確認した。TLR3、TLR7、TLR8 および TLR9 の mRNA は、肺、右心房、肝臓、脾臓、腎皮質、空腸、結腸、膵臓、脾臓、副腎、大動脈に存在する事が確認できた。しかし、これらの TLR は CLP 作成後に正常状態よりも減少する傾向が認められた。一方、TLR3、TLR7、TLR8 および TLR9 の siRNA により、これらの発現量を予め減少させても、肺における NF- κ B や AP-1 の活性を抑制できず、48 時間以内に研究に用いた 10% 全例が死亡した。一方、TLR9 リガンドとして CpG DNA、TLR3/7/8 リガンドとしてインフルエンザウイルス RNA セグメントを尾静脈より静脈内投与した研究系では、TLR3、TLR7、TLR8 および TLR9 の siRNA による発現減少により、各々 10 例が全て生存した。

細胞性感染による敗血症病態では、TLR3、TLR7、TLR8 および TLR9 は、敗血症病態の増悪に強く関与していない可能性が示唆された。しかし、ウイルス感染では TLR3、TLR7、TLR8 および TLR9 が生存に関与する可能性が示唆された。

(5) 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- κ 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, 枳久保順平, 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, 枳久保順平, 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.

[その他]

ホームページ等

<http://nagoya-emergency-ccm.p2.bindsite>

. jp/
<http://nagoya-emergency-ccm.p2.bindsite.jp/basic-res.html>

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