

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791779

研究課題名(和文)

急性呼吸促迫症候群におけるインターロイキン17の動態解析と新規治療薬の開発

研究課題名(英文)

Kinetic analysis of interleukin 17 in acute respiratory distress syndrome and development of new therapeutic drugs

研究代表者

宮木 大 (MIYAKI MASARU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60365400

研究成果の概要(和文): IL-17 ノックアウトマウスを用い化学性肺炎モデルを作成した。経気道的に(1)、生理食塩水(SHAM)、(2)、生理食塩水と塩酸(ACID)、(3)、胃内容物と生理食塩水(SNAP)、(4)、胃内容物と塩酸(CASP)を散布し、経時的に生存数を確認した。生存数に関しては4群共に統計学的な優位差を認めなかったものの、SHAM, ACID間には差を認めておりIL-17がメディエーター変動に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文): We collected experimental data by creating chemical pneumonia models of IL-17 knockout mice. Mice were sprayed via the trachea. The spray contained the following: (1) physiological saline (SHAM); (2) physiological saline and hydrochloric acid (ACID); (3) mouse gastric content and physiological saline (SNAP); (4) mouse gastric content and hydrochloric acid (CASP). The number of surviving animals was calculated immediately after and at 24, 72, 120, and 168 hours after spraying. In regard to the number of survivals, there was no statistically significant difference, irrespective of whether SHAM, ACID, SNAP, or CASP was sprayed. However, the difference was detected between SHAM and ACID groups from either mouse species, which suggested a possibility that IL-17 may be involved in changes in mediators.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	1,500,000	450,000	1,950,000

研究分野：呼吸速迫症候群

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：呼吸速迫症候群、インターロイキン17

1. 研究開始当初の背景

集中治療を必要とする患者では原病、ならびに経過中に合併する重症感染症などの侵襲に対する生体反応が過大、あるいは異常となり病態増悪にも関係し、生体反応の抑制が救命に有用であったとの報告も見られる。しか

し、生体反応は非常に多様であり、各々の生体反応は単独では存在しえず、お互い関連しあい病態の進展、あるいは抑制に関与していると考えられる。傷病状態の増悪は臨床的に臓器不全の発症、予後の増悪という形で認識されるが、これは細胞レベルでの機能不全、

細胞死の結果とも考えられる。よって、重症患者に認められる「多様な生体反応の総和、細胞傷害、病態増悪」といった病態の中で、生体反応の異常、細胞レベルでの異常の診断を可能な限り早期に施行できれば臓器不全の発症予測が可能と考えられる。また、早期に生体反応を生体防御優位にコントロールできれば病態増悪を防止し、救命に寄与できるものと考えられる。

多発外傷・広範囲熱傷・環境障害・各種重症疾患など高度の侵襲を受けた患者の救命率は、ERでの初期治療、ICUでの集中治療の進歩により、大幅に改善したものの依然低く、その主要な原因として、後期に合併する多臓器機能障害 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS) や重症感染症が挙げられている。生体に高度侵襲が加わると、受傷後早期には非特異的炎症反応が惹起され、臨床的にはしばしば Systemic inflammatory response syndrome (SIRS、全身性炎症反応症候群) の状態となる。SIRS は MODS の準備状態として重視されているが、SIRS 基準を満たさない場合でも二次刺激に対し過敏となり、感染などを契機に MODS を発症することからこの時点で既に炎症反応以外の免疫変動を伴っていることがわかる。一方、受傷後期には重症難治性感染症を高率に併発するが、この時生体は、CARS (Compensatory anti-inflammatory response syndrome) と呼ばれる相対的免疫不全状態に陥っていることがわかっている。

我々は現在までに重症傷病後の病態を対象とし、侵襲に対する生体反応のうち神経系、内分泌系、免疫系などの変動を臓器障害、予後との関係にて検討し、カテコラミン (神経系) の免疫応答抑制、コルチゾル (内分泌系) のサイトカイン特にインターロイキン (IL) -6 遊離 (免疫系) 抑制、プロスタグランジン E2 の免疫系調節作用、IL -8 高値患者での肺障害をはじめとする臓器障害発症頻度の増加につき報告してきた。また、近年、主に炎症性、抗炎症性サイトカインの面から解析し、ケモカインの SIRS、MODS 発症後の病態関与に関して検索を行っていた。SIRS 前段階に生体内免疫変動がその後の病態形成に関与していることが判明し (Sasaki J, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 284:L270-L278, 2003)、その原因となる免疫変動を解析し、因子変動と補正による病態の

改善を見出した。

2. 研究の目的

リンパ球の SIRS、MODS 病態との関連は未解明の部分が多く、一部の病原菌が有する Super Antigen による STSS などの特異病態以外にはあまり注目されていなかった。しかし、Suntharalingan らが CD28 モノクローナル抗体を臨床試験としてヒトに投与し、全例で MODS を発症したことを報告しているように (N Eng J Med 2006;355(10):1018-1028)、リンパ球も侵襲病態の形成への関与が強く疑われ、その機序解明による新たな治療法の開発が期待される。

我々はこれまで、ヒト ALI/ARDS 患者の肺局所サイトカインを測定し、IL -17 が高値をとるとの知見を得ている。IL -17 は 1993 年にマウスの T 細胞ハイブリドーマからクローニングされた (Rouvier E, Luciani MF, Mattei MG, et al. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. J Immunol 1993; 150: 5445-56)。主に活性化 T 細胞より産生され、繊維芽細胞や上皮細胞、血管内皮細胞、マクロファージなど種々の細胞に作用して、炎症性サイトカインやケモカイン、細胞接着因子など、種々の因子を誘導して炎症を誘導することが知られている (Aggarwal S, Gurney AL. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. J Leukoc Biol 2002; 71: 1-8)。

IL -17 には G-CSF や CXCL8 等の発現を誘導する活性があり、このため顆粒球合成促進や好中球の活性化、炎症サイトへの遊走等が引き起こされることや、IL -1 や IL -6、TNF 等の炎症性サイトカインや、ICAM -1 等の細胞接着因子、iNOS、COX、メタロプロテアーゼなどの発現を誘導する活性も持っていることなどが知られており、一般的に活性化エフェクター T 細胞が産生する IL -17 のこれらの活性によって炎症が引き起こされるものと考えられている。しかし、IL -17 欠損マウスに接触型過敏症や遅延型過敏症、CIA (Collagen Induced Arthritis) を誘導した際、抗原特異的な T 細胞応答や抗体産生の低下が認められたことから、IL -17 が疾病増悪期だけではなく、T 細胞のプライミングのステージでも重要な

役割を果たしている可能性についても報告されている(Nakae S, Nambu A, Sudo K, et al. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. J Immunol 2003 ; 171 : 6173-7)。

本研究では、東京大学医科学研究所との共同研究として、塩酸誘発 ARDS モデルを使用して重症病態下の各種免疫変動、特に IL-17、ケモカインの動態、並びに随伴する生体反応性の変化を IL-17 ノックアウトマウスを用いて、免疫学的、分子生物学的手法により解明し、さらに ALI/ARDS 病態を明らかとすることを目的とした。

3. 研究の方法

250-300g の C57BL/6 wild type マウス並びに IL-17 ノックアウトマウスを用い化学性肺炎モデルを作成し実験データを収集する。ペントバルビタール 40mg/Kg 腹腔内投与と麻酔下にアクリル製の固定具を用いてマウスの体幹、四肢を固定する。その後専用器具にて気道確保を行い、マイクロスプレイヤーを用いて経気道的に散布する。

散布内容物は(1)、0.15 Mol 生理食塩水、pH 5.3 (以下、SHAM)、(2)、生理食塩水と塩酸 pH 1.25 (以下、ACID)、(3)、生理食塩水と胃内容物 40mg/ml (Small non-acidemic particle 以下、SNAP)、(4)、胃内容物と塩酸 40mg/ml pH 1.25(Combined acid and small gastric particles 以下、CASP)である。

SNAP と CASP に用いる胃内容物は C57BL/6 wild type マウスを安楽死させ、胃内容物を採取する。食物残渣をシリコンガーゼによって除去し pH5.3 生理食塩水を用いて3度洗浄する。オートクレーブにより加熱滅菌(25分、20 psi、121℃)を行い、その後遠心分離(2000 g、2分)を行い、上清液を用いる。散布時は窒息を予防するように手技を行い動物への負担も可能な限り小さくなるように配慮されている。

平成 21 年度

上述したモデルを用いて定めた測定ポイント(以下に示す)にてエーテルによる十分な吸入麻酔下にて屠殺し各種臓器の摘出(気道、肺、肝臓、脾臓)を行う。測定ポイント

は塩酸投与直後、1日、4日、7日であり、生存分析を行う。各日に生存中のマウスを安楽死させ摘出臓器、並びに屠殺直後に BAL を施行して回収した溶液よりケモカイン、特に IL-17、TNF- α 、好中球エラスターゼの動態解析を ELISA 法で行う。肺組織を凍結保存し、一部分よりサイトカインを、他の一部より RNA を各々抽出し前者を ELISA 法で、後者を Taqman にてそれぞれ解析する。また 4% パラホルムアルデヒドを用いて残肺の還流固定、浸潤固定を行いヘマトキシリン・エオジン染色を施行後病理学的な評価を行う。

他国の文献では気道散布後 4-8 時間で屠殺し、TNF- α の動態解析を行っている報告はあるものの(Nader DN, et al: The Role of Alveolar Macrophages in the pathogenesis of Aspiration Pneumonitis. Immunological Investigations, 36:457-471, 2007)、IL-17 や好中球エラスターゼといった他のケモカインの測定を行う点、7日間という長期的な生存分析を行う点などに相違点がある。

平成 22 年度

平成 21 年度に引き続き実験データを収集しつつ、データの解析を行う。

4. 研究成果

リンパ球の SIRS、MODS 病態との関連は未解明の部分が多くあまり注目されていなかった。しかし、我々はこれまで、ヒト ALI/ARDS 患者の肺局所サイトカインを測定し、IL-17 が高値をとるとの知見を得ている。本研究では、塩酸誘発 ARDS モデルを使用して IL-17、ケモカインの動態、並びに随伴する生体反応性の変化、ALI/ARDS 病態を明らかとすることを目的とした。250-300g の C57BL/6 wild type マウス並びに IL-17 ノックアウトマウスを用い化学性肺炎モデルを作成し実験データを収集した。ペントバルビタール 40mg/Kg 腹腔内投与と麻酔下にアクリル製の固定具を用いてマウスの体幹、四肢を固定する。その後専用器具にて気道確保を行い、マイクロスプレイヤーを用いて経気道的に散布する。散布内容物は(1)、0.15 Mol 生理食塩水、pH 5.3 (以下、SHAM)、(2)、生理食塩水と塩酸 pH 1.25 (以下、ACID)、(3)、マウス胃内容物と 0.15 Mol 生理食塩水、pH 5.3 (以下、SNAP)、(4)、マ

ウス胃内容物と 0.15 mol 生理食塩水、pH 5.3 (以下、CASP) とし、wild type マウス、並びに IL-17 ノックアウトマウスに同量の散布を行い、散布直後、24 時間後、72 時間後、120 時間後、168 時間後の生存数を確認した。胃内容物とは C57BL/6 wild type マウスより胃を採取し、内容物を生理食塩水で 3 回洗浄し、オートクレーブにて殺菌後に遠心分離 (2000 回転/分、2 分間) したものである。生存数に関しては SHAM、ACID、SNAP、CASP 共に wild type マウス、IL-17 ノックアウトマウス間に統計学的な差を認めなかったものの、SHAM、ACID 間は差を認めており塩酸誘発 ARDS モデルに関して、IL-17 がメディエーター変動に関与する可能性が示唆された。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮木 大 (MIYAKI MASARU)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：60365400

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし