

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09254

研究課題名(和文)敗血症性急性腎障害におけるTLR9 - IL-17経路の役割の検討

研究課題名(英文) Investigation of the role of TLR9 - IL - 17 pathway in Septic AKI

研究代表者

辻 孝之 (TSUJI, Takayuki)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：30464126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症性急性腎障害におけるToll-like receptor 9 (TLR9)の下流の経路は明らかでない。Interleukin (IL)-17Aがその中心的役割を担っているという仮説をたて検証した。虫垂結紮穿孔による敗血症モデルを用いた。IL-17A欠損マウスでは野生種マウスより腎障害や炎症性サイトカイン産生、脾臓内アポトーシスは軽度で、生存率は良好であった。TLR9欠損マウスでは全身性のIL-17A産生が抑制されていた。野生種マウスの脾臓内 T細胞のIL-17A産生が亢進していたが、TLR9欠損マウスでは抑制されていた。敗血症ではTLR9がIL-17Aの産生を制御している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：It has not been elucidated that the downstream of Toll-like receptor 9 (TLR9) pathway in septic acute kidney injury (AKI). We hypothesized that Interleukin (IL)-17A plays a central role in it. Septic AKI was induced by cecal ligation and puncture (CLP). IL-17A knockout (KO) mice exhibited decreased serum creatinine levels and improved tubular damage score in cortex at 18 hours after CLP. Systemic inflammatory cytokines and splenic apoptosis were decreased at 18 hours after CLP in IL-17AKO mice compared with Wild type (WT) mice. Mortalities were less in IL-17AKO mice compared with WT mice after CLP. IL-17A levels of plasma were significantly higher in WT mice than Tlr9KO mice at 18 hours after CLP. Although IL-17A production of splenic T cells in WT mice was increased at 3 hours after CLP, its in Tlr9KO mice was suppressed. These findings suggest that TLR9 mediates IL-17A production in septic AKI.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：急性腎障害 敗血症 TLR9 IL-17

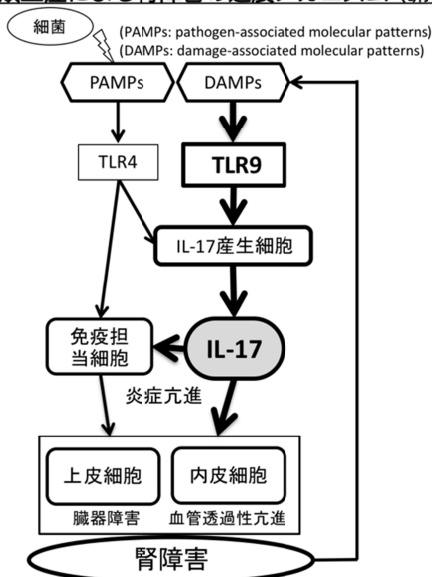
1. 研究開始当初の背景

侵入した細菌を Toll-like receptor (TLR) によって認識することから敗血症の生体反応は開始される。その生体反応が過剰になると Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) へ移行し、腎を含めた多臓器不全に至る。敗血症による腎障害の機序は明らかでなく、その病態解明と治療法の開発は重要な課題である。

我々は、細菌性腹膜炎による敗血症(Cecal ligation and puncture: CLP)誘発腎障害が細菌由来の DNA をリガンドとする TLR9 欠損で軽減されることを報告してきた。さらに、敗血症性腎障害時に内因性ミトコンドリア DNA が大量に全身循環すること、内因性ミトコンドリア DNA は TLR9 を活性化し腎障害を惹起することを明らかにした。このように敗血症での腎障害の進展に内因性ミトコンドリア DNA - TLR9 経路が関わっていることを明らかにしてきたが、TLR9 経路の下流に位置する腎障害に関わる因子はわかっていない。

Inter leikin (IL) -17(IL-17A)は、Th17 細胞及び $\gamma\delta$ T 細胞、好中球、単球、ナチュラルキラー(NK)細胞などから産生され、マクロファージや樹状細胞などの免疫担当細胞の活性化のみならず、腎を含めた各臓器の上皮細胞や血管内皮細胞上の IL-17 受容体に直接作用し、IL-6 や TNF- α などの炎症性サイトカインやケモカインの誘導、好中球の遊走を行うことによって、炎症誘導や感染防御に働く。今回我々は、IL-17A 欠損マウスは野生種と比較して CLP モデルによる腎障害が有意に軽減することを発見した。このことから、IL-17A は、TLR9 活性によって誘導されること、敗血症による急性腎障害を導く全身性免疫応答の中心的な役割を担っていること、さらに腎実質に存在する IL-17 受容体に結合し腎内への炎症細胞浸潤を誘導しているという仮説を立てた(図 1)。

図1：敗血症による腎障害の進展メカニズム (研究仮説)



2. 研究の目的

本研究の目的は、敗血症では TLR9 経路を介して IL-17A が産生され腎障害を惹起するという仮説を検証し、IL-17A が予後を改善する治療ターゲットとなりうるか、また早期診断、血液浄化療法の開始基準や予後予測のバイオマーカーとなるかを検討することである。

3. 研究の方法

(1) IL-17A による全身性免疫応答と腎内への炎症細胞浸潤を検討する。

IL-17A 欠損マウスの CLP モデルでの腎障害、生存率、全身性免疫応答(サイトカインやケモカイン、脾臓内アポトーシス)を検討する。また、IL-17A によって腎内へ炎症細胞浸潤が誘導されるか検討する。

(2) IL-17A 産生細胞を同定する。

野生種の CLP モデルにおいて、血中、腹水中および脾臓内のどの免疫担当細胞が IL-17A を産生しているかフローサイトメトリーを用いて検討する。

(3) TLR9 が敗血症において IL-17A 産生を制御しているか明らかにする。

TLR9 のリガンドであるミトコンドリア DNA を投与し、TLR9 の下流として IL-23 や IL-17A が誘導されるか検証する。TLR9 欠損マウスの CLP モデルにおいて、(2)と同様に IL-17A 産生細胞の動態を解析する。さらに、TLR9 欠損マウスや IL-17A 欠損マウスに、(2)で同定した野生種由来の IL-17A 産生細胞を移植した後に CLP を作成し、血中 IL-17A の動態、腎障害や生存率を検討する。

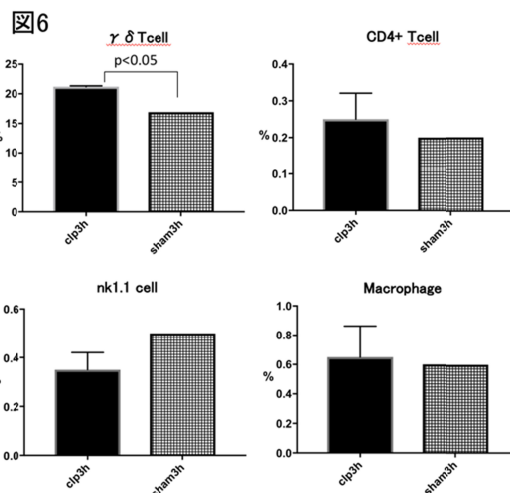
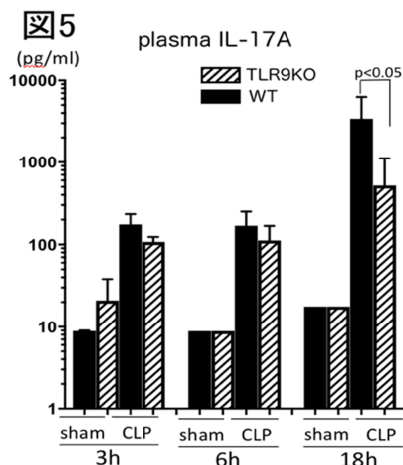
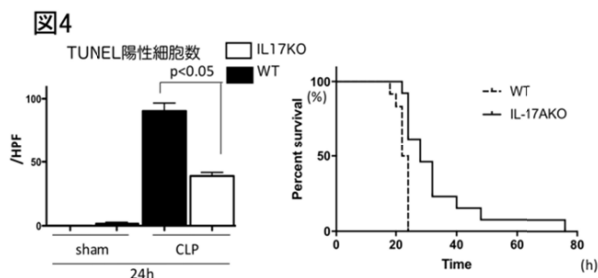
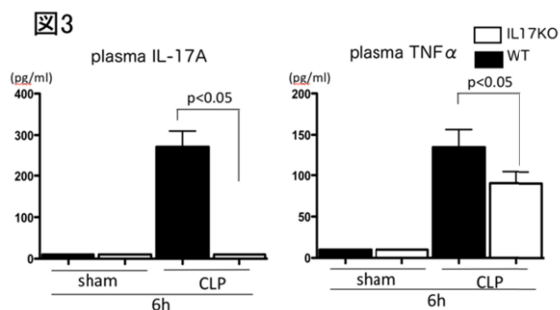
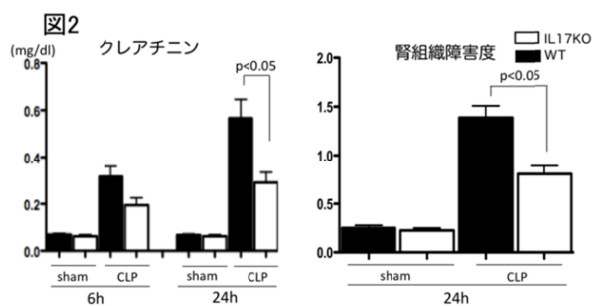
(4) 血中 IL-17A や IL-17A 産生細胞が敗血症による腎障害の早期診断や予後予測の新規バイオマーカーに臨床応用できるかを明らかにする。(臨床研究)

敗血症による腎障害患者や急性血液浄化を必要とする重症敗血症患者の血中 IL-17A 濃度の測定。また、フローサイトメトリーにて末梢血中の IL-17A 産生細胞を同定する。敗血症患者重症度(SOFA スコアや APACHE スコアなど)、腎障害重症度、その他の腎障害バイオマーカーとの相関を解析することで、早期診断や予後予測、血液浄化療法開始基準となるかを明らかにする。

4. 研究成果

2015 年度は、IL-17 (IL-17A) 欠損マウスを用いて Cecal ligation and puncture (CLP) による敗血症モデルを作成し、IL-17 欠損マウスでは野生種マウスより有意に腎障害(血清クレアチニン値 24 時間; 野生種 0.56 ± 0.23 mg/dL, IL-17 欠損マウス 0.29 ± 0.16 mg/dL, $p < 0.05$) (図 2)や全身性の炎症性サイトカイン産生(図 3)、脾臓内アポトーシス(図 4)、などが軽減していることを示した。2016 年度は、IL-17 欠損マウスでは野生種マウスより有意に敗血症の生存率が改善すること

を示した(図4)。またTLR9欠損マウスでは、敗血症モデルによる全身性のIL-17産生が抑制されていた(図5)。2017年度は、野生種マウスの脾臓内の細胞(NK細胞、Mφ、CD4陽性T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞)のうち、 $\gamma\delta$ T細胞のみにおいてIL-17産生がCLP後早期から亢進していることをフローサイトメトリーによる解析にて示した(図6)。さらに、TLR9欠損マウスの脾臓内 $\gamma\delta$ T細胞では、これらは抑制されていた。これらの結果は、敗血症早期においては、TLR9がIL-17の産生を制御している可能性を示唆している。現在、野生種あるいはTLR9欠損マウスにCLPを施行した後の脾臓内T細胞をTLR9欠損マウスに移植した後にCLPを作成し、血中IL-17Aの動態、腎障害や生存率を検討している。また敗血症患者における血中IL-17Aの動態を検討している。



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. Tsuji N, Tsuji T, Ohashi N, Kato A, Fujigaki Y, Yasuda H. Role of Mitochondrial DNA in Septic AKI via Toll-Like Receptor 9. *J Am Soc Nephrol.* 2016 Jul;27(7):2009-20.

2. 辻孝之, 辻尚子, 加藤明彦, 安田日出夫 : 尿中バイオマーカー Kidney Injury Molecule 1 (KIM-1) の臨床評価と生物学的役割 : 日本急性血液浄化学会雑誌 vol.8-1 2017.06

〔学会発表〕(計4件)

1. 発表者名 : Takayuki Tsuji, Daiki Goto, Takashi Matsuyama, Souichiro Nagata, Taichi Sato, Yoshitaka Naito, Naoko Tsuji, Naro Ohashi, Akihiko Kato, Hideo Yasuda : General Surveys for the Awareness of Hospital-Acquired Acute Kidney Injury and Referral to Nephrology - A Single Center Analysis.

学会等名 ISN(International Society of Nephrology) Frontiers Meetings 2018

発表年月日 2018年2月24日

発表場所：東京

2. 発表者名：辻尚子、佐藤太一、内藤善隆、辻孝之、加藤明彦、安田日出夫
発表標題：ヒト敗血症における循環ミトコンドリアDNAの解析・エクソソーム分画と遊離分画の検討。
学会等名 日本腎臓学会
発表年月日：2017年5月27日
発表場所：東京

3. 発表者名：辻孝之、辻尚子、加藤明彦、安田日出夫
発表標題：AKIに対する尿中 KIM-1 (Kidney Injury Molecule-1)のバイオマーカーとしての近年の評価と生物学的役割について
学会等名 日本急性血液浄化学会学術集会
発表年月日：2016年10月29日
発表場所：東京

4. 発表者名：辻孝之、辻尚子、石垣さやか、岩倉考政、磯部伸介、小野雅史、坂尾幸俊、大橋 温、加藤明彦、安田日出夫
発表標題：敗血症性急性腎障害におけるIL-17Aの役割
学会等名 日本腎臓学会 学術総会
発表年月日：2015年6月5日
発表場所：名古屋

〔図書〕(計1件)

1. 辻孝之、加藤明彦：AKIバイオマーカーの臨床応用：腎臓内科・泌尿器科 第3巻第1号、2016年1月

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者
辻 孝之 (TSUJI, Takayuki)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号：30464126

(2)研究分担者
安田 日出夫 (YASUDA, Hideo)
浜松医科大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：60432209

(3)連携研究者
杉本 健 (SUGIMOTO, Ken)
浜松医科大学・医学部・准教授
研究者番号：20529507

(4)研究協力者
辻 尚子 (TSUJI, Naoko)