

令和元年6月4日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11431

研究課題名(和文)敗血症における男性予後改善の治療標的としてのIL-18の可能性

研究課題名(英文) Possibility of IL-18 as a therapeutic target to improve outcomes of sepsis in male

研究代表者

小谷 穰治 (KOTANI, JOJI)

神戸大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：80360270

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)：1)敗血症急性期における内因性IL-18は雌性の生存に有利な役割を果たすことが生存率実験で示された。2)内因性IL-18はICAM-1 mRNA発現と血管内皮への好中球接着に雄KOでは促進的に、雌性では抑制的な役割を持つことが示された。雌でのこの働きは卵巣由来の女性ホルモンによるものではない可能性が示唆された。3)内因性IL-18は雄性ではNETs形成を促進するが、雌性では抑制し、この働きは卵巣由来の女性ホルモンによるものではない可能性が示唆された。4)内因性IL-18は女性ホルモンの少ない雌性においてエストロゲンレセプターの発現を促進する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症などの重症病態において女性ホルモンが生存に有利に働くことは知られているが、その仕組みは複雑で、不明な点は多い。また、男性及び閉経後の女性においては女性ホルモンが少なく、生存に不利な条件と言える。本研究によって内因性のIL-18が女性の生存に大きな影響を及ぼす可能性が明らかとなり、性差による違いについて、新しい可能性を示唆することが出来た。また、女性ホルモンが減少した状態においても、女性ホルモンの感受性に何らかの影響を及ぼしている可能性があり、閉経後女性の予後改善などにも繋がる基礎データであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：1) Endogenous IL-18 plays a role to improve survival in female but not in male in acute phase of sepsis. 2) Endogenous IL-18 promotes ICAM-1 mRNA expression and adhesion of neutrophils to vessels male, however, it suppresses these phenomena in female. 3) Endogenous IL-18 promotes NETs formation in male, but suppress it in female. This suppression in female is possibly not caused by estrogen. 4) Endogenous IL-18 promotes estrogen receptor in female with decreased secretion of estrogen.

研究分野：救急医学、免疫

キーワード：性差 敗血症、好中球 Interleukin-18 肺傷害

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

敗血症では血中のサイトカイン濃度が上昇し、種々の臓器に影響を与えることが予後を大きく左右している。IL-6 や TNF などのサイトカインは TLR などからの刺激により NF- $\kappa$ B を介して産生されるが、IL-1 $\beta$  や IL-18 といったサイトカインはインフラマソームの形成が分泌に重要な役割を持つ( )。患者予後には性別が関与しており、女性の生存率が良いことが種々の研究で示されている( )が、最近では、インフラマソームと性差についての報告もなされてきており( )。インフラマソームにより分泌が制御されるサイトカインは、敗血症での男性致死率の高さ( )に関係しているかもしれない。我々は、これまでに IL-18 knock out マウスを用いた検討で、高濃度の内因性 IL-18 が雄のエンドトキシン血症において病態悪化に深く関与していることを明らかにしてきた。

### 2. 研究の目的

本研究は IL-18 が女性ホルモンの少ない患者(男性や閉経後の女性)における敗血症の予後改善に有効であるかどうかの基礎的データを確立することを目的としたものである。

### 3. 研究の方法

#### 1) 卵巣摘出モデルの作成

雌の C57BL/6J マウス (wild type; WT) または IL-18KO (KO) マウスを 4 週令の時点で背部から卵巣摘出し、ovariectomy (OVX) 群とした。雄、および雌マウスにおいても背部に sham operation を施し、OVX 群と同条件となるようにした。その後、7-8 週令の時点で雌および OVX 群の膣口スメアを採取し、性周期を確認し、OVX 群では性周期が止まり、女性ホルモンの分泌が低下していることを確認した。

#### 2) 敗血症モデルの作成

9-12 週令の WT および KO の雄性、雌性、および OVX マウスを使用し、腹部正中切開により盲腸を結紮し、22 G 針で結紮部位より下を貫通させることで盲腸内容物を腹腔内に持続的に漏出させる盲腸結紮穿孔 (cecal ligation and puncture; CLP) モデルを作製した。穿孔後盲腸は腹腔内に戻し、開腹部位を閉じ、背部に生理食塩水 1 mL を皮下注射し、脱水を予防した。

#### 3) 生存率の確認

術後 8 日間まで生存率を確認し、マウスの状態は敗血症スコア( )を用いて正常 0 点とし、最大 28 点として評価した。ただし、25 点を超える場合はこれまでの検討からその後の回復が認められないことが明らかであるため、28 点を評価する前に安楽死とした。

#### 4) 検体採取

生存率の結果から、術後 6 時間と 24 時間の時点で安楽死せしめ、6 時間では肺、肝臓の RNA と蛋白質を採取した。24 時間では末梢血の採取と、肺、肝臓の病理組織、および RNA と蛋白質を採取した。

#### 5) 生化学項目の検討

24 時間後の血漿から、肝機能 (AST, ALT, ビリルビン (t-Bil)), 腎機能 (BUN, クレアチニン (Cre)), LDH, アミラーゼ (AMY) を外注検査にて測定した。

#### 6) 好中球数の測定

組織のパラフィン切片を作成し、ナフトール AS-D クロロアセテート染色を行い 200 倍視野で各 5 視野ずつの好中球数を平均した。核染色はヘマトキシリンを用いた。

#### 7) 好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps; NETs) の染色

パラフィン切片を抗シトルリン化ヒストン H3 抗体および好中球エラスターゼ抗体を用いて蛍光免疫染色した。核染色には DAPI を用いた。200 倍視野で各 6 視野ずつ撮影し、Image J を用いてシトルリン化ヒストン陽性かつ好中球エラスターゼ陽性部位を NETs として面積を測定した。

#### 8) リアルタイム PCR

quantitative RT-PCR 法を用いて肺における CXCL5、ICAM-1、アロマトラーゼおよびエストロゲンレセプター (ER) の mRNA 発現量を CT 法にて WT 雄を基準として確認した。内部標準は内部標準確認用キットに含まれる 13 種類の内部標準候補を用いて検討し、qbase+ を用いて最も群間で変動の少ない安定した内部標準として Atp5f1 を選んだ。

#### 9) 統計学的解析

正規性が認められるデータの 2 群間比較には Student-t 検定または Welch's t 検定を F 検定の結果をもとに用いた。多重比較検定には Tukey-Kramer's post hoc test を用いた。正規性が認められないデータの 2 群間比較には Mann-Whitney's U 検定を用いた。多重比較検定には Steel-Dwass 法を用いた。生存率には Kaplan-Meier 法と log-rank test を用いた。

### 4. 研究成果

#### 1) 敗血症急性期における内因性 IL-18 は女性の生存に有利な役割を果たす

CLP 施行 8 日後の各群の生存率は、WT 雄 44.4%、WT 雌 100%、WT OVX 87.5%、KO 雄 37.5%、KO 雌 50.0%、KO OVX 85.7% であった (図 1A)。WT においては雄よりも雌で有意 ( $p < 0.05$ ) に生存率を改善した。また、IL-18KO により、雌でのみ生存率が有意に悪化 ( $p < 0.05$ ) する結果が得られた。

これまでのエンドトキシン血症による敗血症モデルでは、IL-18KO により雄のみ有意に生存率が改善するデータが得られていたため、CLP による敗血症モデルでは IL-18KO による雄の生存率改善は認められなかった。これは、血中の IL-18 濃度がエンドトキシン血症では 10,000 pg/mL を超える値となる( )が、CLP モデルでは 500 pg/mL 程度までしか上昇しなかったこと( )が関係していると考えた。さらに、これまでの研究から、敗血症患者における IL-18 濃度は 500~4000 pg/mL 程度であったため( )、CLP モデルの方がより臨床的な病態を反映していると考えた。従って、雌性においては敗血症病態における内因性 IL-18 が生存に重要な役割を果たすと考えられる。また、CLP 施行後 4 日間のマウス行動による敗血症スコア( 図 1B,C)では、雄では WT、KO とも高く、特に術後 24 時間までの値が高いことが明らかとなった。雌では WT は 24 時間後の値も低く、常に雄よりも有意にスコアが低かったが、KO は 24 時間までのスコアが雄と同様であった。OVX では WT は生存率・敗血症スコアとも雄と雌の中間をとり、KO しても生存率は変化しなかった。また、敗血症スコアも WT と KO でほぼ同じであった。

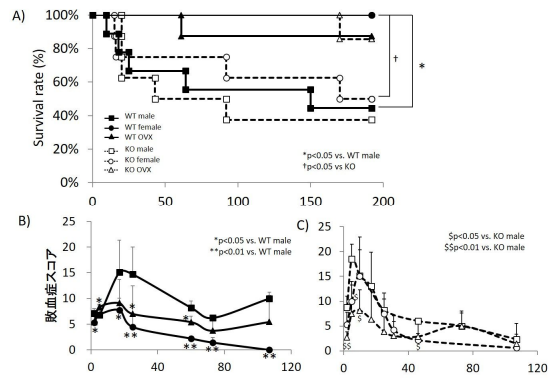


図1. 生存率と敗血症スコア

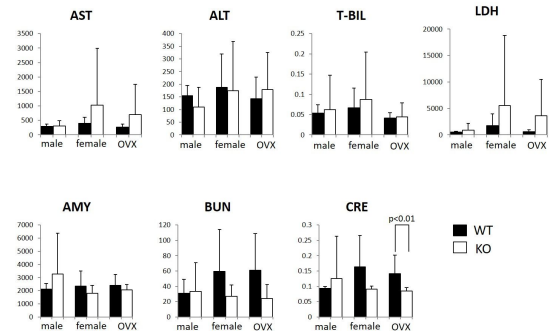


図2. CLP24時間後における生化学項目の変化

## 2) 肺における ICAM-1 mRNA 発現への内因性 IL-18 の役割は性別によって異なる

生存率の結果より、術後 24 時間までの変化がその後の生存率に大きく関与すると考え、術後 24 時間における血中生化学物質の変化について検討したが、いずれのマーカーにおいても統計学的に有意な差は認められなかった( 図 2)。つまり、肝臓、腎臓などには 24 時間時点で各群に大きな差は認められなかったため、肺における病変が生存率に大きく影響していると考えた。

そこで、CLP24 時間後の肺の好中球集積と NETs について検討した。肺に集積した好中球数には各群で統計学的な有意差は認められず( 図 3)、いずれの群においても CLP により間質が肥厚し、好中球が集積した像が認められた。好中球の走化因子として CXCL5、血管内皮側の接着因子として ICAM-1 の CLP 後 6 時間及び 24 時間における mRNA を定量したが、CXCL5 に関しては発現量が少なく、群間に差は認められなかった( 図 4A)。ICAM-1 に関しては( 図 4B)、6 時間後の発現量は WT 雄に比べて雌で有意に減少( $p < 0.01$ )し、雌に比べて OVX では有意に増加した( $p < 0.05$ )ことから、卵巣由来の女性ホルモンは好中球の血管内皮への接着を抑制していると考えられた。この時、雄 KO では WT に比べ ICAM-1 mRNA が有意に減少( $p < 0.01$ )し、内因性 IL-18 が血管内皮への好中球接着促進に関与すると考えられたが、雌 KO では有意に増加( $p < 0.01$ )、OVX でも KO で有意に増加( $p < 0.05$ )が認められたことから、雌性では内因性 IL-18 は好中球の血管内皮への接着を抑制することに関与し、この働きは卵巣由来の女性ホルモンによるものではない可能性が示唆された。

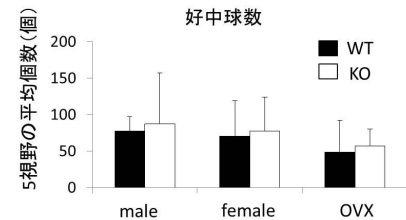


図3. 肺における好中球集積

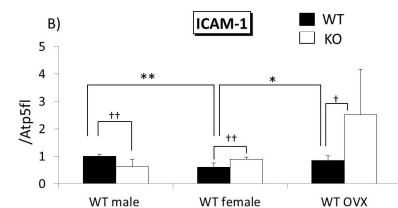
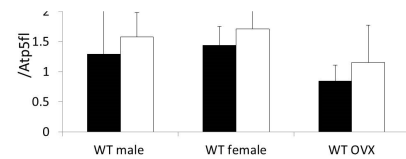


図4. 肺での走化因子、接着因子の mRNA 定量

## 3) 肺における NETs 形成への内因性 IL-18 の役割は性別によって異なる

NETs は WT では雄よりも雌で有意な減少( $p < 0.01$ )が認められ、OVX においても雌と同様に有意に減少( $p < 0.01$ )した( 図 5)。従って、肺における NETs は雌性よりも雄性で形成されやすく、卵巣由来の女性ホルモンが減少している状態であっても雌性であれば形成は雄性に比べて少ないことが明らかとなった。また、KO の状態では雄は WT に比べて有意に NETs 形成が減少( $p < 0.01$ )したのに対し、雌及び OVX では有意に増加( $p < 0.01$ )しており、内因性 IL-18

は雄性では NETs 形成を促進する方向に、雌性では抑制する方向に働き、この働きは卵巣由来の女性ホルモンによるものではない可能性が示唆された。

4) 内因性 IL-18 は女性ホルモンの少ない雌性においてエストロゲンレセプターの発現を促進するかもしれない

ICAM-1 及び NETs について、OVX であっても雌と同様の結果が得られていることから、肺内でエストロゲンの生合成が亢進している可能性を考えた。そこで、エストロゲン生合成に必要なアロマトラーゼの mRNA 発現と、エストロゲンレセプターとして生殖器以外の臓器で広く確認される ER の mRNA 発現を確認した。結果、WT, KO に関わらず、雄雌ともに肺におけるアロマトラーゼや ER の発現量には有意差は認められなかったが、OVX の場合には KO でアロマトラーゼ mRNA 発現が増加 ( $p < 0.05$ )、ER mRNA 発現が減少 ( $p < 0.01$ ) したことから、内因性 IL-18 は雌性において卵巣由来の女性ホルモンが減少した場合、アロマトラーゼの mRNA 発現を抑制し、ER の mRNA 発現を促進する可能性が考えられた。アロマトラーゼの発現については蛋白レベルでの確認が必要と考えているが、肺における ER の発現が内因性 IL-18 で増加するとすれば、女性ホルモンが減少する閉経後の女性の敗血症においては内因性 IL-18 が女性ホルモンへの感度を高めている可能性もある。IL-18 と女性ホルモンの関係については OVX マウスにおいてインフラマソーム活性が上昇し、IL-18 濃度が上昇することがホルモン減少による鬱症状に関連する報告が為されたり( )、エストロゲンが IL-18 レセプター発現を抑制する( )など、いくつかの報告がある。本実験における血中 IL-18 濃度及び mRNA 発現量は、有意差は認められなかったが OVX で雌に比べやや高い傾向にあった(データ示さず)。しかし、IL-18 と ER の関連や、敗血症における閉経後女性についての詳細な検討などは為されておらず、本研究が初めて言及した内容であるとされており、今後さらに詳細な検討を続ける必要がある。

#### <引用文献>

- Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 140(6), 2010, 821-832.
- Trentzsch H, Nienaber U, Behnke M, Lefering R, Piltz S. Female sex protects from organ failure and sepsis after major trauma haemorrhage. *Injury*. 45 Suppl 3, 2014, S20-28.
- Slowik A, Beyer C. Inflammasomes are neuroprotective targets for sex steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 153, 2015, 135-143.
- Ganz M, Csak T, Szabo G. High fat diet feeding results in gender specific steatohepatitis and inflammasome activation. *World J Gastroenterol*. 14;20(26), 2014, 8525-8534.
- Yang CA, Huang ST, Chiang BL. Sex-dependent differential activation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes in SLE macrophages. *Rheumatology (Oxford)*. 54(2), 2015, 324-331.
- Ueda T, Aoyama-Ishikawa M, Nakao A, Yamada T, Usami M, Kotani J. A simple scoring system based on neutrophil count in sepsis patients. *Med Hypotheses*. 82(3), 2014, 382-386.
- Shrum B, Anantha RV, Xu SX, Donnelly M, Haeryfar SM, McCormick JK, Mele T. A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model. *BMC Research Notes* 7, 2014, 233.
- Aoyama M, Kotani J, Usami M. Gender difference in granulocyte dynamics and apoptosis and the role of IL-18 during endotoxin-induced systemic inflammation. *Shock*. 32(4), 2009, 401-409.
- Yamashita H, Ishikawa M, Inoue T, Usami M, Usami Y, Kotani J. Interleukin-18 Reduces Blood Glucose and Modulates Plasma Corticosterone in a Septic Mouse Model. *Shock*. 47 (4), 2017, 455-462.
- Yamada T, Aoyama-Ishikawa M, Yamashita H, Fujiwara M, Usami M, Ueda T, Terashima M, Kohama K, Nakao A, Kotani J. IL18 production and IL18 promoter polymorphisms correlate with mortality in ICU patients. *In Vivo*. 28(3), 2014, 391-396.
- Xu Y, Sheng H, Bao Q, Wang Y, Lu J, Ni X. NLRP3 inflammasome activation mediates estrogen deficiency-induced depression- and anxiety-like behavior and hippocampal inflammation in mice. *Brain Behav Immun*. 56, 2016, 175-186.
- Otusku M, Kusumoto K, Murakami Y, Kanayama M, Takeuchi S, Takahashi S. Expression of interleukin-18 receptor mRNA in the mouse endometrium. *J Reprod Dev*. 53, 2007, 59-68.

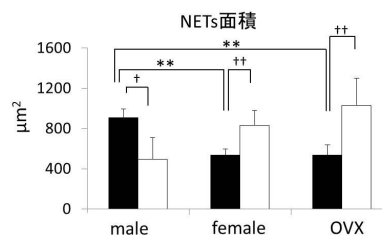


図5. 肺における好中球細胞外トラップ

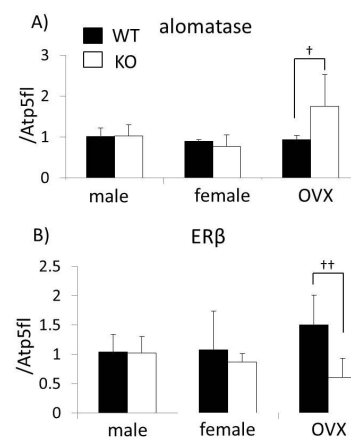


図6. 肺におけるアロマトラーゼ、ERβ mRNA定量

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名: 石川倫子

ローマ字氏名: Michiko Ishikawa

所属研究機関名: 兵庫医科大学

部局名: 救急・災害医学講座

職名: 非常勤講師

研究者番号(8桁): 40566121

### (2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。