

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2015

課題番号：26713024

研究課題名(和文)敗血症での一酸化炭素誘導によるオートファジー活性化と心筋保護効果に関する研究

研究課題名(英文)Cobalt protoporphyrin accelerates TFEB activation and lysosome reformation during LPS-induced septic insults in the rat heart.

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) 18,300,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症では心筋ミトコンドリアの障害、酸化ストレスが心機能障害に関与している事が知られている。今回、一酸化炭素を誘導したLPS投与敗血症ラット心において、障害ミトコンドリアのオートファジーによる分解・処理の促進と、この過程が転写制御因子EB(TFEB)によってコントロールされ協調的に発現する事が明らかになった。また、オートファジー阻害剤投与により他の臨床症状に先行して左室駆出率の低下が顕在化するが、CO誘導はこの低下の改善を示す事が分かった。以上より、LPS誘導敗血症心においてはCO誘導が細胞保護的に働き、さらに心機能障害の改善に働く事が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Lipopolysaccharide (LPS)-induced myocardial dysfunction is caused, in part, by mitochondrial dysfunction. In this study, we show that CoPPiX not only accelerates the autophagic response but also promotes lysosome reformation in the rat heart treated with LPS. Activation of TFEB was also observed, indicating a hyper consumption and subsequent reformation of the lysosome to meet the increased demand for autophagosome cleaning. CoPPiX was found to promote these processes and tended to restore the LPS-induced suppression of cardiac performances whilst chloroquine abrogates these beneficial effects. The cardioprotective effect of CoPPiX against LPS toxicity was also observed via decreased levels of cardiac releasing enzymes in the plasma. Taken together, our current data indicate that lysosome reformation mediated by TFEB may be involved in cardioprotection against LPS-induced septic insults, and serve as a novel mechanism by which CoPPiX protects the heart against oxidative stress.

研究分野：法医学

キーワード：敗血症 オートファジー 心臓 一酸化炭素 ヘムオキシゲナーゼ

1. 研究開始当初の背景

敗血症は、一旦発症すると循環動態障害や多臓器不全などを経て約半数が死に至る、極めて重篤な病態である。特に敗血症患者においては発症早期より心機能障害が観察され (Parker MM et al, Ann Intern Med. 100, 483-90, 1984)、ときに心原性ショック同様の重度の心筋障害から死に至る事から、法医剖検事例として経験する事が少なくないが、その詳細なメカニズムは明らかになっておらず、診断に苦慮する事が多い。

敗血症では心筋ミトコンドリアの障害、NOやROSなどの酸化ストレスが心機能障害に関与している事が知られている (Morisaki H et al, J Appl Physiol. 77, 1507-18, 1994; Khadour FH et al, Am J Physiol Heart Circ Physiol. 283, 1108-15, 2002)。近年、敗血症患者や敗血症モデル動物の各種臓器におけるオートファジーの証拠が示され、この病態において生じる障害ミトコンドリア等がリソソームへ送られ、分解・処理される事が明らかになり、敗血症の病態緩和への貢献が期待されているが、その分子機構の詳細は未解明である。ごく最近、この過程でオートファジーとリソソーム遺伝子双方が転写制御因子EB(TFEB)によってコントロールされ協調的に発現する事が報告された (Settembre C et al, Science. 332, 1429-33, 2011)。また、臓器特異的Atg5やAtg7 (オートファジー必須遺伝子) 欠損マウスを用いると、機能を消失した異常ミトコンドリアが蓄積し、酸化ストレスやゲノム傷害などが誘導され腫瘍形成などの一因になる事が報告された (Takamura A et al, Genes Dev. 25, 795-800, 2011)。そのため、障害ミトコンドリアのオートファジーによる除去は極めて重要であり、多方面での臨床応用が期待されている。

ヘムオキシゲナーゼ(HO-1)は、様々なストレスに応答して誘導されるヘム代謝酵素であり、抗酸化酵素としても知られている。その代謝過程で産生される一酸化炭素(CO)は、重要な循環調節因子であり、心筋梗塞他様々な病態から細胞を保護することが報告されている (Fujimoto H et al, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 24, 1848-53, 2004)。また、CO誘導動物に endotoxin を投与すると死亡率が低下し (Otterbein L et al, Am J Respir Cell Mol Biol. 13, 595-601, 2005) 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 (Carchman, EH et al, Hepatology. 53, 2053-2062, 2011) 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

酸化障害に関連したCO誘導またはオート

ファジー抑制が、LPS投与ラットの心筋細胞内ミトコンドリアのオートファジー誘導や心臓生理学的変化に対して、どのように寄与するかを解明し、この過程へのTFEBによる制御メカニズムの詳細を検討し、敗血症病態緩和への貢献と剖検診断の向上を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

1) 敗血症モデル、CO誘導及び抑制、オートファジー抑制群の作製
5週齢SD系雄性ラットにLPSを15 mg/kg腹腔内に1回投与により、敗血症モデルを作製する。CO誘導群には、LPS投与前に5.0 mg/kgのコバルトプロトポルフィリン(CoPP)を、隔日で4回皮下投与する。また、CO誘導群及び非誘導群に対して、それぞれLPS投与後にHO-1の競合的阻害剤である亜鉛プロトポルフィリン(ZnPP)を皮下注射し、HO-1抑制群とする。また、クロロキン(CQ)を投与しオートファジー阻害群とする。

2) 敗血症による心筋障害の生化学的及び組織学的評価
LPS投与における心筋細胞への影響を検討するため、血清中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)・心筋由来クレアチンキナーゼ(CK-MB)・心臓型脂肪酸結合タンパク(H-FABP)を測定する。また、コントロール群・LPS+CO誘導群及び非誘導群・各種阻害剤投与群から採取した心筋(心基部、心尖部)のパラフィン包埋ブロックより、厚さ2 µmの組織切片を作製し、ヘマトキシリンエオジン(HE)染色及びエラスチカマッソン(EM)染色を用いて心筋障害を組織学的に評価する。

3) オートファジーの評価
電子顕微鏡及びコンフォーカル顕微鏡により、敗血症モデルでのミトコンドリアやリソソーム等の細胞内小器官、オートファゴソームの出現などを指標としてオートファジーを観察する。また、上記2)と同様に、それぞれの群における変化を定量化するために、オートファジー発現の指標であるLC3, p62等の発現を免疫染色やImmuno blotting法により検討する。

4) 転写因子TFEBとオートファジー、リソソーム/ミトコンドリア再生機構の評価
脱パラした切片を抗TFEB抗体と反応させ、酵素抗体法または蛍光抗体法にてTFEBの活性化に伴う核移行の有無、超遠心器細胞分画法によるTFEBの核移行の有無、TFEBの核移行と相関したLC3のオートファゴソームへの局在の変化等について検討する。さらに、Immuno blotting法やリアルタイムPCR法にて、オートファジー、リソソーム/ミトコンドリア再生機構に関連する各種

遺伝子 (LC3, p62, LAMP1&2, COX, Cathepsin等)の活性化等について検討する。

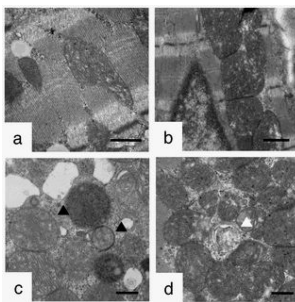
5) 心機能評価

心機能評価として、それぞれの群における心エコー指標を、処置前後に連続20心拍計測し、左室駆出率、左室短縮率、左室拡張期径・収縮期径、左室拡張期容量・収縮期容量等を計測する。

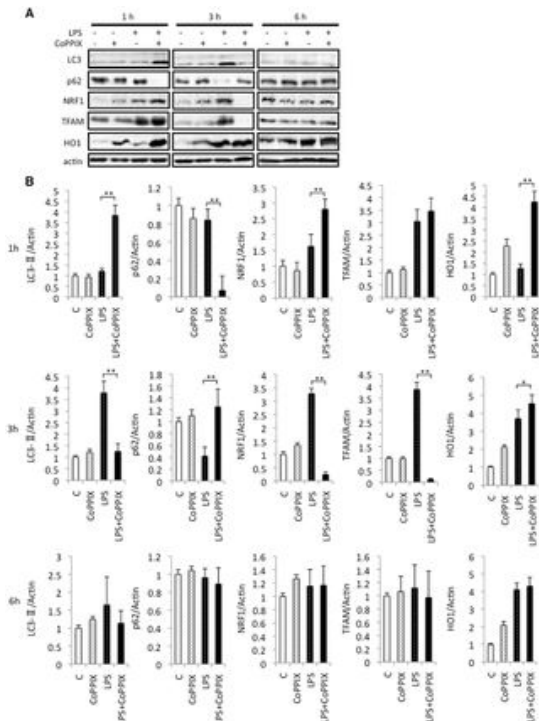
4. 研究成果

1) LPS 誘導敗血症モデル動物の心臓ではオートファジーが誘導され CO はその効果を促進することを電子顕微鏡を用いて形態学的に示した。

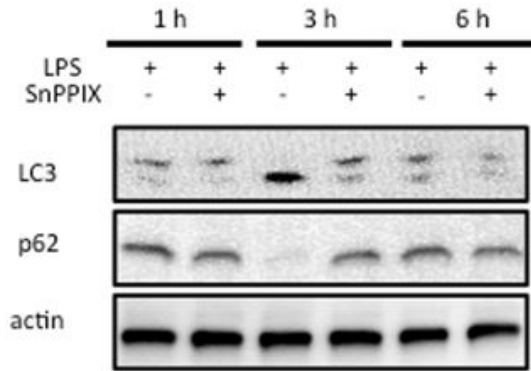
(a)コントロール、(b) CoPPIX、(c)LPS、(d)LPS+ CoPPIX



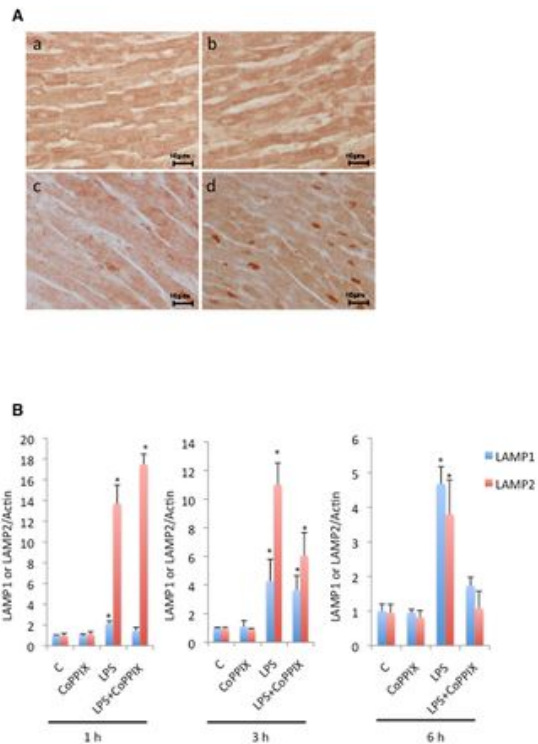
2) LPS 誘導敗血症モデル動物の心臓では CO 誘導によりオートファジーおよびミトコンドリア再生機構の誘導が促進されることを Immuno blotting 法により明らかにした。



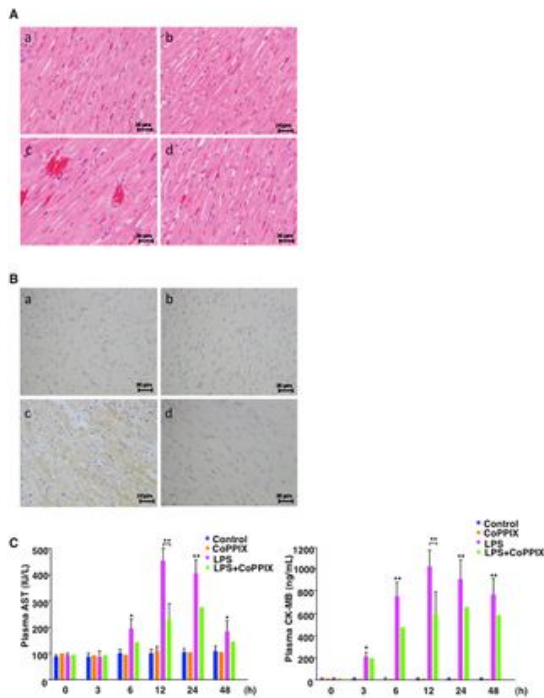
3) 亜鉛プロトポルフィリン (ZnPP) 投与による HO-1 抑制群では、LPS 誘導敗血症モデル動物の心臓におけるオートファジーを抑制する事が分かった。



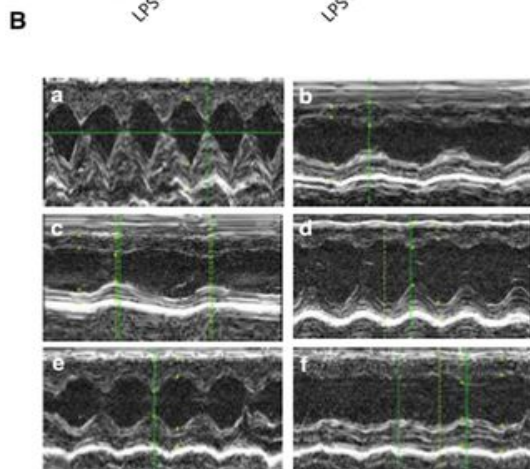
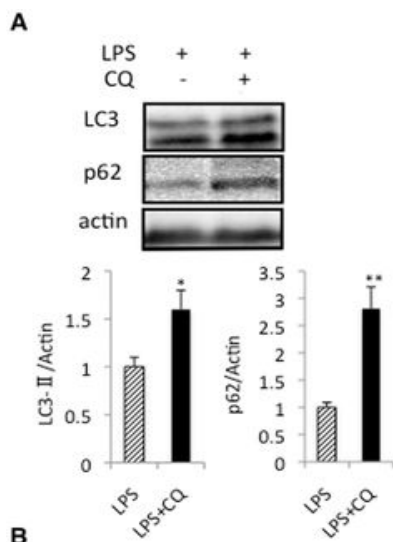
4) LPS 誘導敗血症モデル動物の心臓においては転写因子 TFEB の活性化に伴い核移行が見られる事が明らかになった。また TFEB の標的遺伝子である LAMP1, LAMP2 の mRNA は LPS 誘導および CO 誘導により活性化される事が明らかになった。



5) LPS 投与により心筋はうっ血し HNE には陽性を示す。また血清中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)・心筋由来クレアチンキナーゼ (CK-MB) の上昇が見られる。CO 誘導によりこれらの変化は軽減されることが分かった。



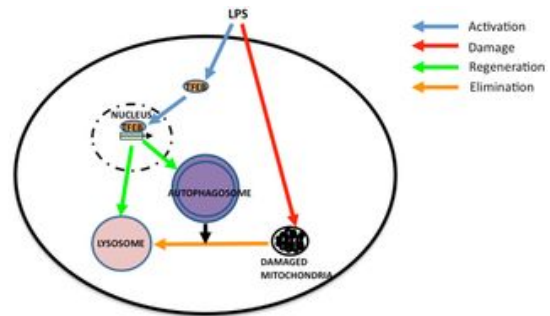
6) LPS 誘導敗血症モデル動物の心臓に、オートファゴソームとリソソームの融合阻害剤であるクロロキン(CQ)を投与すると、他の臨床症状に先行して心機能低下が認められ、これはCQ誘導により緩和されることが分かった。



	Control	LPS (2 h)	LPS+CoPPiX (2 h)	LPS (24 h)	LPS+CoPPiX (24 h)	LPS+CQ (24 h)
HR/BW (mg/g)	3.4±0.31	3.2±0.25	3.2±0.40	3.4±0.35	3.3±0.20	3.4±0.46
LVdL (mm)	5.7±0.09	5.5±0.06	5.5±0.29	7.3±0.41*	6.8±0.37*	5.5±0.38*
LVdS (mm)	3.2±0.06	3.23±0.12	3.4±0.15	3.1±0.15	3.5±0.17	3.25±0.20
LVFS (%)	71.2±4.5	37.7±1.9**	37.7±1.9**	37.5±1.9**	46.4±3.8**	34.5±4.1*
EF (%)	90±1.7	75.1±2.2**	75.8±1.8**	76.3±3.3**	81.8±2.8*	72.3±4.5*

Shown are heart-to-body weight ratio (HR/BW), left ventricular end-diastolic diameter (LVdL), left ventricular end-systolic diameter (LVdS), left ventricular fractional shortening (LVFS), and ejection fraction (EF). Each value represents the mean ± S.E. of four animals.
*p<0.05; **p<0.01 vs. Control.
*p<0.05; **p<0.01 vs. LPS (24 h).
#p<0.05 vs. LPS (24 h).
DOI:10.1371/journal.pone.0205265.t001

【 Model of organelle turnover during LPS administration in rat heart 】



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 11 件、全て査読有)

1. Okawa S*, Unuma K*, Yamada A, Aki T, Uemura K. Lipopolysaccharide induces expression of collagen VI in the rat lung. **Journal of Toxicologic Pathology**. 2015 Jan;28(1):37-41.

2. Yamada A, Aki T, Unuma K, Funakoshi T, Uemura K. Paraquat induces epithelial-mesenchymal transition resulting in the secretion of fibronectin and the prevention of apoptosis in human alveolar A549 cells. **PLoS One**. 2015 Mar 23;10(3):e0120192.

3. Watanabe M, Unuma K, Makino Y, Noritake K, Yamada A, Iwase H, Uemura K. An Autopsy Case of Acute Massive Hematochezia Caused by Superior Mesenteric Vein Thrombosis: A First Report in Forensic Medicine. **J Forensic Sci**. 2015 Aug 13.

4. Noritake K, Aki T, Funakoshi T, Unuma K, Uemura K. Direct Exposure to Ethanol Disrupts Junctional Cell-Cell Contact and Hippo-YAP Signaling in HL-1 Murine Atrial Cardiomyocytes. **PLoS One**. 2015 Aug 28;10(8):e0136952.

5. Uchida K, Unuma K, Uemura K. A fatality in a child with severe fatty liver due to n-butane and isopentane poisoning resulting from long-term inhalation of an antiperspirant aerosol. **Forensic Sci Med Pathol**. 2015 Dec;11(4):631-2.

6. Kuroda R, Shintani-Ishida K, Unuma K, Yoshida K. Immobilization Stress With α 2-Adrenergic Stimulation Induces Regional

and Transient Reduction of Cardiac Contraction Through Gi Coupling in Rats. **Int Heart J**. 2015 Sep 29;56(5):537-43.

7. Uchida K, Unuma K, Funakoshi T, Aki T, Uemura K. Activation of master autophagy regulator TFEB during systemic LPS administration in cornea. **J Toxicol Pathol**. 2014; 27(2):153-8

8. Watanabe M, Funakoshi T, Unuma K, Aki T, Uemura K. Activation of the ubiquitin-proteasome system against arsenic trioxide cardiotoxicity involves ubiquitin ligase Parkin for mitochondrial homeostasis. **Toxicology**. 2014 Aug 1;322:43-50.

9. Yamada A, Unuma K, Kojima H, Uemura K. Subarachnoid hemorrhage caused by a traffic accident: de novo aneurysm ruptured 30 years after surgical neck clipping. **J Forensic Leg Med**. 2014 Feb;22:90-2.

10. Kashima J, Shintani-Ishida K, Nakajima M, Maeda H, Unuma K, Uchiyama Y, Yoshida KI. Immunohistochemical study of the autophagy marker microtubule-associated protein 1 light chain 3 in normal and steatotic human livers. **Hepatol Res**. 2014 Jul;44(7):779-87.

11. Unuma K, Aki T, Funakoshi T, Yoshida K, Uemura K. Cobalt Protoporphyrin Accelerates TFEB Activation and Lysosome Reformation during LPS-Induced Septic Insults in the Rat Heart. **PLoS One**. 2014;8(2):e56526. doi: 10.1371/journal.pone.0056526.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 鶴沼 香奈、大川 紗由里、秋 利彦、山田 真嗣、上村 公一. 敗血症性肺障害モデルにおけるコラーゲン分子の変動. 99 次日本法医学会総会. 2015.6.10-12 高知市文化プラザ (高知県高知市)

2. 木村 遥、鶴沼 香奈、秋 利彦、上村 公一. Increase of MFG-E8 expression and its implications in vascular disorder by cocaine abuse. 第 88 回日本生化学会大会. 2015.12.1~4. 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

3. 船越丈司、秋利彦、田尻正輝、鶴沼香奈、上村公一. 覚せい剤原料ノルエフェドリン暴露による細胞内コレステロール蓄積とネクロトーシス誘導の解析. 第 38 回分子生化学会 2015.12.1~4. 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

4. 鶴沼香奈. 敗血症モデルにおける各種臓器不全の分子学的検討. 学術奨励賞受賞講演. 98 次日本法医学会総会. 2014. 6 月 19, 20 日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

5. 鶴沼香奈. 法医実務ベースに生じた疑問解明へのチャレンジ-敗血症とオートファジー. 第 12 回医科学研究発表会. 2014 年 9 月 18, 19 日、愛媛大学医学部 (愛媛県東温市)

6. Unuma K, Aki T, Funakoshi T, Uemura K.

Secretion of mitochondrial contents through autophagolysosomal exocytosis from lipopolysaccharide-stimulated hepatocytes and embryonic fibroblasts. The 9th International Symposium Advances in Legal Medicine. 2014. June 16-20, Fukuoka International Congress Center, Fukuoka, Japan

〔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

鶴沼 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 :