

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 25 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293383

研究課題名(和文) IgM受容体を標的とした新規敗血症治療法の開発

研究課題名(英文) Novel therapy for sepsis targeting to IgM receptor

研究代表者

本多 伸一郎 (HONDA, Shinichiro)

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：60360640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々はIgA/MのFc受容体であるFc γ 2 μ Rを欠損したマウスがLPS投与による敗血症において、炎症性サイトカイン/ケモカインの産生が減少し、生存することを見いだした。混合骨髄キメラマウスの解析から、Fc γ 2 μ Rを発現する境界領域B細胞がIL-6の産生を介して全身性の炎症応答に寄与することが明らかとなったが、そのIL-6産生はマクロファージからの産生に遅れ、LPS投与4時間後から生じていた。抗体投与によりLPS投与4時間後以降のIL-6を中和すると炎症応答は減弱し、マウスが生存することが明らかとなった。よって、遅発性のIL-6の中和を目的とする、敗血症の新規治療法の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We found that mice lacking Fc γ 2 μ R, an Fc receptor for IgA/M showed attenuated inflammatory cytokine and chemokine productions and survived during lipopolysaccharide (LPS)-induced septic shock. Analyses using mixed bone marrow chimeric mice showed that Fc γ 2 μ R on marginal zone (MZ) B cells enhances systemic inflammatory responses by producing IL-6. IL-6 production from MZ B cells starts at 4-hr after LPS injection, following to that from macrophages. Thus, we tried to neutralize IL-6 by antibody injection for the treatment of septic shock. Although IL-6 is shown to be pro- and/or anti-inflammatory, we found that neutralization of delayed IL-6 leads to the attenuation of systemic inflammatory responses and the improvement of survival of mice.

研究分野：免疫学

キーワード：敗血症 Fc受容体

1. 研究開始当初の背景

敗血症は病原体感染により引き起こされる全身性炎症反応症候群であるが、重症敗血症の死亡率は 20 % 程度と高く、アメリカにおける死者は年間 21 万人を超えるとされている (*Dombrovskiy et al., Crit. Care Med, 2007*)。宿主免疫機構は Toll 様受容体に代表されるパターン認識受容体を介して細菌構成成分を感知して病原体の排除を行うが、重症敗血症ではしばしば炎症性サイトカイン産生が過剰に亢進して敗血症性ショックに陥る (*Rittirsch et al., Nat Rev Immunol, 2006*)。すなわち敗血症の治療を行う上では病原体の排除を行いつつ過剰な炎症応答を回避するという緻密な制御が必要とされる。これまでも炎症性サイトカイン等を標的とした治療が試みられているものの著効例は少なく、新規分子基盤に基づく治療法が求められている。

抗原に感作されていない生体は自然抗体を有するが、その大部分は IgM 抗体によって占められており様々な病原体成分を認識することが知られている (*Binder et al., Springer Semin Immunol. 2005*)。IgM 自然抗体はその中和作用や補体活性化作用を介して病原体排除の初期段階に大きく寄与していると考えられている (*Kaveri et al., J. Immunol. 2012*)。Fc 受容体は免疫細胞上に発現する抗体の Fc 部分に対する受容体であり、抗体によって惹起される様々な免疫応答に必須であることが知られている。研究代表者らのグループは IgM および IgA に対する Fc 受容体、Fca/μR (CD351) を同定することに成功したが、これまでに Fca/μR 特異的抗体や Fca/μR 欠損マウスを用いた解析から、Fca/μR が IgM を介した抗原の細胞内取り込みや抗体産生応答に關与することを明らかにしてきた (*Shibuya et al., Nat. Immunol., 2000, Cho et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006, Honda et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009*)。さらに Fca/μR は敗血症モデルにおいて炎症性サイトカイン産生を制御することを示唆するデータを得たことから、炎症応答の人為的制御の可能性が示唆された。

2. 研究の目的

Fca/μR を介した炎症応答制御機構の全貌を明らかにし、この知見を元にした新しい敗血症治療法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) Fca/μR 欠損マウスにおける LPS 投与敗血症性ショック

Fca/μR 欠損マウスおよび野生型マウスへ LPS (600 μg per mouse) を経静脈的に投与し敗血症性ショックを誘導する。各マウスにおける炎症性サイトカイン、ケモカインの産生を経時的に検討し、マウスの生存率を検討する。

(2) 境界領域 B 細胞特異的 Fca/μR 欠損キメラマウスの作成とその解析

CD19 欠損マウス由来骨髄と野生型または Fca/μR 遺伝子欠損マウス由来骨髄を 9:1 で混合して放射線照射後の野生型マウス移入する。これらのキメラマウスへ LPS を投与し、炎症性サイトカイン、ケモカインの産生、およびマウスの生存率を検討する。

(3) 境界領域 B 細胞における炎症性サイトカイン、ケモカイン産生の検討

野生型マウスへ LPS を投与した後、境界領域 B 細胞をソーティングにて分離し、定量的 RT-PCR 法にて炎症性サイトカイン、ケモカインの産生を経時的に検討する。

(4) 境界領域 B 細胞特異的 IL-6 欠損キメラマウスの作成とその解析

CD19 欠損マウス由来骨髄細胞に IL-6 欠損マウス由来骨髄細胞、もしくは野生型マウス由来骨髄細胞を 9:1 で混合して放射線照射後の野生型マウス移入する。これらのキメラマウスへ LPS を投与し、炎症性サイトカイン、ケモカインの産生、およびマウスの生存率を検討する。

(5) IL-6 中和抗体による治療応用の検討

野生型マウスへ LPS を経静脈的に投与し敗血症性ショックを誘導し、IL-6 中和抗体およびコントロール抗体を LPS 投与前、もしくは 4 時間後に投与する。各マウスにおける炎症性サイトカイン、ケモカインの産生を経時的に検討し、マウスの生存率を検討する。

4. 研究成果

(1) Fca/μR 欠損マウスにおける LPS 投与敗血症性ショック

Fca/μR 欠損マウスは野生型マウスに比較し、LPS 投与後の血中炎症性サイトカイン、ケモカインの産生が低下し、生存率の改善を示した。よって、Fca/μR が LPS 投与に対する炎症応答を制御していることが明らかとなった。

(2) 境界領域 B 細胞特異的 Fca/μR 欠損キメラマウスの作成とその解析

炎症応答を制御する Fca/μR は境界領域 B 細胞に高発現することから、境界領域 B 細胞が全身性の炎症応答に寄与する可能性が示唆された。そこで境界領域 B 細胞特異的 Fca/μR 欠損キメラマウスを作成して解析を行ったところ、境界領域 B 細胞特異的 Fca/μR 欠損キメラマウスは野生型マウスに比較し、LPS 投与後の炎症応答が低下し、生存率の改善を示した。よって、境界領域 B 細胞が LPS 投与に対する全身性の炎症応答を制御し、マウスの生存に寄与していることが明らかとなった。

(3) 境界領域 B 細胞における炎症性サイトカイン、ケモカイン産生の検討

LPS 投与に対して境界領域 B 細胞が IL-6 を中心として、CXCL10などを産生することが確認されたが、予想しなかったことに、その IL-6 産生量は LPS 投与 4 時間後にはマクロファージを凌駕することが明らかとなった。

(4)境界領域 B 細胞特異的 IL-6 欠損キメラマウスの作成とその解析

境界領域B細胞からのIL-6産生の重要性を明らかにする目的で境界領域 B 細胞特異的IL-6 欠損キメラマウスを作成した。これらのキメラマウスへLPSを投与し、炎症性サイトカインの産生、およびマウスの生存率を検討したところ、境界領域 B 細胞特異的IL-6 欠損キメラマウスは野生型マウスに比較し、LPS投与後の炎症性サイトカイン、ケモカインの産生が低下し、生存率の改善を示した。よって、境界領域 B 細胞からのIL-6産生がLPS投与に対する全身性の炎症応答を増幅し、マウスの生存率を低下させていることが明らかとなった。

(5)IL-6 中和抗体による治療応用の検討

上記で得られた知見を敗血症の治療へ応用を検討する目的でIL-6に対する中和抗体を用いた。LPS投与による敗血症性ショックモデルマウスへLPS投与前、もしくは、境界領域B細胞から産生されるIL-6がピークを迎える、LPS投与4時間後に中和抗体を投与し、全身性炎症応答やマウスの生存率を検討した。その結果、LPS投与前に抗体を投与したマウスでは炎症応答や生存率に変化は認められなかったのに対して、LPS投与4時間後に抗体を投与したマウスにおいては、全身性炎症応答が抑制され、生存率が著明に改善した。IL-6は従来、炎症応答に対する促進的、もしくは抑制的な相反的な作用が報告されてきたが、境界領域B細胞から産生されると考えられる遅発性のIL-6の中和を標的とした、新しい敗血症治療法の可能性が明らかとなった。

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11件)

1. Udayanga K G S, Nakamura Y, Nakahashi-Oda C, Shibuya A. Immunoreceptor CD300a on mast cells and dendritic cells regulates neutrophil recruitment in a murine model of sepsis. *Int Immunol*, 28(12), 611-615, 2016 査読有 (DOI: 10.1093/intimm/dxw047)
2. Sato K, Honda SI, Shibuya A, Shibuya K. Improved protocol for the isolation of naïve follicular dendritic cells. *Mol Immunol*, 78:140-145, 2016 査読有 (DOI: 10.1016/j.molimm.2016.09.011)
3. Honda S, Sato K, Totsuka N, Fujiyama S, Fujimoto M, Miyake K, Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Shibuya A. Marginal zone B cells exacerbate endotoxic shock via interleukin-6 secretion induced by Fcα/μR-coupled TLR4 signalling. *Nat Commun*, 7:11498, 2016 査読有 (DOI: 10.1038/ncomms11498)
4. Nakahashi-Oda C, Udayanga KGS, Nakamura Y, Nakazawa Y, Miki H, Iino S, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Shibuya A. Apoptotic epithelial cells control the abundance of Treg cells at barrier surfaces. *Nat Immunol*, 17(4):441-450, 2016 査読有 (DOI: 10.1038/ni.3345)
5. Weinstein JR, Quan Y, Hanson JF, Colonna L, Iorga M, Honda S, Shibuya K, Shibuya A, Elkon KB, Möller T. IgM-Dependent Phagocytosis in Microglia Is Mediated by Complement Receptor 3, Not Fcα/μ Receptor. *J Immunol*, 195(11):5309-5317, 2015 査読有 (DOI: 10.4049/jimmunol.1401195)
6. Shibuya A, Honda S. Immune regulation by Fcα/μ receptor (CD351) on marginal zone B cells and follicular dendritic cells. *Immunol Rev*, 268(1):288-295, 2015 査読有 (DOI: 10.1111/imr.12345)
7. Yamashita-Kanemaru Y, Takahashi Y, Wang Y, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Bernhardt G, Shibuya A, Shibuya K. CD155 (PVR/Necl5) Mediates a Costimulatory Signal in CD4+ T Cells and Regulates Allergic Inflammation. *J Immunol*, 194(12):5644-5653, 2015 査読有 (DOI: 10.4049/jimmunol.1401942)
8. Miki H, Nakahashi-Oda C, Sumida T, Shibuya A. Involvement of CD300a Phosphatidylserine Immunoreceptor in Aluminum Salt Adjuvant-Induced Th2 Responses. *J Immunol*, 194(11):5069-5076, 2015 査読有 (DOI: 10.4049/jimmunol.1402915)
9. Kurita N, Honda S, Shibuya A. Increased serum IgA in Fcα/μR-deficient mice on the (129 x C57BL/6) F1 genetic background. *Mol Immunol*, 63:367-372, 2015 査読有 (DOI: 10.1016/j.molimm.2014.09.008)
10. Totsuka N, Kim Y, Kanemaru K, Niizuma K, Umemoto E, Nagai K, Tahara-Hanaoka S, Nakahashi-Oda C, Honda S, Miyasaka M, Shibuya K, Shibuya A. Toll-like receptor 4

and MAIR-II/CLM-4/LMIR2 immunoreceptor regulate VLA-4-mediated inflammatory monocyte migration. *Nature Commun*, 5:4710, 2014 査読有 (DOI: 10.1038/ncomms5710)

11. Satake K, Shimizu Y, Sasaki Y, Yanagawa H, Suzuki H, Suzuki Y, Horikoshi S, Honda S, Shibuya K, Shibuya A, Tomino Y. Serum under-O-glycosylated IgA1 level is not correlated with glomerular IgA deposition based upon heterogeneity in the composition of immune complexes in IgA nephropathy. *BMC Nephrology*, 15:89, 2014 査読有 (DOI: 10.1186/1471-2369-15-89)

[学会発表](計24件)

1. 渋谷 彰、小田 ちぐさ 上皮の細胞死によるバリア組織の恒常性の制御 第35回サイトプロテクション研究会 メルパルク京都 (京都市下京区) 2017.3.10
2. Nakamura Y, Nakahashi-Oda C, Shibuya A. Eolvl6 attenuates mechanical stress-induced skin inflammation. 第45回日本免疫学会総会・学術集会 沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市) 2016.12.5
3. Nakazawa Y, Nakahashi-Oda C, Nakamura Y, Udayanga KGS, Shibuya A. Apoptotic epithelial cells control the abundance of regulatory T cell at barrier surfaces. *Immune Profiling in Health and Disease*, The Fairmont Olympic Hotel, Seattle, WA, USA, 2016.10.3
4. 渋谷 彰、小田 ちぐさ 常在細菌叢によるバリア組織の恒常性維持 第44回日本臨床免疫学会総会 京王プラザホテル (東京都新宿区) 2016.9.8
5. Nakahashi-Oda C, Udayanga K. G. S, Nakamura Y, Nakazawa Y, Totsuka N, Miki H, Iino S, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Shibuya K, Shibuya A. Apoptotic epithelial cells control the abundance of regulatory T cells at barrier surfaces. *International Congress of Immunology 2016*, Melbourne

Convention and Exhibition Centre, Australia, 2016.8.25

6. 小田 ちぐさ 上皮アポトーシス細胞による制御性T細胞数の調節 第31回自己免疫研究会 京王プラザホテル (東京都新宿区) 2016.7.23
7. 小田 ちぐさ 上皮アポトーシス細胞による制御性T細胞の調節 第25回東京免疫フォーラム 東京医科学研究所附属病院 (東京都港区) 2016.3.1
8. Udayanga K G S, Nakahashi-Oda C, Shibuya A. CD300a on mast cells and dendritic cells control the pathogenesis of experimental sepsis. 第44回日本免疫学会総会・学術集会 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市) 2015.11.20
9. Nakamura Y, Nakahashi-Oda C, Shibuya A. Functional analysis of CD300a in atopic dermatitis and colitis. 第44回日本免疫学会総会・学術集会 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市) 2015.11.19
10. Ohtsuka S, Totsuka N, Nakahashi-Oda C, Shibuya A. MAIR-II exacerbates bleomycin-induced pulmonary fibrosis through neutrophilic inflammation. 第44回日本免疫学会総会・学術集会 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市) 2015.11.19
11. Sato K, Honda S, Shibuya K, Shibuya A. Development of a novel method for isolation of follicular dendritic cells. 第44回日本免疫学会総会・学術集会 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市) 2015.11.19
12. Nakamura Y, Nakahashi-Oda C, Shibuya A. Eolvl6 attenuates OVA-induced atopic dermatitis by reducing the response to mechanical stress. 第44回日本免疫学会総会・学術集会 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市) 2015.11.18

13. Nakamura Y, Oda C, Matsuzaka T, Shimano H, Shibuya A. Eolvl6 attenuates OVA-induced atopic dermatitis by reducing the response to mechanical stress. 14th International Workshop on Langerhans Cells. Kyoto International Community House, (京都府京都市) 2015.11.6
14. Nakahashi-Oda C, Udayanga K G S, Nakamura Y, Nakazawa Y, Totsuka N, Miki H, Iino S, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Shibuya K, Shibuya A. Apoptotic epithelial cells control regulatory T cell expansion. International Symposium on Immune Regulation, Oarai Park Hotel, (茨城県大洗町) 2015.10.29
15. Honda S, Sato K, Totsuka N, Fujiyama S, Fujimoto M, Miyake K, Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Shibuya A. Marginal zone B cells exacerbate endotoxin shock via interleukin-6 secretion induced by Fcα/μR-coupled TLR4 signaling. International Symposium on Immune Regulation, Oarai Park Hotel, (茨城県大洗町) 2015.10.29
16. 渋谷 彰、Kankanam Gamage Sanath Udayanga、中村 貴之、中澤 優太、三木 春香、小田 ちぐさ 上皮アポトーシス細胞による免疫恒常性の維持機構 第24回日本 Cell Death 学会 大阪大学会館 (大阪府豊中市) 2015.7.12
17. 戸塚 直也、金 倫基、金丸 和正、新妻 耕太、梅本 英司、永井 恵、田原 聡子、小田 ちぐさ、本多 伸一郎、宮坂 昌之、渋谷 和子、渋谷 彰 TLR4 と免疫受容体 MAIR-II は炎症性単球の感染局所への移入を促進する 第3回筑波大学・東京理科大学生命医科学研究所合同リトリート 東京理科大学セミナーハウス (千葉県野田市) 2015.3.20
18. 中澤 優太、小田 ちぐさ、中村 貴之、渋谷 彰 CD300a on CD11b⁺ DC inhibits the TRIF pathway mediated by microbiota for production of IFN-β. 第3回筑波大学・東京理科大学生命医科学研究所合同リトリート 東京理科大学セミナーハウス (千葉県野田市) 2015.3.20
19. Udayanga K G S, Miki H, Nakahashi-Oda C, Shibuya A. CD300a regulates regulatory T cell number and is involved in the pathogenesis of atopic dermatitis and allergic airway inflammation. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 国立京都国際会館 (京都府京都市) 2014.12.12
20. Nakamura Y, Nakahashi-Oda C, Nakazawa Y, Iino S, Shibuya A. CD300a regulates regulatory T cell number in the intestine and involved in the pathogenesis of DSS-induced colitis. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 国立京都国際会館 (京都府京都市) 2014.12.12
21. Nakazawa Y, Nakahashi-Oda C, Nakamura Y, Shibuya A. CD300a on CD11b⁺ DC inhibits the TRIF pathway mediated by microbiota for production of IFN-β. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 国立京都国際会館 (京都府京都市) 2014.12.12
22. Honda S, Sato K, Fujiyama S, Fujimoto M, Miyake K, Shibuya A. Marginal zone B cells exacerbate endotoxin shock by secretion of interleukin-6. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 国立京都国際会館 (京都府京都市) 2014.12.10
23. Totsuka N, Kim YG, Kanemaru K, Niizuma K, Umemoto E, Nagai K, Tahara-Hanaoka S, Nakahashi-Oda C, Honda S, Miyasaka M, Shibuya K, Shibuya A. Toll-like receptor 4 and MAIR-II/CLM-4/LMIR2 immunoreceptor regulate VLA-4-mediated inflammatory monocyte migration. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 国立京

都国際会館（京都府京都市）2014.12.10

24. Nakahashi-Oda C, Nakazawa Y, Nakamura Y, Shibuya A. Apoptotic epithelial cells inhibit the commensal microbiota signal for homeostatic control of gut regulatory T cells. Immune Homeostasis and Inflammatory Disease: A Herrenhausen Symposium. Herrenhausen Palace Conference Center, Hanover, Germany 2014.11.7

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://immuno-tsukuba.com/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

本多 伸一郎 (HONDA, Shinichiro)

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：60360640

(2)研究分担者

小田 ちぐさ (ODA, chigusa)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：50510054