

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790639

研究課題名(和文) 敗血症の早期診断マーカーの検索と肝細胞傷害への一酸化炭素誘導による保護効果の検討

研究課題名(英文) Inducer of heme oxygenase-1 cobalt protoporphyrin accelerates autophagy and suppresses oxidative damages during lipopolysaccharide treatment in rat liver

研究代表者

鷓沼 香奈 (Unuma, Kana)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：30586425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：LPS投与による敗血症モデルラットの肝臓では、ミトコンドリア障害が起こりオートファジーで処理される事が確認された。一酸化炭素誘導によりLPSラットの肝機能低下や逸脱酵素上昇は改善傾向にあったが、オートファジー阻害剤の前投与はこの効果をキャンセルした。また、肝ミトコンドリアに局在するカルバモイルリン酸シンターゼ1がLPS投与後早期から上昇する事が示された。以上より、敗血症肝ではミトコンドリア障害に引き続いてオートファジーとリソソームバイオジェネシスが起こり、正常な細胞に復帰しようとしていると考えられた。上記経路で一酸化炭素を誘導すると酸化ストレスが軽減され敗血症を緩和する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：A large reduction in liver mitochondrial protein and induction of autophagy were observed in LPS-treated rats. Electron microscopic and immunohistochemical analyses demonstrated autophagic vacuoles in LPS-treated rat liver. Oxidative stress markers were increased in LPS-treated animals; CoPP treatment ablated these alterations. An inhibitor for the opening of mitochondrial permeability transition pore, cyclosporine A, suppressed oxidative stress as well as liver damage during LPS administration. CoPP promoted autophagy and prevented rats from liver damage during LPS administration. HO-1 promotes autophagy and elimination of damaged mitochondria thereby repressing oxidative stress in LPS-treated rat liver, revealing a novel mechanism for protection by HO-1 against septic liver damage.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：autophagy endotoxemia heme oxygenase-1 lipopolysaccharide

1. 研究開始当初の背景

敗血症は、一旦発症すると多臓器不全を経て約半数が死に至る、極めて重篤な病態である。臨床医学において、発症後 12~24 時間で上昇する C-reactive protein (CRP) やプロカルシトニンをマーカーとしているが、その他の早期診断に有用なマーカーが乏しいことから、法医剖検例において敗血症発症後短時間で死亡した症例では診断が困難であることが少なくない。

最近、重症敗血症患者の肝臓、マウス腹膜炎モデルの肝細胞におけるオートファジーの証拠が示され、この病態におけるオートファジーの関与が示されたが、その分子機構の詳細は未解明である。近年、敗血症における臓器機能障害の主体はミトコンドリア機能不全であると報告された。ミトコンドリアは代謝・エネルギー産生の中心的オルガネラであり、虚血、炎症等の様々な作用により傷害されると、過剰な活性酸素の産生(酸化傷害) ATP 消費等から、細胞を危機にさらす。そのため、傷害ミトコンドリアの選択的オートファジーによる除去は極めて重要であり、病態に関与すると考えられている。また、一酸化炭素(CO)は、肝臓の主要な循環調節因子であり、様々な病態から細胞を保護する事が知られている。一酸化炭素を誘導した動物に endotoxin を投与すると死亡率が低下し、さらに HO-1 がミトコンドリアのオートファジーを促進することが報告されるなど(文献 8) 多くの論文が敗血症に対する CO の保護作用を報告しているが、そのメカニズムは明らかではない

2. 研究の目的

本研究の目的は、敗血症の早期診断における CPS1 のマーカーとしての有用性を検討すること、さらに、酸化傷害に関連した一酸化炭素誘導または抑制が、LPS 投与ラットの肝細胞内ミトコンドリアのオートファジーの誘導に対して、どのように寄与するかを解明し、この過程で変化する肝細胞の遺伝子発現を新たに同定して、剖検診断に対する貢献を目指すものである。

3. 研究の方法

(概要)

- A. LPS 腹腔内投与による敗血症モデルラットの肝臓を用いて、血中の CPS1 の変動、および肝臓の CPS1 の低下を経時的に観察する。また、これらのメカニズムについて詳細に検討する。
- B. A. の条件で、CO を誘導したときに、これらがどう変化するか検討する。
- C. 予備実験で確認された、LPS 刺激により LC3 活性が高まる現象の再現性を確認し、オートファゴソームに特徴的な LC3

陽性小胞の増加が起こっているかどうかを組織学的に評価する。

D. このとき、LC3 タンパク発現や局在、ミトコンドリア、lysosome などの細胞小器官の局在と共に、電子顕微鏡・コンフォーカル顕微鏡・小胞体マーカー・

GFP-LC3 との局在、阻害剤による LC3 の局在の消失などを多方面から解析し、その変化のメカニズムを生化学的・分子学的手法を用いて検討する。

E. C. の結果、ミトコンドリアがオートファジーの標的になっている事が明らかになった場合、HepG2 培養細胞を用いて LPS を直接暴露し、GFP-LC3 ベクターを用いてオートファジーを可視化し、その分子機構について詳細に検討する。

F. E. に加えて、CO 発生剤を投与し、CO 発現による影響を検討する。

(方法)

1) 敗血症モデル、HO-1 誘導群の作成
5週齢SD系雄性ラットに大腸菌などのグラム陰性菌の細胞壁成分である

lipopolysaccharide (LPS) 15 mg/kg 腹腔内投与により、敗血症モデルを作成(断りのないものは、LPS 投与後 3 時間でサンプリング)。HO-1 誘導群には、LPS 投与前に HO-1 の代表的な誘導剤である Cobalt protoporphyrin (CoPP) 5 mg/kg を、隔日で 4 回皮下投与。

2) 敗血症による肝細胞傷害の生化学的及び組織学的評価

LPS 投与における肝細胞への影響を検討するため、血清中の alanine aminotransferase (ALT) を測定し、さらに Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を用いて肝細胞障害を組織学的に評価。

3) 敗血症早期における血中、肝臓中変動タンパクの同定

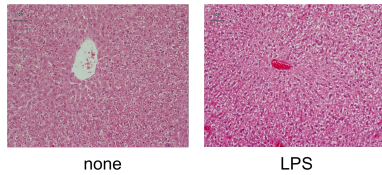
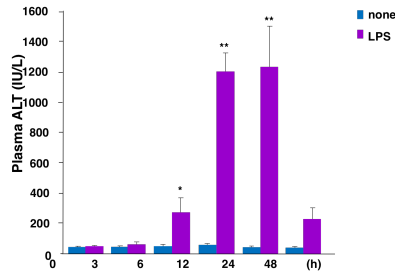
質量分析計は MALDI-TOF 型質量分析計 (MS) を用い、発現に変化を認めたタンパク質を比較検討し、敗血症の病態に関与すると考えられるタンパク質を同定。

4) 敗血症における変動タンパクの血中動態モニタリング

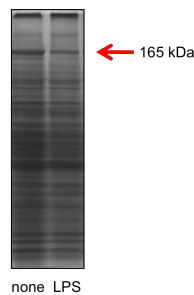
LPS 投与により、血清中の CRP や PCT 等の既存のマーカータンパクの上昇を確認するとともに、3) で同定された変動タンパクを経時的にモニタリングする。

4. 研究成果

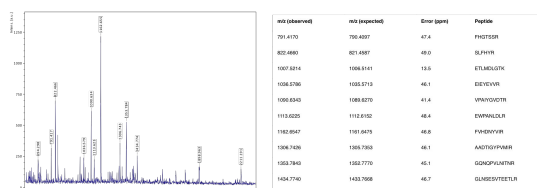
1) 既存の報告に基づき、敗血症群の肝細胞傷害を確認したところ、血中ALTの上昇、肝うっ血を認めた。



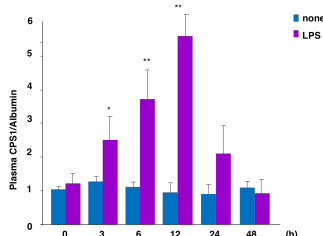
2) 肝ホモジネートサンプルの電気泳動ゲルを染色したところ、165 kDa 付近に明白な変動を示すタンパク質を認めた。



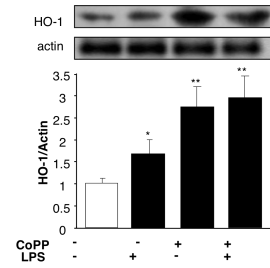
3) 2) で変動が認められたバンドを MS を用い同定したところ、肝ミトコンドリアに局在する carbamoyl phosphate synthase 1(CPS 1)である事が分かった。



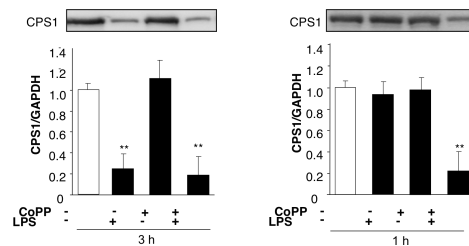
4) 血中 CPS1 が LPS 投与 3 時間というごく早期から上昇する事が示された。



5) HO-1 誘導の確認



6) 肝ホモジネートサンプルでは、CPS1 変動の時間は HO-1 誘導によって促進された。



(まとめ)

- ・LPS 投与後 3 時間の肝ホモジネートサンプルで、165 kDa 付近に明白な変動を示すタンパク質を認め、CPS1 である事が分かった。
- ・LPS 投与短時間(3 時間)で、血中 CPS1 の上昇、肝 CPS1 の低下を認めた。
- ・血中 ALT の上昇は LPS 投与後 6 時間より有意差が見られた。
- ・HO1 を誘導すると、肝 CPS1 の減少は促進された。

(考察)

- ・血中 CPS1 上昇は、敗血症の動物モデルでは、3 時間というごく早期に上昇するため、ヒトでの敗血症の早期診断に有用である可能性がある。
- ・血中 CPS1 上昇・肝 CPS1 低下の生じ始めの段階では血中 ALT の上昇はなく、逸脱以外の何らかの能動的なメカニズムで血中 CPS1 が上昇していると考えられた。
- ・HO-1 は LPS 投与時の細胞保護応答を早めている可能性が考えられた。

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 2 件)

1. Unuma K, Aki T, Matsuda S, Funakoshi T, Yoshida K, Uemura K. Inducer of heme oxygenase-1 cobalt protoporphyrin accelerates autophagy and suppresses oxidative damages during lipopolysaccharide treatment in rat liver. *Hepatol Res.* 2013 Jan;43(1):91-6.

2. Unuma K, Aki T, Matsuda S, Funakoshi T, Yoshida KI, Uemura K. Elimination and active extrusion of liver mitochondrial proteins during lipopolysaccharide administration in rat. *Hepatol Res.* 2012 Aug 1. doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.01084.x.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 鵜沼香奈、秋利彦、船越丈司、内田恭子、則竹香菜子、藤井祐介、上村公一. ヘムオキシゲナーゼ誘導剤は敗血症ラットの心筋障害をオートファジー活性化を介して軽減する. 97 次日本法医学会総会. 2013.
2. 鵜沼香奈、秋利彦、則竹香菜子、上村公一. プロテオーム及び in vivo 系を用いた敗血症における新たなバイオマーカーの同定. 96 次日本法医学会総会. 2012.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
東京医科歯科大学研究業績
<http://www.tmd.ac.jp/med/legm/gyouseki.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

鵜沼 香奈 (Unuma, Kana)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師
研究者番号：30586425

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：