

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09414

研究課題名(和文)敗血症性脳症の発症メカニズム解明とIL-18をターゲットとした新規治療戦略

研究課題名(英文)IL-18 as a therapeutic target for sepsis-associated encephalopathy and long-term prognosis of septic mouse

研究代表者

小谷 穰治 (Joji, Kotani)

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症後症候群の緩和と治療戦略の構築を目的として、その主要因となる敗血症性脳症の発症機序とIL-18の関与について検討した。

マウスの腹腔内に盲腸内容物を注射し、敗血症を誘導した。敗血症誘導から8日目に、脳において炎症性サイトカインの有意な発現を認め、IL-18は変化が認められなかった。脳の炎症を惹起すると予測されるミクログリア、アストロサイト、好中球、単球、およびT細胞は、敗血症誘導後、すぐに脳内に増加した。敗血症誘導から一週間後に行った行動試験において、有意な認知、精神、運動機能の低下が認められた。敗血症誘導から半年後に行った行動試験において、顕著な認知と運動機能の低下が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医療技術等の革新により敗血症生存者は増加している一方、彼らの予後は不良である。モデルマウスの実験では、本研究においてターゲットとしていたIL-18は残念ながら顕著な変動は認められなかったが、敗血症性脳症の発症や緩和に脳で増加するT細胞が関与することが明らかとなり、新たな治療ターゲットとして提案することができた。

また、これまで敗血症誘導から一年以上経過したマウスの行動試験を行った知見は、本研究以外にはない。有意ではなかったが敗血症マウスの生存率の低下や、顕著な認知、運動機能の低下が認められたことは、一部、ヒトにおける既知の知見と合致した。今後、治療モデルとして貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To investigate whether interleukin (IL)-18 involves in the pathogenesis of sepsis-associated encephalopathy (SAE), we analyzed the expression of inflammatory cytokines in the brain after sepsis. On day 8 after sepsis induction with the mouse, significant expression of inflammatory cytokines was observed in the brain, but IL-18 was not changed. Microglia, astrocytes, neutrophils, monocytes, and T cells, which are predicted to induce brain inflammation, increased immediately after the induction of sepsis. Significant cognitive, mental, and physical impairments were observed in each behavioral test of septic mice performed one week after sepsis induction. 6, 12, and 18 months after sepsis induction, significant cognitive and physical impairments were observed in the septic mice compared with control mice.

研究分野：災害救急医学

キーワード：敗血症性脳症 IL-18 敗血症後症候群

1. 研究開始当初の背景

敗血症患者における長期予後不良の要因は不明な点が多いが、敗血症に伴う脳炎、敗血症性脳症 (SAE: Sepsis-associated encephalopathy) が、その要因の一つであることが示唆されている。SAE は感染に続発したびまん性の脳機能障害で、重症敗血症患者の 70% 以上に認められる。敗血症において SAE は生命予後不良因子の一つでありながら、特異的なバイオマーカーが存在しないため、臨床上認知されにくい。また、敗血症罹患後、比較的早期に認められることから、救命第一の現場では、SAE への介入が難しいのが現状である。加えて、SAE の病態は複雑で、血液脳関門の破綻、脳内シグナル伝達系の変化、脳内炎症・脳内神経伝達物質の分布異常など様々な要因が関与しており、治療方法は未だ確立していない。よって、敗血症患者の長期予後を改善するためには、SAE の発症機序の解明、それに基づいた治療戦略の構築が極めて重要である。

インターロイキン (IL) -1 β などの炎症性サイトカインは、脳のマクロファージ様細胞であるマイクログリアを活性化して脳内の炎症反応を惹起するため、SAE の発症に深く関連することが示唆されている。一方、IL-18 は、IL-1 β と同じスーパーファミリーに属するが、これまで SAE との関連性を示した研究はほとんどなされていない。しかしながら、IL-18 ノックアウトマウスに対する *Pneumococcal meningitis* の感染実験において、生存率の上昇および神経組織における炎症の抑制が認められており、IL-18 産生を制御する NLRP3 インフラマソーム、あるいは Caspase-1 の KO マウスを用いた研究では、加齢に伴う認知機能の低下が抑制されることが報告されている。よって、IL-18 は脳内での炎症反応におけるキープレイヤーの一つであり、その制御は、炎症により誘導される認知機能低下を抑制する上で重要だと考えられる。

2. 研究の目的

SAE の発症機序および敗血症患者の長期予後に IL-18 が重要な役割を担っていると考えられる。しかしながら、SAE の発症の詳細なメカニズムは不明であり、かつ、IL-18 が SAE に伴う精神、認知、運動機能障害との関連性も不明である。そこで本研究では、未だ詳細が不明である SAE の発症機序を解明し、IL-18 の SAE 発症における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、8~10 週齢の C57BL/6J マウスを用いた。敗血症の誘導はマウスの盲腸から抽出した盲腸内容物 (Ceecal slurry: CS) を腹腔内に投与することでモデルを作製した。また、対照群には Vehicle として 7.5% Glycerol を投与した。

研究 1. SAE の病態解明: マウスに体重 1g あたり 0.5 mg の CS を腹腔内投与することで敗血症を誘導した。敗血症誘導から経過時間的にマウスを麻酔下で犠牲せしめ、脳を抽出した。サイトカインの発現は quantitative PCR (qPCR) により解析し、フローサイトメーターによりグリア細胞 (マイクログリアとアストロサイト) および免疫細胞の変化を解析した。

研究 2. 敗血症モデルマウスの認知・精神・運動機能評価: 研究 1 と同様の方法により、マウスに敗血症を誘導した。敗血症誘導から 6~8 日、20~25 日目、6 ヶ月、12 ヶ月、18 ヶ月後に、マウスの認知 (新奇探索試験)・精神 (強制遊泳試験、ビー球埋め試験、オープンフィールド試験)・運動機能 (握力、トレッドミル試験) を評価した。

4. 研究成果

研究 1. SAE の病態解明

敗血症モデルマウスの脳における炎症・抗炎症性サイトカインの変化

敗血症誘導後、マウスの脳を 30 日目まで採取し、炎症・抗炎症性サイトカインを測定した。炎症性サイトカインである *Il-1 β* 、*Il-17* は敗血症誘導から 8 日目において高値であり、その後、低下した。しかしながら、*Il-18* については、このタイムコースでは変化が認められなかった。一方、抗炎症性サイトカインは、*Il-10* は 8 日目において低値、その後、回復した (図 1)。

敗血症モデルマウスの脳における免疫細胞の変化

敗血症誘導後マウスの脳におけるグリア細胞および免疫細胞の変化を解析した。マイクログリアは SAE の病態形成において最も中心的な役割をなすことが示唆されるグリア細胞であるが、この細胞は、敗血症誘導直後から増加し、少なくとも 30 日間、高値を維持した。lipopolysaccharide 投与により誘導される脳炎モデルでは、マイクログリアの Fractalkine 受容体 (CX3CR1) 発現が低下し、認知機能の低下を誘導することが知られる。そのため、マイクログリアの Fractalkine 受容体発現の変動を調べたところ、敗血症誘導 8~15 日目で低下し、その後、回復することが分かった (図 2A, B)。アストロサイトは敗血症誘導直後、その数は劇的に増加するが、8 日目では低下した (図 2C)。SAE の発症に関与することが報告された好中球と単球は、我々の研究においても敗血症誘導直後から脳内に増加することが分かった。単球はすぐに減少する一方で、好中球の減少は緩徐であった (図 2D)。T 細胞は、敗血症誘導後に一度減少したが、その後、増加した (図 2E)。T 細胞のフェノタイプを解析したところ、興味深いことに $\gamma\delta$ T 細胞は敗血症誘導 8~15 日目に最も増加した。また CD4⁺T 細胞は緩徐に増加し続けたのに対し、CD8⁺T 細胞は定常値に回

復した後は一定であった(図 3A)。脳内に増加した CD4⁺T 細胞の一部は制御性 T 細胞であったことが分かった(図 3B)。FTY720 の連続投与により脳へのリンパ球浸潤を阻害させたところ、敗血症マウスに認められる不安様行動の回復が遅れた(図 3C)。

研究 2. 敗血症モデルマウスの認知・精神・運動機能評価

敗血症モデルマウスの認知・精神・運動機能評価(6~8 日および 20~25 日目の結果)

敗血症誘導から 6~8 日目にマウスの認知(新奇探索試験)・精神(強制遊泳試験、ビー球埋め試験、オープンフィールド試験)・運動機能(握力、トレッドミル試験)を評価したところ、いずれの項目においても顕著な低下が認められた。ただ、この時点においては、試験開始時と比較して体重が回復していないことから、正確にこれらの評価を反映したものであるかは不明であった。一方、20~25 日目において、敗血症マウスの精神障害は対照群と変わらなかった(図 3C)。

敗血症モデルマウスの認知・精神・運動機能評価(6ヶ月、12ヶ月、18ヶ月後の結果)

敗血症誘導から半年以上経過した敗血症マウスの認知、精神、運動機能を評価した。有意な差は認めなかったが、対照群のマウスは全生存していたのに対し、敗血症マウスでは 70%まで減少しており(p=0.082)毛並みも不良であった。敗血症誘導から 6ヶ月後に行った新奇探索試験において敗血症マウスでは Recognition index の有意な減少を認め(図 4A)、海馬 CA1 領域における神経細胞数の減少も認め(図 4B)。敗血症誘導から 6ヶ月後と 18ヶ月後に行った強制遊泳試験では、群間に有意な差を認めなかった(図 4C)。運動機能評価として行った前肢の握力測定では 6ヶ月後で差を認めなかったものの、12ヶ月後、18ヶ月後では敗血症マウスで顕著に減弱していた(図 4D)。また、トレッドミル試験における総走行距離(Total mileage)においても、12ヶ月後、18ヶ月後では敗血症マウスで顕著に減少していた(図 4E)。18ヶ月の時点でマウスを麻酔下で犠牲せしめ、前脛骨筋を摘出した。対照群と比較して敗血症群では、前脛骨筋重量の有意な減少を認め、筋細胞の直径を示す Cross-section area が顕著に減少していた(図 4F, G)。

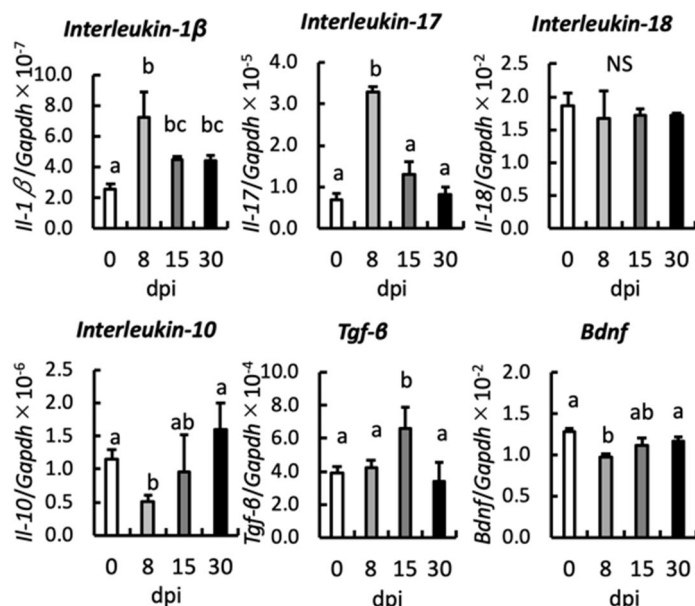


図 1. 敗血症誘導後の脳のサイトカイン発現の変化

C57BL/6J マウスに対し CS を投与することで敗血症を誘導し、その後、経過時間的に脳のサイトカイン発現を mRNA レベルで測定した。*Il-18* は変化なかったが、敗血症マウスの不安様行動が増悪していた時(6~8 日目)には、*Il-1* や *Il-17* の発現が増加していた。一方で、抗炎症性サイトカインである *Il-10* は、この時期は減少していた。

Tgf-β: Transforming growth factor-β; *Bdnf*: Brain-derived neurotrophic factor; dpi: days-post induction.

Tukey-Kramer test: $p < 0.05$ 異文字間で有意差あり。

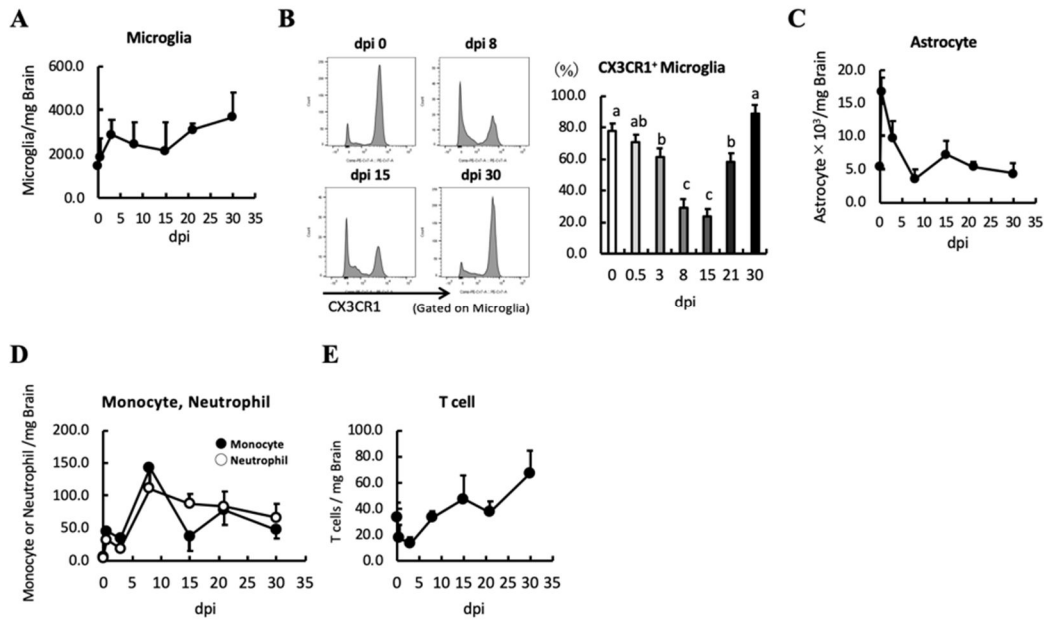


図 2. 敗血症誘導後の脳内におけるグリア細胞および免疫細胞の変化

敗血症誘導後、マイクログリアの数は増加し、少なくとも30日間は減少することはなかった(A)。しかしながら、その表現型は変化しており、8日と15日目にはCX3CR1陽性のマイクログリアの割合は顕著に減少した(B)。アストロサイトは敗血症誘導直後に増加した(C)。単球と好中球は8日目に最も増加した(D)。T細胞は緩徐だが、増加し続けた(E)。

CX3CR1: C-X3-C motif chemokine receptor 1; dpi: days-post induction。Tukey-Kramer test: $p < 0.05$ 異文字間で有意差あり。

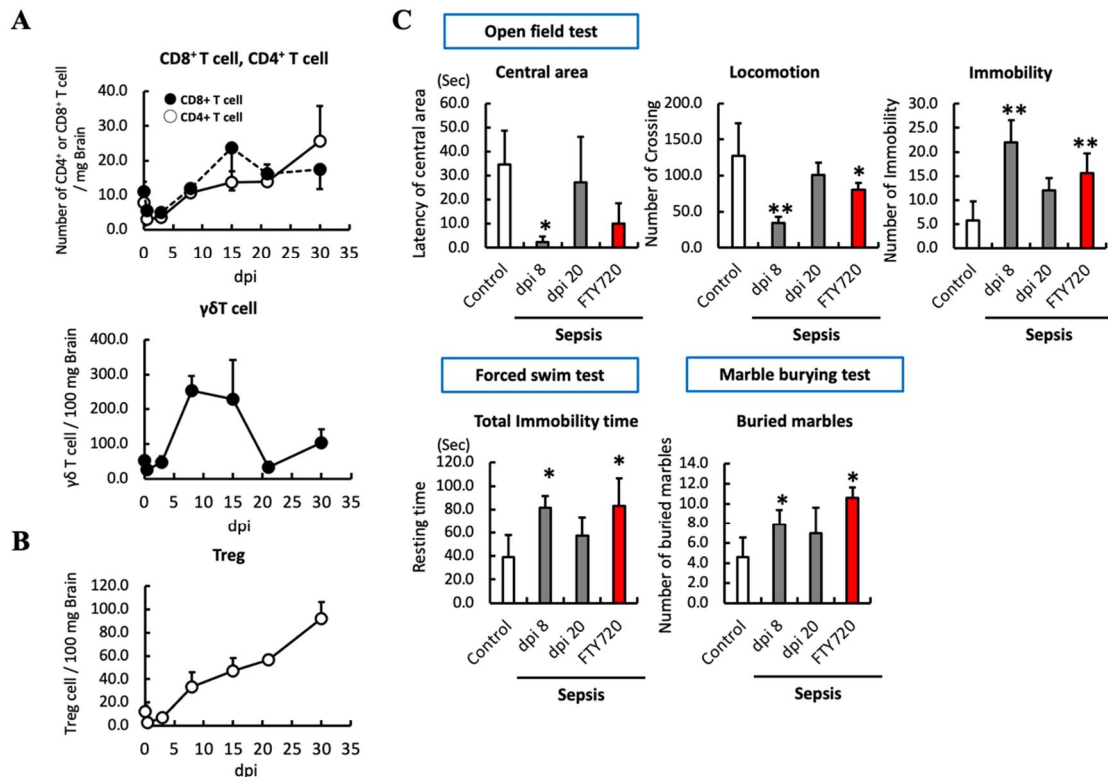


図 3. 敗血症誘導後の脳内における T 細胞の動態および行動試験の結果

敗血症誘導後、CD8⁺T 細胞は数が定常に戻ったのち増加しなかったが、CD4⁺T 細胞は増加した(A)。 $\gamma\delta$ T 細胞は急性期に急激に増加した(A)。脳内ではTregが増加した(B)。強制遊泳試験、ビー球埋め試験およびオープンフィールド試験により敗血症マウスの不安様行動を調べた結果、FTY720を投与したグループではその回復が遅延した(C)。Dpi: days-post induction;

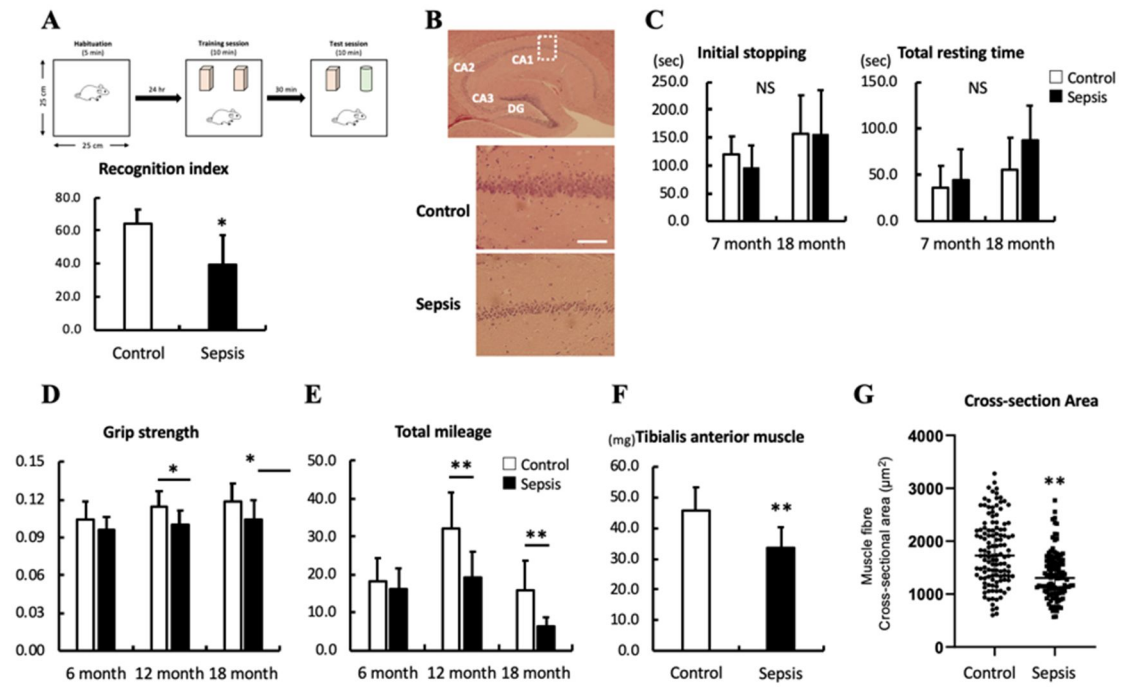


図 4. 敗血症マウスの長期予後

敗血症誘導から 6 ヶ月、12 ヶ月、18 ヶ月後の敗血症マウスの行動試験を行った。その結果、認知機能の優位な低下 (A)、海馬 CA1 領域における神経細胞数の減少 (B) が認められた。強制遊泳試験の結果では、顕著な変化は認められなかった (C)。握力は 12 ヶ月と 18 ヶ月後に於いて顕著に弱く (D)、総走行距離も短かった (E)。前脛骨筋の重量は、敗血症マウスで優位な減少が認められ (F)、筋断面積を示す Cross-section area も顕著に縮小していた (G)。Mann-Whitney U test: * $p < 0.05$, *** $p < 0.01$ 。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Saito M, Fujinami Y, Ono Y, Ohyama S, Fujioka K, Yamashita K, Inoue S, Kotani J	4. 巻 92
2. 論文標題 Infiltrated regulatory T cells and Th2 cells in the brain contribute to attenuation of sepsis-associated encephalopathy and alleviation of mental impairments in mice with polymicrobial sepsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain, Behavior, and Immunity	6. 最初と最後の頁 25-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbi.2020.11.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujinami Y, Ono Y, Miyazaki Y, Fujioka K, Yamashita K, Kotani J	4. 巻 10
2. 論文標題 Sepsis Induces Physical and Mental Impairments in a Mouse Model of Post-Intensive Care Syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm10081593.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 齋藤雅史、藤浪好寿、大野雄康、大山正平、藤岡一路、山下公大、井上茂亮、小谷稔治
2. 発表標題 敗血症マウスの脳内に浸潤したT細胞は、敗血症性脳症を抑制し、精神障害の回復を促進する
3. 学会等名 第35回 日本Shock学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masafumi Saito, Shigeaki Inoue, Yoshihisa Fujinami, Shohei Ohyama, Yuko Ono, Joji Kotani
2. 発表標題 Sepsis impairs physical, cognitive and mental function in aged mice
3. 学会等名 International Federation of Shock Societies (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤雅史、井上茂亮、大山正平、藤浪好寿、大野雄康、小谷穰治
2. 発表標題 敗血症性脳症マウスモデルの構築とその評価
3. 学会等名 日本エンドトキシン・自然免疫研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤雅史、井上茂亮、大山正平、藤浪好寿、大野雄康、小谷穰治
2. 発表標題 敗血症は脳内のAstrocyteやMicrogliaを減少させ、不安様行動を増悪させる。 -敗血症性脳症マウスモデルを用いた基礎的な検討-
3. 学会等名 日本集中治療医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masafumi Saito, Yoshihisa Fujinami, Yuko Ono, Nobuto Nakanishi, Kimihiro Yamashita, Shigeaki Inoue, Joji Kotani
2. 発表標題 CX3CR1high macrophage and Treg in the brain may help to improve anxiety-like behavior in septic mice
3. 学会等名 International Endotoxin and Innate Immunity Society (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------