

令和 3 年 4 月 15 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10012

研究課題名(和文)細菌特異的RNAに着目した高サイトカイン血症の病態解明：重症敗血症の克服に向けて

研究課題名(英文)Elucidation of molecular pathogenesis in bacterial RNA-induced cytokine storm

研究代表者

松宮 朋穂 (Matsumiya, Tomoh)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：30344592

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)：医療技術が進歩しているにもかかわらず、重症敗血症の致死率の改善がみられない。申請者らは重症敗血症の本態であるサイトカインストームの原因として、新たなターゲットの検索を模索し、細菌特異的RNAに注目をした。本課題では細菌特異的RNAのサイトカイン誘導能を検証した。精製した細菌特異的RNAは樹状細胞のサイトカイン産生を誘導し、その誘導はパターン認識受容体に依存することが判明した。また、その結果はマウスモデルでも観察され、個体レベルでも強力なサイトカイン誘導能を含む炎症性因子であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題の結果から、これまで知られていたエンドトキシン以外にも、細菌由来の成分である細菌特異的RNAが強力なサイトカイン誘導能を有することが明らかになった。この成果はサイトカインストームに対する新たな治療戦略の基盤となる可能性がある。敗血症治療において重症化の予兆を早期に発見することは生命予後に直結することが知られている。本課題の成果の応用は、サイトカインストーム発症の予兆発見に向けた診断技術開発につながる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Despite advances in medical technology, case fatality rate of severe sepsis does not improve we sought to explore novel targets for the cause of cytokine storms, which are the main cause of severe sepsis caused by bacterial infection, and focused on bacterial-specific RNA. In this study, we verified the cytokine-inducing ability of bacterial-specific RNA. We found that the purified bacterial-specific RNA induces cytokine production in dendritic cells, and the induction depends on the pattern recognition receptor. The results were also observed in a mouse model, revealing that such RNA is a strong inflammatory factor including cytokine induction.

研究分野：免疫学(自然免疫応答)

キーワード：感染症 自然免疫応答 細菌学

## 1. 研究開始当初の背景

サイトカインは感染免疫において必須の情報伝達物質である。サイトカインの発現は厳格に制御されており、その制御の破綻は、本来局所で作用するサイトカインの全身への作用によって、極めて重篤な病態への進展につながる。従来、細菌感染症に合併した高サイトカイン血症の原因としてエンドトキシン的重要性が提唱されてきた。しかし動物実験で見られるエンドトキシン誘導高サイトカイン血症の所見は、ヒトボランティアによるエンドトキシン投与試験のものと一致しなかった。そこで、エンドトキシンはサイトカインストームの一因ではあるが、主要因ではないと考えられていた。

これまで抗 TNF 抗体や IL-1 受容体アンタゴニストを投与する臨床試験が行われたが、いずれも敗血症患者の死亡率を改善しなかった。また、エンドトキシンの受容体である、TLR4 に対する抗体の投与も同様の結果に終わっている。

申請者らは、サイトカインの発現調節に関する研究を進めてきた。その中で、サイトカインの制御は極めて複雑であることから、高サイトカイン血症の治療標的としてサイトカイン自身の発現制御を行うことは困難であると考えられた。

申請者らは、宿主が菌体成分に暴露されると、細胞内核酸センサーの発現が増強することを見出した。また、宿主の非自己核酸認識システムや、非自己核酸依存的なサイトカインの産生メカニズムの解明をおこなってきた。

細菌中にはプラスミド以外の細菌特異的核酸の存在が知られていたが、申請者は細菌特異的 RNA が他の細菌由来成分と比較して、強力なサイトカイン誘導活性を有することを見出した。以上のことから、申請者は、細菌特異的 RNA による過剰なサイトカイン産生への関与を着想した。

## 2. 研究の目的

本課題では細菌特異的な RNA に依存した過剰なサイトカイン産生メカニズムの解明を目指し、以下の項目を明らかにすることを研究目的とした。

- (1) 菌由来 RNA 中の核酸種の同定
- (2) 菌由来 RNA による免疫担当細胞活性化機構
- (3) 菌由来 RNA による高サイトカイン血症発症メカニズム

## 3. 研究の方法

粗抽出 RNA から電気泳動法によって、細菌特異的 RNA を分画・精製した。精製した RNA が骨髄由来樹状細胞に対するサイトカイン誘導能を ELISA 法で検証した。

次に自然免疫関連パターン認識受容体欠損マウス由来の樹状細胞を用い、細菌特異的 RNA のサイトカイン誘導能に対するパターン認識受容体の影響を ELISA 法で検証した。

最後に動物モデル実験を行った。マウス腹腔内に細菌特異的 RNA を投与し、経時的に採血

を行った。全血から遠心操作によって血清を回収し、血清サイトカイン量を ELISA 法で測定した。また、マウス臓器を摘出後、HE 染色した標本を光学顕微鏡下に観察し、炎症の程度を評価した。

#### 4 . 研究成果

本課題では以下の成果を得ることができた。

##### ( 1 ) 自然免疫応答を活性化する細菌特異的 RNA の同定

予備実験の結果から、細菌特異的 RNA で処理したマウス樹状細胞は炎症性サイトカインを産生することが分かっていた。この RNA は細菌から RNA を粗抽出したものである。そこで、精製した細菌特異的 RNA 中の過剰なサイトカイン産生誘導能をもつ RNA 分画を同定した。

##### ( 2 ) 細菌特異的 RNA による免疫担当細胞活性化機構

細菌特異的 RNA による樹状細胞 ( dendritic cells: DCs ) のサブタイプ依存的な自然免疫活性化能を確認した。マウス骨髄細胞を単離後、FMS-like tyrosine kinase 3 ligand ( Flt3L ) や granulocyte macrophage colony-stimulating factor ( GM-CSF ) 処理により plasmacytoid-like DCs ( pDCs ) や myeloid-like DCs ( mDCs ) にそれぞれ分化させた後、細胞を細菌特異的 RNA で処理したところ、pDCs と mDCs では細菌特異的 RNA 刺激に対するサイトカイン産生パターンが異なった。このことから、pDCs と mDCs では細菌特異的 RNA に対するセンサーの発現パターンが異なる可能性が示唆された。

上記の現象が菌体成分であるエンドトキシン由来である可能性を除外する目的でいくつかの確認実験を追加した。まず、エンドトキシン中和剤で前処理した樹状細胞でも細菌特異的 RNA によるサイトカイン誘導作用を認めた。また、エンドトキシン除去カラムを通した RNA はその前後で自然免疫応答能に変化を認めなかった。以上から、これまで申請者らが観察してきた作用は細菌特異的 RNA 特異的なものであると考えられ、動物モデル実験を実施することが可能となった。

##### ( 3 ) 細胞特異的 RNA に対する受容体の検索

非自己 RNA は宿主細胞で Toll 様受容体 ( TLR ) や RIG-I 様受容体 ( RLR ) により認識される。また、1st line defense において重要な免疫担当細胞である樹状細胞は、クラスにより TLR や RLR の発現パターンが異なっており、骨髄系樹状細胞 ( mDC ) では RLR が、形質細胞様樹状細胞 ( pDC ) では TLR が非自己 RNA のセンサーとなっている。そこで、mDC、pDC へそれぞれ分化誘導した樹状細胞へ細菌特異的 RNA を導入し、I 型 IFN や IL6 の誘導を活性化の指標として測定した。その結果、細菌特異的 RNA は mDC に対してサイトカインの発現を誘導しなかった。一方、pDC ではサイトカインの強力な発現誘導が認められた。このことから、細菌特異的 RNA は TLR 依存的な経路を活性化すると考えられた。

TLR はヒトでは 10 種類、マウスでは 12 種類が報告されており、このうち RNA を認識する TLR も知られている。申請者らはいくつかの TLR またはその下流のシグナル伝達分子の欠損マウスより採取した骨髄細胞を用いた実験を行い、細菌特異的 RNA に依存した自然免疫応答活性化にはアダプター分子 MyD88 が必須であることを突き止めた。

##### ( 4 ) 動物モデル実験

細菌特異的 RNA を in vivo transfection 試薬を用いて腹腔内投与し、経時的に採血を行った。こ

の際、1本鎖 RNA のコントロールとして poly uridine ( polyU)を、2本鎖 RNA のコントロールとして polyinosinic-polycytidylic acid (polyIC)を投与した。polyU は比較的早期に pro-inflammatory cytokines の発現を誘導し、polyIC は、抗ウイルスサイトカインである I 形 interferon ( IFN ) の発現を強力に誘導した。細菌特異的 RNA は polyU と同様、投与後早期に pro-inflammatory cytokines の発現を誘導した。また、I 型 IFN の発現は誘導しなかった。このことから細菌特異的 RNA は非自己 1 本鎖 RNA であることが推測された。proinflammatory cytokines の発現誘導が最大となる時点でマウスの肝臓、腎臓、肺、脾臓を観察したところ、肺に炎症性細胞の浸潤が認められた。なお、エンドトキシン処理マウスの proinflammatory cytokines の発現誘導は比較的遅い(少なくとも 8 時間以降、24 時間で発現量が増強している)ことから、本研究で観察している現象は精製の際のエンドトキシンの混入に由来する反応ではなく、細菌特異的 RNA の影響によるものであることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10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 Hirono Koji, Imaizumi Tadaatsu, Aizawa Tomomi, Watanabe Shojiro, Tsugawa Koji, Shiratori Toshihiro, Kawaguchi Shogo, Seya Kazuhiko, Matsumiya Tomoh, Ito Etsuro, Tanaka Hiroshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Endothelial expression of fractalkine (CX3CL1) is induced by Toll-like receptor 3 signaling in cultured human glomerular endothelial cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14397595.2019.1682768	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Imaizumi Tadaatsu, Satake Urara, Miyashita Ruri, Kawaguchi Shogo, Matsumiya Tomoh, Seya Kazuhiko, Ding Jiangli, Tanaka Hiroshi	4. 巻 337
2. 論文標題 Interferon-induced transmembrane protein 1 and Myxovirus resistance protein 1 are induced by polyinosinic-polycytidylic acid in cultured hCMEC/D3 human cerebral microvascular endothelial cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neuroimmunology	6. 最初と最後の頁 577047 ~ 577047
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jneuroim.2019.577047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shogo Kawaguchi, Hirotake Sakuraba, Toshihiro Haga, Tomoh Matsumiya, Kazuhiko Seya, Tetsu Endo, Naoya Sawada, Chikara Iino, Hidezumi Kikuchi, Hiroto Hiraga, Shinsaku Fukuda, Tadaatsu Imaizumi	4. 巻 42
2. 論文標題 Melanoma Differentiation-Associated Gene 5 Positively Modulates TNF- $\alpha$ -Induced CXCL10 Expression in Cultured HuH-7 and HLE Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Inflammation	6. 最初と最後の頁 2095 ~ 2104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10753-019-01073-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Liu Qiang, Imaizumi Tadaatsu, Kawaguchi Shogo, Aizawa Tomomi, Matsumiya Tomoh, Watanabe Shojiro, Tsugawa Koji, Yoshida Hidemi, Tsuruga Kazushi, Joh Kensuke, Kijima Hiroshi, Tanaka Hiroshi	4. 巻 139
2. 論文標題 Toll-Like Receptor 3 Signaling Contributes to Regional Neutrophil Recruitment in Cultured Human Glomerular Endothelial Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nephron	6. 最初と最後の頁 349 ~ 358
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000489507	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kimura Sayaka, Matsumiya Tomoh, Shiba Yuko, Nakanishi Michi, Hayakari Ryo, Kawaguchi Shogo, Yoshida Hidemi, Imaizumi Tadaatsu	4. 巻 201
2. 論文標題 The Essential Role of Double-Stranded RNA Dependent Antiviral Signaling in the Degradation of Nonself Single-Stranded RNA in Nonimmune Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1044 ~ 1052
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1800456	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imaizumi Tadaatsu, Sassa Naoko, Kawaguchi Shogo, Matsumiya Tomoh, Yoshida Hidemi, Seya Kazuhiko, Shiratori Toshihiro, Hirono Koji, Tanaka Hiroshi	4. 巻 324
2. 論文標題 Interferon-stimulated gene 60 (ISG60) constitutes a negative feedback loop in the downstream of TLR3 signaling in hCMC/D3 cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neuroimmunology	6. 最初と最後の頁 16 ~ 21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jneuroim.2018.08.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kasai Shuya, Yamazaki Hiromi, Tanji Kunikazu, Engler Mate Janos, Matsumiya Tomoh, Itoh Ken	4. 巻 64
2. 論文標題 Role of the ISR-ATF4 pathway and its cross talk with Nrf2 in mitochondrial quality control	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcfn.18-37	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Liu Qiang, Imaizumi Tadaatsu, Aizawa Tomomi, Hirono Koji, Kawaguchi Shogo, Watanabe Shojiro, Tsugawa Koji, Matsumiya Tomoh, Seya Kazuhiko, Yoshida Hidemi, Tanaka Hiroshi	4. 巻 44
2. 論文標題 Cytosolic Sensors of Viral RNA Are Involved in the Production of Interleukin-6 via Toll-Like Receptor 3 Signaling in Human Glomerular Endothelial Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Kidney and Blood Pressure Research	6. 最初と最後の頁 62 ~ 71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000498837	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imaizumi T, Hayakari R, Matsumiya T, Yoshida H, Tsuruga K, Watanabe S, Kawaguchi S, Tanaka H.	4. 巻 27
2. 論文標題 Chloroquine attenuates TLR3/IFN- signaling in cultured normal human mesangial cells: A possible protective effect against renal damage in lupus nephritis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol	6. 最初と最後の頁 1004-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2017.1289646.	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 Imaizumi T, Hayakari R, Watanabe S, Aizawa T, Matsumiya T, Yoshida H, Tsuruga K, Kawaguchi S, Tanaka H.	4. 巻 42
2. 論文標題 Cylindromatosis (CYLD), a Deubiquitinase, Attenuates Inflammatory Signaling Pathways by Activating Toll-Like Receptor 3 in Human Mesangial Cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Kidney Blood Press Res.	6. 最初と最後の頁 942-50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000485084.	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0件

〔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
研究分担者	姫野 俵太  (Himeno Hyota)  (80208785)	弘前大学・農学生命科学部・教授    (11101)	

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
---------	---------