

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18336

研究課題名(和文) TLRアゴニストを利用したマウス敗血症モデルの拡張と免疫抑制状態の解析

研究課題名(英文) Sepsis mouse model using TLR agonists: focuses on TLR7/8 and TLR9 ligands, immune tolerance state, and effects on lipid metabolism

研究代表者

関 玲子 (Seki, Reiko)

帝京大学・医療技術学部・講師

研究者番号：30527495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、異なるTLRアゴニスト投与により全身性あるいは肝障害炎症を模倣したマウスを用い、炎症過程での好中球・血小板、肝臓での脂質代謝の関与について検討を行った。得られた知見は以下の通りである。

(1) 好中球を含むGr-1+細胞は抗炎症作用・肝障害に対し保護効果を有する(2) 免疫応答が弱いトレランス状態の肝臓では、脂肪酸取り込みに関するCD36遺伝子発現が著しく増加する(3) 身体的ストレスによっても肝臓のCD36遺伝子発現は著しく増加し、血清TGは一過性の減少後、著増する(4) TLRアゴニスト投与は減少後の血清TG著増を抑制する  
以上より、肝の脂質代謝が炎症に深く関与する過程の一部を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちは、敗血症でみられる免疫応答が弱くなっているトレランス状態や肝不全により炎症が増強されている状態、さらには拘束といった身体的なストレスにおいても、マウス肝臓の脂肪酸の取り込みに関するCD36遺伝子発現が迅速に著しく亢進することを見いだした。また血清TGの大きな変動を見だし、肝臓の脂質代謝が炎症初期から大きく関与することを明らかにした。一方、TLRアゴニストはその変化を抑制することから細菌感染による敗血症増悪の過程を解明するヒントをつかむことができた。

研究成果の概要(英文)：To gain insights into the roles for neutrophils and platelets and the lipid metabolism in the liver, we used mice model in which a variety of TLR ligands causes systemic inflammation accompanied by liver injury. The following findings were obtained.

(1) Gr-1+ cells involving neutrophils have an anti-inflammatory and protective role in the systemic inflammation/liver dysfunction model. (2) CD36 gene expression is profoundly upregulated in the liver during the tolerance state during which the immune response is suppressed after the TLR ligand induced inflammation. (3) Acute stress causes upregulation of CD36 gene and a rapid initial decrease in serum triglyceride followed by a subsequent increase. (4) TLR agonists that induces liver dysfunction compromise the increase of the serum triglyceride after the initial decrease. Taken together, these findings demonstrate a mechanism by which the lipid metabolism in the liver plays regulatory roles in inflammation and rapid immune response.

研究分野：免疫学

キーワード：炎症 TLR 敗血症 肝障害 脂質代謝 トレランス

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

敗血症では感染に対する宿主生体反応が制御不能となり、過剰な炎症反応とそれに続いて免疫応答抑制状態や全身性の代謝の低下が起こる病態であるがその機序は未だ完全には解明されておらず特異的な治療法が確立されていない。

D-ガラクトサミン (D-galN) はウリジン枯渇による細胞ストレスを生じることが知られており、D-galN と Toll like receptor (TLR)4 リガンドであるリポ多糖 (LPS) の同時投与 (D-galN/LPS 投与) を用いた肝障害モデルはこれまでもよく研究されている<sup>1)</sup>。我々は、LPS 以外の TLR リガンド (TLRL) を用いて肝障害と全身炎症の重症度が異なるマウスモデルを提案した<sup>2)</sup>。これらのモデルでは、TLRL の連続投与により炎症応答の抑制された状態 (トレランス状態) を誘導することが可能であり、その状態下での好中球・血小板の機能の関与を解析することは敗血症・敗血症症候群のトレランス状態の緩和、免疫細胞機能の回復に向けた可能性を広げることとなる。

また、敗血症症例で共通にみられる代謝上の変化として、脂肪酸 (FA) 酸化と酸化的リン酸化が抑制され不活発になることが知られているが、こうした分解・酸化の抑制によって臓器へのエネルギー供給が減少し不足することが、多臓器不全の直接の原因のひとつと考えられている。動物実験では、菌移植モデル、エンドトキシン投与モデルでも FA 酸化の抑制がみられ、それに伴いミトコンドリア生成・脂肪酸代謝の主要な調節因子である PGC-1 の発現が抑制される傾向が報告されている。しかし、その一方で類似した実験系でありながら PGC-1 の発現増加を示した論文も複数報告もなされている。これらについて広範な文献調査を含めた総説<sup>3)</sup>にて考察を行った結果、PGC-1 の発現は炎症刺激の強度やタイミングなどの条件によって細やかな調節をうけるものと考えられ、それは免疫とエネルギー代謝のバランス変化がともに炎症に深く関与する可能性を示す。筆者らが見出した免疫トレランス誘導モデルマウスにおいても、免疫細胞で解糖系が抑制され脂質分解を中心とするエネルギー代謝へと切り替わることが先行研究より予測可能であるが、肝臓を含め全身の細胞で行われているエネルギー代謝が免疫トレランス下においてどのように変化しているかについては、未だよく研究されていない。実際の臨床症例においても、敗血症はしばしば、とくに肝機能不全に伴って生じうる事例がみられることから、肝不全によって菌の感染そのものが初期に軽度でありながらもその影響が後に増強されるような系での脂質代謝の状態を探ることは、炎症とエネルギー代謝の関連を探るにあたり重要である。

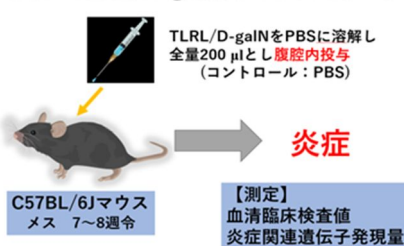
### 2. 研究の目的

異なる TLR アゴニスト投与により全身性あるいは肝障害/肝炎を模倣したマウスを用い、炎症過程に關与する因子、とくに好中球・血小板の役割、肝臓の脂質代謝の状態を解析し、各 TLRL による炎症の相違の理解を進め、様々な経過を示す敗血症症候群に対する異なる臓器障害特性を示すマウスモデルの構築を目指す。

### 3. 研究の方法

研究代表者らは、C57BL/6J マウス (7~8 週齢:メス) に LPS 以外の他の TLRL である CpG DNA (TLR9L) また R848 (TLR7/8L) と D-galN を投与すると、CpG DNA は比較的肝障害に特化した臓器障害を惹起するのに対し R848 は広範な全身性組織障害、敗血症性ショックとみられる病態を引き起こすことを見いだした<sup>2)</sup>。これらのマウスモデル (図1) を用いて、好中球や血小板の役割を抗体による細胞除去またはブロッキング法を用いて、血清臨床検査マーカーやサイトカイン遺伝子発現量の評価によりそれぞれの違いを解析した。また肝臓を採取し、脂質代謝に關与する遺伝子の発現量の相違を評価した。

図1 TLRL/D-galN投与マウスモデル



### 4. 研究成果

本課題を検討したことで得られた成果は以下の通りである。

#### (1) 好中球を含む Gr-1<sup>+</sup>細胞は抗炎症作用・肝障害に対し保護効果を有する。

Gr-1<sup>+</sup>細胞の depletion を引き起こす効果があることで知られる RB6-8C5 抗体の腹腔内投与後に TLR9L (または TLR7/8L)/D-galN 投与を行ったところ、同一アイソタイプのコントロール抗体を事前投与したマウス群に比べ、より顕著な炎症性サイトカインの血中上昇が示された。Gr-1<sup>+</sup> は好中球と一部のマクロファージからなる細胞群であるが、本結果から好中球は本 TLRL/D-galN マウスモデルにおいて抗炎症・抗免疫反応作用をもち、肝障害に対しても保護効果をもつことが示された<sup>2)</sup>。なお、本実験ではコントロール抗体そのものによっても抗炎症・抗免疫反応効果が示された。また、それは、R848 (TLR7/8) よりも CpG (TLR9L) を用いた場合に、とくに著し

かった。

先行研究では、免疫細胞以外では TLR9 アゴニストが組織保護的な効果を示すことが知られている（例えば Shintani et al., Cytokine 7: 50-56, 1995）。以上から、TLR9 による細胞刺激はトレランス誘導や組織修復に容易に転じる傾向があると考えられる。そして、そのような機構が進化の過程で生じた原因として、内因性の TLR9 リガンドであるミトコンドリア DNA への自然免疫応答にブレーキをかける必要性があったため、という考察が可能である。

(2) CpG DNA 投与による肝障害誘導マウスの肝臓で CD36 遺伝子発現は著しく増加する。また、身体的ストレスによっても同様な増加がみられ、血清 TG は一過性の減少後、著増する。

TLRL/D-galN による肝障害モデルでの脂質代謝の変化を解析するのが当初の目的であったが、本課題は予想外の展開をもたらした。まず、TLRL/D-galN 腹腔内注射後 5-8 時間の時点で、血清トリグリセリド (TG) の著しい減少 (20mg/dL 程度まで) がみられた。腹腔内投与をしていないマウスや、PBS 投与したマウスにも同様の TG 低下がみられた。これらの所見から、この TG の減少は、1, 5, 8 時間時点で実施した尾静脈採血に伴うストレス (とくに採血時にマウスに拘束をかけることによる急性ストレス) が原因で起こるという結論に至った。ストレスホルモンの関与を示唆する先行研究はあるが、私どもの結果はコルチコステロンがほぼ一定の値を示しており、このホルモンの変動では TG 減少を説明できなかった。肝 CD36 の mRNA レベルは著しく上昇をみせ、5 時間の時点で 10000 倍程度の増加を示した。なお、成熟マウスでは肝臓 CD36 発現が通常抑制されていることも、この著しい増加を可能にしていると考えられた (Seki et al., submitted)。

PBS 投与群も含めた多くのマウスにおいて、上述の一過性の TG 減少のあと、TG が通常の 2-3 倍まで増加し 24-48 時間の時点で高値を示した。これは LPS マウスにおいて TG が高値を示すという先行研究の知見が、ストレスモデルにも拡張される普遍性をもつことを示す。筆者らはリポタンパク質リパーゼ (LPL) の直接測定を行っていないが、ストレスにより、LPL が血中へリリースされ、それによる VLDL の TG 加水分解と CD36 を介する肝臓への FA 取り込みの増加、そして、肝臓内での再エステル化 (TG 生成)、それにつづく血中 TG の再上昇というパターンが生じていると解釈された<sup>4)</sup>。

(3) TLR アゴニスト投与は減少後の血清 TG 著増を抑制する。

LPS マウスの実験では、血中の脂質濃度の変化が LPS の投与量によって異なることが報告されている。本研究課題の実験系においても、TLRL のみならず D-galN を加えた投与による肝障害を伴う場合には、上述の TG 上昇 (リバウンド) が不十分であることが示された (Seki et al, manuscript preparation)。Khovidhunkit らの説、つまり疎水性の強い微生物由来の TLR リガンド等の炎症惹起物質のクリアランスが、血中の TG 濃度が増加することで促進するという解釈を考慮すると、D-galN を併用する肝障害モデルにおいて TG 再上昇が不十分となることは、肝不全における生体防御の脆弱化に説明を与えるものと考えられた。つまり、TG 再上昇が不十分であると、感染初期の自然免疫系応答が不十分となり感染が長期化し重症化しやすくなる可能性があると考えられた。

(4) 免疫応答が弱いトレランス状態の肝臓では、脂肪酸取り込みに関する CD36 遺伝子発現が著しく増加する。

R848/D-galN または CpG-DNA/D-galN 前投与は LPS 投与による ALT 値上昇を抑制することから (図 2)、肝障害を軽減する免疫寛容状態を誘導することを示した。この状態のマウス肝臓を用いて脂質代謝関連遺伝子発現を解析したところ、PBS 前投与のコントロール群を 1 とした場合に比べ、表 1 に示すように発現量が変化した。

図2 LPS投与1時間から7時間での血清ALT値変動

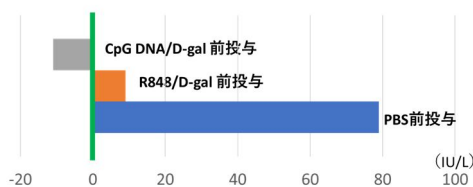


表1 免疫寛容状態下肝臓での遺伝子発現増加比

	IL-1a	IL-10	CD36	PGC-1	Nrf-1	PPAR
CpG DNA/D-galN 前投与	0.7	3.5	2	1.6	0.3	0.7
R848/D-galN 前投与	1.2	2.9	9.1	5.3	1.1	2.7

1) Seki R (2017) Toll-Like receptor ligand-induced liver injury in D-galactosamine-sensitized mice: differences between TLR7/8 and TLR9 ligands, cytokine patterns, and cross-tolerance induction by TLR2 ligand pretreatment. Journal of Immunology Research, 2017: 9653793.

2) Seki R, Nishizawa K (2020) Use of TLR9 and TLR7/8 agonists in combination with D-galactosamine in exploring models for distinct severities of systemic inflammation relative to liver injury. Physiological research, 69(6): 1125-1129.

3) Nishizawa K, Seki R (2021) Lipid Metabolism and Mitochondrial Biogenesis in Septic Liver – A Mini

Review Focused on PGC-1 $\alpha$  Expression. Ann Biomed Res 4(1): 121.

4 ) Nishizawa K, Seki R (2022) Regulation of Lipoprotein Lipase and Plasma Triglyceride in Acute Stress and Inflammation: Remaining Questions and Perspectives. Ann Biomed Res 4(1): 123.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Seki R, Nishizawa K	4. 巻 69
2. 論文標題 Use of TLR9 and TLR7/8 agonists in combination with d-galactosamine in exploring models for distinct severities of systemic inflammation relative to liver injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physiological Research	6. 最初と最後の頁 1125 ~ 1129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.33549/physiolres.934455	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 Nishizawa K and Seki R	4. 巻 4
2. 論文標題 Lipid Metabolism and Mitochondrial Biogenesis in Septic Liver -A Mini Review Focused on PGC-1 expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.0000/ABR.1000121	査読の有無 無
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 R Seki, K Nishizawa	4. 巻 2
2. 論文標題 Shikonin: a review with a focus on anti-inflammatory and anti-cancer mechanisms	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.0000/ABR.1000115	査読の有無 無
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 R Seki, K Nishizawa	4. 巻 2
2. 論文標題 Neutrophil Extracellular Trap Formation after Sterile Insults in Lung, Liver, Heart and Kidney: A mini-Review	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Biomedical Research	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) 10.0000/ABR.1000117	査読の有無 無
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 Nishizawa K, Seki R	4. 巻 4
2. 論文標題 Regulation of Lipoprotein Lipase and Plasma Triglyceride in Acute Stress and Inflammation: Remaining Questions and Perspectives.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.0000/ABR.1000123	査読の有無 無
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
---------------------------	-----------------------	----

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