

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08898

研究課題名（和文）実験的敗血症侵襲下でのIL6 signaling制御による臓器保護の可能性

研究課題名（英文）Potential organ protection by regulation of physiological IL6 signaling using experimental sepsis model mice.

研究代表者

小野川 傑（Onogawa, Tsuyoshi）

埼玉医科大学・保健医療学部・教授

研究者番号：90224287

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：盲腸結紮穿孔(CLP)による敗血症マウスを用いて、IL6 signalingを利用した臓器保護の可能性を検討した。マウスは術後24時間で約40%が35℃以下であった。IL6 signaling遮断のためのgp130投与（gp130群）により、中等度低体温の割合が増加した。そこでIL6Rを投与（IL6R群）したところ、予想通り低体温を示さなかった。術後24時間のLDは術前と比べ4倍以上の増加に対して、IL6R群では1.5倍の増加に抑えられた。肺ではSP-DとMMP-9は、IL6R群が最も低値を示した。

以上より、敗血症侵襲下のIL6 signalingは、保護的役割をもつことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究結果は、敗血症という急激な侵襲下における生理的なIL6 signalingが体温維持、さらには臓器保護においてかかせないものであることを示唆している。また、生理的なIL6 signalingが不足することにより臓器障害が悪化する可能性も推測された。IL6 signalingは関節リウマチのような慢性的な炎症反応においては遮断することが望ましいが、敗血症のような急激な炎症反応においては、宿主応答の制御の標的として重要な候補になりうることを明らかにできた。

研究成果の概要（英文）：Using the cecal ligation and puncture (CLP)-induced septic model mice, I investigated the potential organ protection by physiological IL6 signaling. Approximately 40% of the CLP mice were below 35°C 24 hours after CLP. Treatment of gp130 for IL6 signaling blockade (gp130 group) increased the rate of moderate hypothermia. When rIL6R was treated (IL6R group), as expected the IL6R group did not show hypothermia. Twenty-four hours after CLP, LD increased more than 4-fold compared to before surgery, but the increase was suppressed to 1.5-fold in the IL6R group. SP-D and MMP-9 in the lung showed the lowest levels in the IL6R group. From the above, it was suggested that physiological IL6 signaling under sepsis may play a protective role.

研究分野：免疫学

キーワード：敗血症 急性炎症 IL6 signaling 臓器障害 低体温

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

感染を伴う全身性炎症反応において、発熱は患者にとって不快であるものの、病原体排除や免疫系活性化に寄与する有益な生体反応と考えられている。実際、敗血症における発熱が重症化あるいは転帰不良と関連するものではないことが報告されている<sup>1)</sup>。一方、低体温を示す敗血症では発熱例と比較して死亡率が2倍以上と高く、予後不良であることも知られている<sup>2)</sup>。この低体温の原因としては、熱産生に必要なインターロイキン (IL) 6などの炎症性サイトカインの減少が疑われるものの、実際の低体温症例は IL6 をはじめとする炎症性サイトカインが高値を示すことから矛盾する。

IL6 が重症化にどのような機序でかかわるのかについては、明確に説明されていないのが実状である。興味あることに、敗血症の重症例は血清 IL6 が増加するものの、その IL6 signal を伝達するのに必要な可溶性 IL6 レセプター (sIL6R) が減少していることが報告されている<sup>3)</sup>。しかし、この意義については説明されていない。申請者が用いる敗血症モデルマウスにおいてもこのことは同様に再現されており、しかも可溶性 IL6R は低体温を示す重症例において顕著に低下していることを見出した (未発表データ)。さらに、低体温は凝固系を活性化する。敗血症性 disseminated intravascular coagulation (DIC) では、炎症性サイトカインが単球および血管内皮細胞に Tissue factor (TF) 発現を誘導するとともに、Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) などの抗凝固系因子の凝固制御不全を引き起こす。このため、敗血症の重症例では凝固亢進、凝固制御不全による微小循環内血栓形成と協働して臓器不全を起こすと考えられている<sup>4)</sup>。しかしながら、低体温下における敗血症の病態生理については、凝固系活性化に関与すると想定される免疫応答を含め、未だ明確ではない点が多い。

### 2. 研究の目的

敗血症において様々なサイトカインが測定されてきたが、それは単に高値を示すことが明らかにされただけで、その意義については詳細に検討されてきていない。確かに敗血症の重症例においては血中 IL6 が非常に高値を示す。これはモデルマウスにおいても同様である。そこで、なぜ重症例において IL6 が高値を示さなければならないのかについて考え、その受容体である可溶性 IL6R の変動に注目した。今回、敗血症における病態悪化は IL6 が高値であることが問題なのではなく、IL6 signaling をきちんと伝達しきれていないことが原因である、という仮説を立てた。つまり、炎症状態が悪化、あるいは持続するのは、炎症を誘引するシグナルがそれを抑制する機構にきちんと連動していないためであると考えた。

これまでの研究において、敗血症モデルマウスにリコンビナント IL6R を投与し、生体にとって必要とされると仮定した IL6 signaling を適切に細胞へ伝達することで、好中球による菌排除の亢進、敗血症の増悪因子として考えられている好中球エラスターゼやミエロペルオキシダーゼといった酵素の細胞外放出の抑制など、生体の過剰反応が抑制されることを報告してきた<sup>5, 6)</sup>。臓器障害を伴う敗血症の治療は一刻を争う。可溶性 IL6R を用いて重症化を予測できれば、それを回避する方法をとることも可能になるかもしれない。

### 3. 研究の方法

敗血症モデルマウスを用いたこれまでの実験等から、血中可溶性 IL6R が低体温で低下すること、さらに臓器障害はおもに肺を中心に見られることを確認している。そこでまず IL6R 低下、即ち生理的な IL6 signaling の低下と低体温と肺障害の程度との関係性を調べる。

可溶性 IL6R (sIL6R) が細胞へ結合するのを阻害する目的でマウス (ddY 10-12 週令、雄) の盲腸結紮穿孔 (CLP) 後 3 時間で可溶性 gp130 キメラタンパク (sgp130) を腹腔内投与し、IL6 signaling の低下がバイタル、組織障害とどのような関係性を示すのかを明らかにする目的で血清中の物質の測定および肺組織の検討を行った。

次に、可溶性 IL6R の低下がどのような機序において生じるのか検討するため、CLP 後のマウスについて、術後 3 時間、6 時間、24 時間、48 時間で採血し、その後肺を切除してホモジネート液を作製した。

### 4. 研究成果

本課題により得られた結果は以下の通りである。

#### (1) sgp130 による IL6 signaling 遮断は病態を悪化させる。

Trans-signaling と呼ばれる血中可溶性 IL6 レセプター (sIL6R) を介した IL6 signaling を利用した臓器保護の可能性を検討する目的で、まず sIL6R が細胞膜上の gp130 と結合するのを阻害する recombinant gp130 Fc chimera protein (gp130) を敗血症マウスに接種 (gp130 群) し、IL6 signaling が不十分な状態で肺組織においてどのような変化が生じるのかを中心に検討した。

マウスに CLP 後 3 時間で sgp130 を腹腔内接種し、CLP 後 24、48 時間での体温測定、肺 H&E、MMP-9 免疫染色、炎症関連物質の網羅的検出を試み、CLP のみの対照群 (CLP 群) と比較した。

gp130 群では、CLP 後 24 時間で 40.9%、CLP 群で 41.7%が 35℃以下の低体温を示した。しかし、低体温を示した個体を詳細に分類すると、軽度低体温が対照群では全体の 70.0%であったのに対して、gp130 群では 55.6%にとどまり、残り 44.4%が中等度低体温を示した (図 1)。

肺組織は 24 時間で両群共に間質部分の肥厚が認められ、48 時間にかけて悪化し、これは gp130 群において顕著であった。低体温下では MMP-9 陽性細胞が間質部分に多数浸潤しており、好中球であると推測された。またサンプル数が少ないためはっきりとは言えないものの、肺組織液の抗体アレイの結果から、gp130 群では好中球ケモカインなど炎症性物質のシグナルが対照群より高く、このことから IL6 signaling の阻害が好中球浸潤を招きやすい環境を作り出すことが推測された。

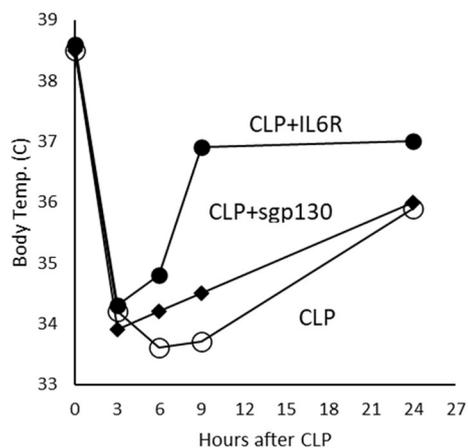


図 1 CLP 後の体温変化

(2) 可溶性 IL6R 補填による IL6 signaling の増強は病態悪化を回避する。

IL6 signaling の促進による臓器保護の可能性を検討するため、sIL6R を敗血症マウスに接種し、各種試料を得た。

マウスに CLP 後 3 時間でリコンビナント IL6R (rIL6R) を腹腔内接種 (IL6R 群) し、CLP 後 24、48 時間での体温測定、採血後に肺を摘出した。CLP 後 24 時間の体温は CLP 群では 35.2℃ (中央値) で 35℃以下が 37%、gp130 群では 33.3℃で 35℃以下が 39%であったのに対して、IL6R 群では 36.6℃で 35℃以下が 0%であった。これにより、rIL6R 投与で復温が可能になったことが明らかになった (図 1)。

血液は遠心分離後、組織傷害の指標となる LD を測定した。術前では 235 U/L であったが CLP 後 24 時間で CLP 群が 1001.5 U/L、gp130 群が 1341 U/L と 4-5 倍高値を示したのに対して、IL6R 群では 358 U/L と他群と比べて有意に低く、組織傷害の規模が他よりも小さい可能性が推測された。また肺ホモジネート液中の MMP-9 は CLP 後 24 時間で CLP 群と gp130 群は 400 ng/mL 以上であったのに対して、IL6R 群は約 270 ng/mL とやはり低かった。gp130 群の肺組織の免疫染色にて MMP-9 陽性細胞が間質部分に多数浸潤していた結果を得ているが、IL6R 群では浸潤細胞が少ないことが予想された。

以上のことから、CLP 後の IL6R 投与により IL6 signaling の促進を試みた結果、復温が認められ、また臓器障害の程度も対照群や gp130 群と比較して軽度になる可能性が推測された。

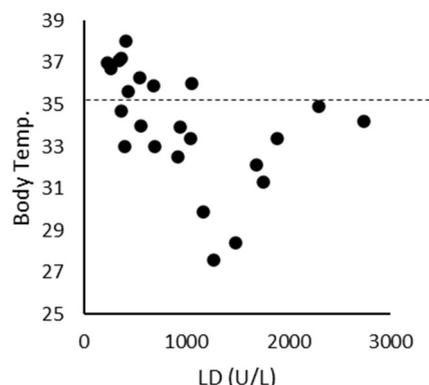


図 2 CLP 後 24 時間での体温と LD の関係

(3) 敗血症による低体温は肺障害を悪化させる。

血中 sIL6R を介した IL6 signaling を利用した臓器保護の可能性を検討する目的で、敗血症における低体温下での免疫機能の変化について解析した。

低体温の個体の肺組織を HE 染色で確認したところ、広範囲のうっ血を認めた。さらに低体温を示した場合、血中 LD や肺ホモジネート液の Surfactant protein-D が有意に高値を示した。そこでこれら因子のうち低体温と関連を示すのがあるか検索したところ、LD であることが明らかになった (図 2)。

以上のことから、低体温は組織障害を悪化させるため、早期に復温することが求められることが示唆された。CLP 群への rIL6R 投与が復温を促すことを明らかにしていることから、IL6R 量と LD について検討したところ、IL6R が低値を示す個体に LD が高値を示すことが明らかになった (図 3)。

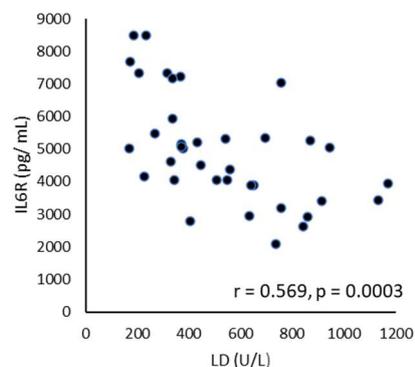


図 3 CLP 前、6 時間、24 時間での IL6R と LD の関係

(4) 血中 IL6R は血管透過性亢進による漏出により減少する。

CLP 後の肺ホモジネート液を用いて肺組織における IL6 signaling に必要な STAT3 の活性化について検討した。その結果、CLP 後 6 時間で STAT3 の活性化を認め、特に低体温を示す個体の活性化が高い傾向を認めた。その後 24 時間では術前と同じレベルに戻っていた。rIL6R を CLP 後に投与した群では、術後 6 時間までの動態は CLP 群と同じであるが、術後 24 時間でも STAT3 活性化を認めた。一方、trans-

signaling を遮断する目的の gp130 群では CLP 群と同じ動きをした。

そこで、血中及び肺組織の IL6R を定量した (図 4)。血中 IL6R 量は体温と相関が高く、低体温ほど血中 IL6R 量は低値であった一方で、肺組織中 IL6R は術後より経時的に増加していた。そこで、炎症による血管透過性亢進により、血中 IL6R が肺組織中に漏出している可能性を考え、アルブミン量を定量したところ、アルブミンの低下と肺組織中の IL6R の増加が逆相関していた。一方、IL6R 群はアルブミン低下率が他群よりも改善されていた。

以上のことから、低体温による組織障害の悪化理由として、血管透過性亢進による血中 IL6R の組織への漏出が原因による IL6 signaling の不足が推測され、IL6 signaling の是正による早期復温により、臓器の保護ができる可能性が考えられた。

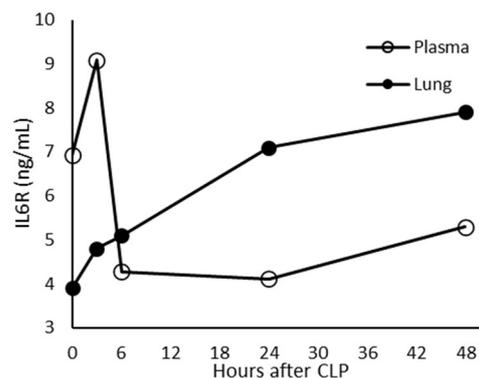


図 4 CLP 後の血中 IL6R と肺 IL6R の関係

#### 引用文献

- 1) Swenson BR, et al. Is Fever Protective in Surgical Patients with Bloodstream Infection? J Am Coll Surg 204: 815-821, 2007.
- 2) Clemmer TP, et al. Hypothermia in the sepsis syndrome and clinical outcome. The Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. Crit Care Med 20: 1395-1401, 1992.
- 3) Frieling JTM. et al., Circulating Interleukin-6 Receptor in Patients with Sepsis Syndrome J. Infect. Dis. 171: 469-472, 1995.
- 4) Levi M et al. Coagulation in patients with severe sepsis Semin Thromb Hemost 41: 9-15, 2015.
- 5) Onogawa T. Local delivery of soluble interleukin-6 receptors to improve the outcome of  $\alpha$ -toxin producing *Staphylococcus aureus* infection in mice. Immunobiol 209: 651-660, 2005.
- 6) Onogawa T, et al. IL6 *trans*-signaling promotes functional recovery of hypofunctional phagocytes through STAT3 activation during peritonitis. Inflamm Res 62: 797-810, 2013.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小野川 傑
2. 発表標題 臓器障害を伴う全身性炎症反応の重症化予測を目的としたIL6レセプター測定の基礎的検討
3. 学会等名 第50回日本救急医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野川 傑
2. 発表標題 実験的敗血症侵襲下におけるサイトカイン受容体の発現量は正が臓器障害の回避に向けた治療標的になる可能性
3. 学会等名 第49回日本救急医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野川傑、村本良三、黒田真代、下垣里河
2. 発表標題 低体温を示す敗血症モデルマウスの肺障害へ関与する因子の検討
3. 学会等名 第48回日本救急医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小野川傑、下垣里河
2. 発表標題 敗血症モデルマウス肺組織における浸潤好中球に与える低体温の影響
3. 学会等名 第47回日本救急医学会
4. 発表年 2019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
研究協力者	下垣 里河  (SHIMOGAKI SATOKA)		2019年度まで研究協力者

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