

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08424

研究課題名(和文)新規IL-1サイトカインファミリーに着目した敗血症の重症病態の解明と新規治療戦略

研究課題名(英文)The Novel IL-1 Cytokines Family Members in Severe Infectious Diseases

研究代表者

青柳 哲史(AOYAGI, TETSUJI)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：50581609

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)：敗血症におけるIL-36サイトカインの役割について検討を行うことを目的とした。敗血症患者で血漿中IL-36gammaが上昇し、好中球から細胞外小胞体に包埋される形でIL-36Raが放出されることを発見した。IL-36gammaは敗血症の病態において炎症細胞から炎症の惹起、凝固促進、血管内皮細胞障害に関与することが判明し、IL-36Raはこれらを抑制することが明らかになり病態に深く関与することを明らかにした。また、マウス敗血症モデルを用いてIL-36Raが治療候補薬剤の一つになることも示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はIL-36Raが好中球より産生され、特に細胞外小胞体に包埋される細胞外に分泌されていることを明らかにした。細胞外小胞体は細胞間コミュニケーションを円滑に行うためのツールであるが、感染症による誘導されるIL-36gammaを抑制するために生体内で重要な働きを行っていることを示している。また、細胞、動物実験を通してIL-36Raが敗血症における治療候補薬剤のひとつになる可能性も示した。

研究成果の概要(英文)：This study aims to investigate the role of IL-36 cytokines in sepsis. We found that the concentration of IL-36gamma elevated in the patients with sepsis, and IL-36Ra packed in extracellular vesicles was released from neutrophils. IL-36gamma enhanced inflammation in inflammatory cells and coagulation and cell injury in endothelial cells. Whereas, IL-36Ra inhibited IL-36gamma induced inflammation, coagulation and cell injury. Indicating that IL-36 cytokines deeply involved in the pathogenesis of sepsis. Finally, we confirmed that IL-36Ra is a potential therapeutic candidate for sepsis using a sepsis mouse model.

研究分野：敗血症

キーワード：IL-36サイトカイン 細胞外小胞体 敗血症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

菌血症とその重症病態の敗血症は、世界中で毎年数百万人が罹患し、入院患者の死亡原因の第一位である。「世界敗血症宣言」が出され敗血症制圧に向け世界的キャンペーンが展開され、病態解明と新規治療法の開発が最重要事項となっている。

IL-36 cytokines は IL-1 ファミリーサイトカインのひとつで、3つの IL-36 受容体アゴニスト: IL-36 α 、IL-36 β 、IL-36 γ 、1つの IL-36 受容体アンタゴニスト: IL-36RN とその共通受容体: IL-36R からなる。IL-36 アゴニストは IL-36R と結合した後 IL-1RAcP を誘導し NF- κ B、MAPKs を活性、一方 IL-36R アンタゴニストは IL-36R と結合しシグナルを抑制する。IL-36 cytokines は皮膚・肺・腸管の上皮細胞、マクロファージ/単球に発現し、IL-36R は末梢血好中球を除き、全身に広く発現する。しかし、IL-36 サイトカインは古典的 IL-1(IL-1 β 含む)と異なり、細胞内に前駆体を持たず誘導・分泌機構および分泌形態は不明な点が多い。

炎症性皮膚疾患の乾癬で IL-36 アゴニストが Th-1、Th-17 cytokine network を形成し発病に関与する。一方、IL-36 アゴニストと IL-36 アンタゴニスト(IL-36RN)の不均衡が病態に深く関与している報告があるが、敗血症病態における IL-36 アゴニストおよび IL-36 アンタゴニストの関与について明らかではない。

2. 研究の目的

ヒトの菌血症および重症病態の敗血症での IL-36 サイトカインに着目した病態への関与および IL-36 アンタゴニストを使用した治療への可能性について明らかにするため、以下の4点について検討を行った。

- (1)病原細菌に応答するヒトの IL-36 サイトカインの生理的な意義の解明
- (2)敗血症患者における IL-36 サイトカインのプロファイル
- (3)敗血症病態(炎症・凝固・血管内皮細胞障害)における IL-36 サイトカインの役割
- (4)IL-36 アンタゴニストによる治療法の可能性

3. 研究の方法

倫理審査

敗血症患者および健常者からインフォームドコンセントを行い書面で同意を得たのちに血液を採取し、サンプルを研究に使用した。本研究を行うにあたり東北大学大学院医学系研究科倫理委員会審査で承認を得てから行った(2017-1-1086、2018-1-129)。また、動物を使用した研究においても国立大学法人東北大学環境・安全委員会動物実験専門委員会が行う動物実験計画(2019MdA-303)の承認を得て研究を行った。

敗血症患者および健常者からの血液サンプリング

東北大学病院高度救命救急センターに2018年8月~2019年1月に敗血症で入院した患者(n=15)および健常者(n=8)を対象に血液を採取し、速やかに血漿を抽出した。血漿は速やかに液体窒素で凍結し、-80度で保管した。

使用した微生物

- ・黄色ブドウ球菌: MRSA [USA 300, SCCmec type IV, PVL (+)]
- ・緑膿菌: PA [PAO1, type III secretion (+), invasive type]

健常者血液からの末梢血単核球および好中球を使用した研究

健常者から血液を採取し K2-EDTA 試験管に保存し、末梢血単核球(PBMCs)および好中球(PMNs)を遠心分離で単離した。PBMCs および PMNs を MOI10 の MRSA、PA、LPS で刺激した。ある実験においては、24時間の培養後に ATP を添加し 20分後に培養上清液を回収した。また PBMCs および PMNs から RNA を抽出し、IL-36 サイトカイン mRNA の発現、培養上清において細胞から放出された IL-36 サイトカインの同定を ELISA および Western blotting 法で行った。

細胞外小胞体 (Microparticles; MPs) の単離とフローサイトを用いた同定

人の血漿および培養上清(細胞フリー)を 1,700g10分間、続いて上清を 17,000g45分間遠心分離することで MPs を単離した。フローサイトメトリーを用いて、細胞表面に発現している抗体で染色し PBMCs 由来、PMNs 由来の MPs を同定した。サイズに関してはすでに大きさのわかっているコントロールビーズを用いて、得られた MPs が 500nm-1,000nm のサイズであることを確認している。

血管内皮細胞 (HUVECs) を使用した研究

HUVECs を IL-36 サイトカインで刺激し以下の実験を行った。HUVECs 細胞を IL-36 サイトカインで刺激し細胞に発現している tissue factor (TF) mRNA、タンパク量の同定、血管内皮細胞に発現した TF によるヒトの血液凝固の促進について検討を行った。また Transwell システムを用いて IL-36 サイトカインによる血管内皮細胞の透過性への影響の検討を行った。また、IL-36 サイトカインの血管内皮細胞障害を検討するため MTT アッセイによる細胞死の検討を行

った。

致死性敗血症モデルマウスにおける IL-36 アゴニストによる治療

好中球を除去する目的で抗 Ly-6g 抗体、コントロールに Rat IgG を投与し 24 時間後に LPS をマウスに投与し、経時的に血液をサンプリングし、IL-36 サイトカインを ELISA で測定した。抗 Ly-6g 抗体あるいは Rat IgG を投与したマウスに LPS 投与 2 時間前、24 時間後に IL-36Ra あるいは PBS を投与し生存率を検討した。

4. 研究成果

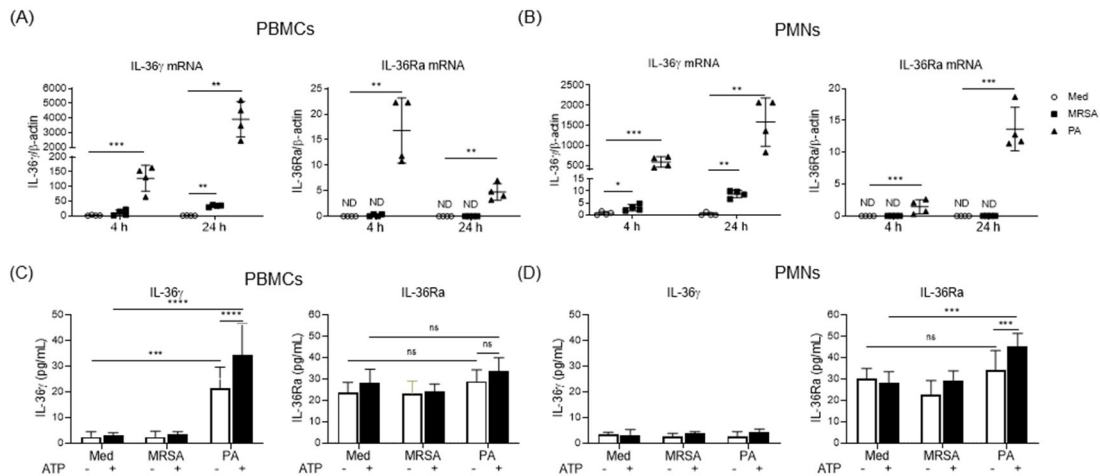
(1) 病原細菌にตอบสนองするヒトの IL-36 サイトカインの生理的な意義の解明

PA に感染した PBMCs は速やかに (4 時間後) IL-36 α 、IL-36 γ 、IL-36Ra mRNA の発現を認め、24 時間後には MRSA、PA に感染した PBMCs で IL-36 γ mRNA の発現は依然高値のままであった。PA および MRSA に感染した PMNs は 4 時間後および 24 時間後に IL-36 γ mRNA の発現は高値であった。一方、PA に感染した PMNs は 24 時間後に IL-36 α 、IL-36Ra mRNA の発現が高値であった (図 1A、1B)。

PA 感染 PBMCs の培養上清からのみ IL-36 γ が検出され、ATP 刺激で IL-36 γ の産生が更新した。一方、PA 感染 PMNs に ATP を加えることで IL-36Ra が検出することが可能であり、IL-36Ra が EVs 中に包埋され細胞外に放出されていることを示唆している (図 1C、1D)。

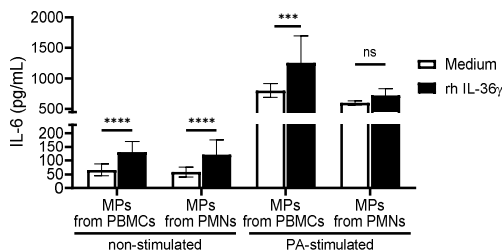
また、それぞれの培養上清から EVs を抽出し、EVs 内の IL-36 γ および IL-36Ra のタンパク発現、およびタンパク量を測定し、IL-36Ra は主に PA 刺激による PMNs から EVs に包埋され細胞外に放出されることを明らかにした。

図 1 PA および MRSA にตอบสนองする PBMCs および PMNs から産生される IL-36 サイトカインプロファイル



次に、EVs に包埋される IL-36Ra が IL-36g 依存性の炎症を抑制することを確認するため、PBMCs および PMNs に PA を感染させ、24 時間後に ATP を加えそれぞれから EVs を抽出し、再度自分自身の PBMCs に PBMCs 由来 EVs、PMNs 由来 EVs で刺激を行い、その後 rIL-36 γ を加えた。PA 刺激された PMNs 由来の EVs は、rIL-36 γ による炎症の増強を抑制することが確認できた (図 2)。

図 2 PMNs に包埋される IL-36Ra による IL-36 γ による炎症抑制効果

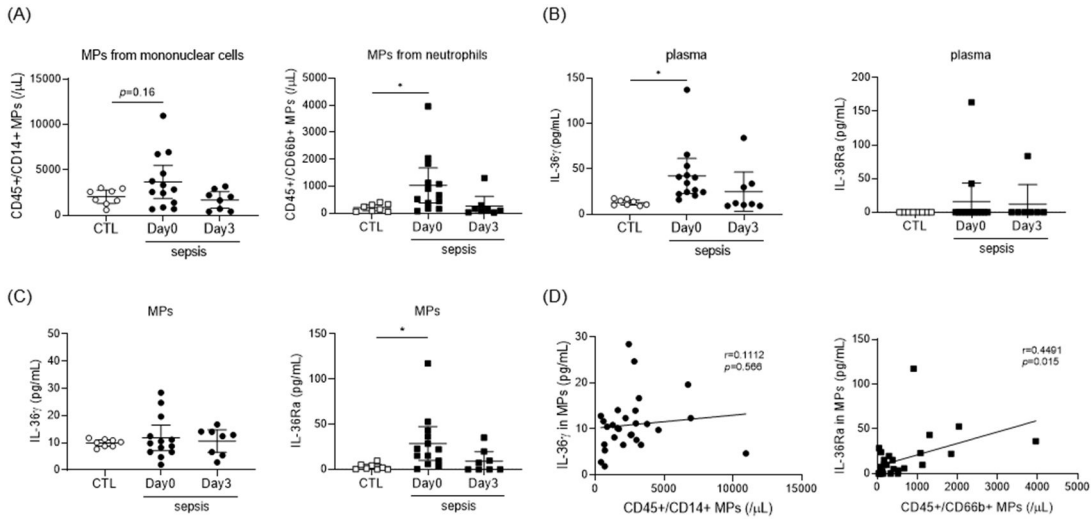


(2)敗血症患者における IL-36 サイトカインのプロファイル

敗血症患者および健康人から血液を採取し、血漿から MPs を単離し、EVs の表面マーカーにより PBMCs 由来 MPs (AnnexinV+/CD45+/CD14+), PMNs 由来 MPs(Annexin V+/CD45+/CD66b+)を決定し、細胞数を測定したところ敗血症患者で PMNs 由来 MPs の有意な増加を確認した (図 3A)。

次に敗血症患者および健康人の血漿中、MPs の IL-36 サイトカインを測定したところ敗血症患者で血漿中の IL-36g が有意に上昇し、MPs 中の IL-36Ra 濃度が敗血症患者で優位に上昇していた (図 3B、3C)。また、PMNs 由来 MPs 数と MPs 中の IL-36Ra 濃度に相関関係を認めた (図 3D)。

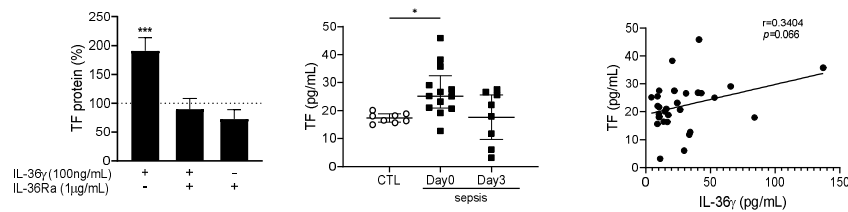
図 3 敗血症患者における IL-36 サイトカインプロファイル



(3)敗血症病態 (炎症・凝固・血管内皮細胞障害)における IL-36 サイトカインの役割

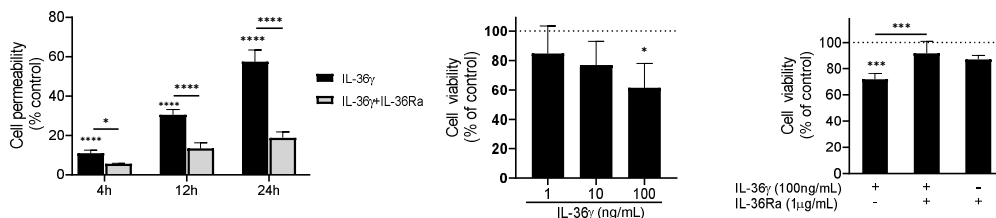
IL-36 サイトカインの血管内皮細胞 (HUVECs)における凝固、細胞障害を評価した。
凝固: IL-36 γ 刺激による HUVECs に TF の発現を誘導し、IL-36Ra と共培養することで TF の発現を抑制した。また、敗血症患者で血漿中の TF の上昇を認め、IL-36 γ レベルと弱い相関関係を認めた (図 4)。

図 4 IL-36 サイトカインによる血管内皮細胞の凝固に及ぼす影響



細胞障害: IL-36 γ 刺激による HUVECs は細胞死を起こし、血管透過性を更新させた。IL-36Ra と共培養することで、これらを抑制することが可能であった (図 5)。

図 5 IL-36 サイトカインによる血管内皮細胞障害と血管透過性の亢進

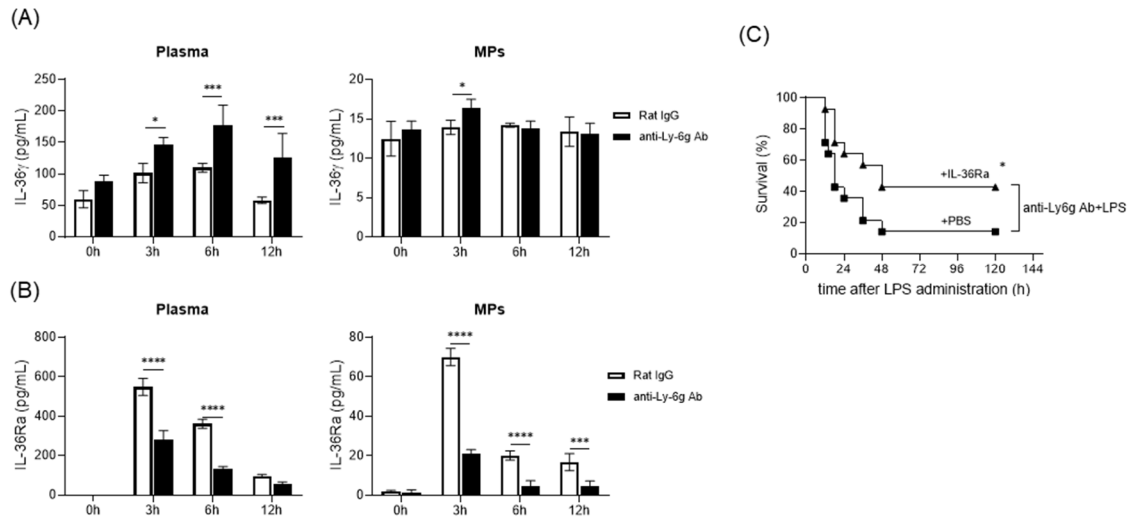


(4) IL-36 アンタゴニストによる治療法の可能性

好中球から放出される IL-36Ra が敗血症病態に関与していることを確認するため、抗 Ly-6g 抗体で好中球を除去したマウスに LPS を投与すると死亡率が上昇した。本モデルマウスでは、血漿中の IL-36g 濃度が有意に上昇しており、血漿・MPs 中の IL-36Ra 濃度が有意に減少していた (図 6A、6B)。

本モデルマウスにリコンビナント IL-36Ra を投与すると生存率が改善することが分かった (図 6C)。

図 6 LPS 投与致死性マウスモデルにおける IL-36Ra の治療効果



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kunishima H, Ishibashi N, Wada K, Oka K, Takahashi M, Yamasaki Y, Aoyagi T, Takemura H, Kitagawa M, Kaku M.	4. 巻 25
2. 論文標題 The Effect of Gut Microbiota and Probiotic Organisms on the Properties of Extended Spectrum Beta-Lactamase Producing and Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae Including Growth, Beta-Lactamase Activity and Gene Transmissibility	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemother	6. 最初と最後の頁 894-900
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jiac.2019.04.021	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 Baba H, Kanamori H, Kudo H, Kuroki Y, Higashi S, Oka K, Takahashi M, Yoshida M, Oshima K, Aoyagi T, Tokuda K, Kaku M.	4. 巻 14
2. 論文標題 Genomic Analysis of Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli From Patients and Asymptomatic Food Handlers in Japan.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0225340
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0225340	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 Kawamura M, Fujimura S, Tokuda K, Aoyagi T, Endo S, Kanamori H, Watanabe A, Kaku M.	4. 巻 17
2. 論文標題 Mutant selection window of disinfectants for Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Global Antimicrobial Resistance	6. 最初と最後の頁 316-320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jgar.2019.01.015	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 Aoyagi T, Sato Y, Toyama M, Oshima K, Kawakami K, Kaku M.	4. 巻 52
2. 論文標題 Etoposide and Corticosteroid Combination Therapy Improves Acute Respiratory Distress Syndrome in Mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Shock	6. 最初と最後の頁 83-91
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/SHK.0000000000001231	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 阿南直美・山城秀仁・高橋俊司・菅野のぞみ・賀来満夫・青柳哲史・森兼啓太・中島啓喜・小野由可・長田ゆかり・松尾収二・西 功・草野展周・能勢資子・田仲祐子・野上 智・宮本仁志・村上 忍・平松和史・三浦慎和・森永芳智・柳原克紀・上地幸平・前田士郎・吉田 立	4. 巻 73
2. 論文標題 2014年臨床分離好気性グラム陰性菌の薬剤感受性サーベイランス	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Japanese Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 219-244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Nanjo Yuta, Newstead Michael W., Aoyagi Tetsuji, Zeng Xianying, Takahashi Kazuhisa, Yu Fu Shin, Tateda Kazuhiro, Standiford Theodore J.	4. 巻 87
2. 論文標題 Overlapping Roles for Interleukin-36 Cytokines in Protective Host Defense against Murine Legionella pneumophila Pneumonia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	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) 10.1128/IAI.00583-18	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 該当する

1. 著者名 Nakamura Kiwamu, Saito Kyoichi, Hara Yasuka, Aoyagi Tetsuji, Kitakawa Kazuhiro, Abe Yoshinobu, Takemura Hiromu, Ikeda Fumihito, Kaku Mitsuo, Kanemitsu Keiji	4. 巻 18
2. 論文標題 Severe epidemic myalgia with an elevated level of serum interleukin-6 caused by human parechovirus type 3: a case report and brief review of the literature	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Infectious Diseases	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) 10.1186/s12879-018-3284-5	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 Aoyagi Tetsuji, Sato Yukio, Toyama Masahiko, Oshima Kengo, Kawakami Kazuyoshi, Kaku Mitsuo	4. 巻 -
2. 論文標題 Etoposide and Corticosteroid Combination Therapy Improves Acute Respiratory Distress Syndrome in Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 SHOCK	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) 10.1097/SHK.0000000000001231	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 Toyama Masahiko, Kudo Daisuke, Aoyagi Tetsuji, Miyasaka Tomomitsu, Ishii Keiko, Kanno Emi, Kaku Mitsuo, Kushimoto Shigeki, Kawakami Kazuyoshi	4. 巻 62
2. 論文標題 Attenuated accumulation of regulatory T cells and reduced production of interleukin 10 lead to the exacerbation of tissue injury in a mouse model of acute respiratory distress syndrome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 111 ~ 123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12564	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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 青柳 哲史
2. 発表標題 炎症性単球/マクロファージに着目した呼吸器感染症増悪メカニズムと治療戦略
3. 学会等名 第93回日本感染症学会総会・学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T Aoyagi, E Takei, Y Kawazoe, Y Nanjo, H Kanamori, K
2. 発表標題 IL-36 Cytokines in Extracellular Vesicles Secreted from Human Phagocytic Cells are Involved in Pathogenesis
3. 学会等名 ASM Microbe 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青柳 哲史 馬場 啓聡、金森 肇、大島 謙吾、吉田 眞紀子、徳田 浩一、賀来 満夫
2. 発表標題 敗血症における細胞外小胞体に包埋される IL-36 サイトカインの基礎的検討
3. 学会等名 第68回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第67回日本化学療法学会東日本支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青柳哲史
2. 発表標題 臨床課題解決を目指した基礎研究～感染病態におけるIL-36 cytokinesに着目して～
3. 学会等名 第92回日本感染症学会学術講演会 第66回日本化学療法学会総会 合同学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tetsuji Aoygai, Mina Kawauchi, Hajime Kanamori, Kengo Oshima, Makiko Yoshida, Koichi Tokuda, Mistuo Kaku
2. 発表標題 Clinical and bacteriological characteristics of Ba813 harboring Bacillus cereus in bloodstream infection in hospital setting
3. 学会等名 ASM microbe 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018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
研究分担者	久志本 成樹 (KUSHIMOTO SHIGEKI) (50195434)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	
研究分担者	工藤 大介 (KUDO DAISUKE) (30455844)	東北大学・医学系研究科・講師 (11301)	

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