

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16569

研究課題名（和文）敗血症におけるIL-22関連蛋白の腸管恒常性破綻への関与とその制御

研究課題名（英文）The significance of interleukin-22 related proteins on disruption of intestinal homeostasis in sepsis

研究代表者

大網 毅彦（Oami, Takehiko）

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70527887

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：腸管免疫細胞から分泌されるinterleukin（IL）-22は腸管上皮再生を促進し、抗菌ペプチドの産生誘導により腸内細菌叢に影響を与える。本研究では敗血症におけるIL-22の腸管恒常性への関与を解明し、IL-22の制御による敗血症治療につなげることを目的とした。まず、敗血症モデルマウスにおいて血清中および小腸上澄み液のIL-22濃度が上昇していることを確認した。IL-22の制御を企図したIL-22欠損マウスでは腸管透過性や生存率の変化が見られなかった一方で、IL-22の抑制系蛋白であるIL-22 binding protein（BP）欠損マウスでは腸管透過性の亢進と生存率低下を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症において、バリア機能の低下した腸管上皮細胞や活性化した腸管免疫担当細胞、バランスの乱れた腸内細菌叢が臓器不全の進行を促進するとされている。本研究ではIL-22の抑制系蛋白であるIL-22 binding protein（BP）が腸管透過性の亢進を介して敗血症の病態において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。今後腸内細菌叢やサイトカインの解析を進めることにより、IL-22BPの腸管恒常性への関与をさらに明らかにし、敗血症の新たな治療法の開発を目指す。

研究成果の概要（英文）：Interleukin（IL）-22, secreted by intestinal immune cells, promotes the regeneration of the intestinal epithelium and induces the production of antimicrobial peptides, thereby positively influencing the gut microbiota. This study analyzed the dynamics of IL-22 using a murine sepsis model. The results indicated elevated levels of IL-22 in both the serum and the supernatant of the small intestine. In IL-22 knockout mice, no significant changes in intestinal permeability or mortality were observed. Conversely, in IL-22 binding protein（BP）knockout mice, increased intestinal permeability and reduced mortality were demonstrated. These findings suggest that IL-22BP plays a significant role in the pathophysiology of sepsis by impacting gut homeostasis. Our research is expected to elucidate the involvement of IL-22 in maintaining intestinal homeostasis during sepsis and to develop potential treatments by targeting IL-22 regulation.

研究分野：救急集中治療医学

キーワード：腸管透過性 IL-22 腸内細菌叢 盲腸結紮穿孔モデル 集中治療

1. 研究開始当初の背景

敗血症は感染により惹起された生体反応が制御困難となり臓器障害を呈する病態であり、高い死亡率が問題になっている。敗血症の病態を制御する直接的な治療は存在せず、感染制御と人工補助療法を含めた全身管理が治療の中心である。腸管は不全臓器としてだけでなく、炎症を惹起して敗血症の病態を増悪させうる“モーター”としても注目されている(Mittal R et al. Trends Mol Med. 2014;20:214-23)。腸管内には数百兆個の腸内細菌が存在し、腸管バリア機能と栄養吸収を司る腸管上皮細胞、病原菌の侵入阻止や過剰な炎症の制御を行う腸管免疫細胞と協調しながら、免疫や代謝を含めた生体のシステムと絶妙なバランスを取って腸内環境の恒常性を維持している(Oami T et al. Curr Opin Crit Care. 2019;25:145-9, Fay KT et al. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2017;1863:2574-83)。しかし、敗血症の病態ではバリア機能の低下した腸管上皮細胞や活性化した腸管の免疫担当細胞、バランスの乱れた腸内細菌叢が全身の炎症反応を増幅することが明らかになっている。これらの崩れたバランスを調整して腸管恒常性の破綻を食い止めることによって、敗血症患者の転帰改善につながることを期待される。

Interleukin (IL)-22 は腸管の CD4⁺T 細胞と自然リンパ球から分泌される IL-10 ファミリーに属するサイトカインであり、腸管上皮細胞に発現する受容体に結合することで上皮細胞の再生や抗菌ペプチドの産生誘導による腸内細菌叢の恒常性維持に関与する(Sabat R et al. Nat Rev Drug Discov. 2014;13:21-38)。また、樹状細胞から産生される IL-22 結合蛋白(binding protein; BP) が拮抗的な作用を示し、腸管上皮細胞に作用する最終的な生理活性が調節されている。IL-22 を過剰発現させた炎症性腸疾患モデルマウスにおいて腸管の炎症改善と腸管上皮細胞の再生が示され(Sugimoto K et al. J Clin Invest. 2008;118:534-44)、今後の臨床応用が期待されている。一方、敗血症患者において血清 IL-22 濃度の上昇が認められたが(Bingold T et al. Shock. 2010;34:337-40)、その意義については明らかにされていない。また、敗血症モデルにおいて IL-22 BP 投与による臓器不全の改善が報告されているが(Weber GF et al. Infect Immun. 2007;75:1690-7)、この研究では腸管内での IL-22 関連蛋白の変化や腸管透過性を含めた変化についての言及がない。マウス熱傷モデルにおいては IL-22 投与による腸管透過性の改善と dysbiosis の抑制が見られた一方で(Hammer AM et al. Shock. 2017;48:657-65)、敗血症において IL-22 が腸管恒常性の破綻にどのように関わっているかに焦点を当てた研究は行われていない。そこで、敗血症において IL-22 が腸管上皮細胞と腸内細菌叢への影響を通して恒常性維持に関与して病態生理や予後に影響を与えているという仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は IL-22 及び IL-22BP 欠損マウスを用いて IL-22 関連蛋白の敗血症病態での生理的な意義を明らかにし、敗血症治療への応用の可能性を調べることである。

3. 研究の方法

(1) 敗血症モデルにおける腸管 IL-22 と IL-22BP の動態解析

本実験では、敗血症モデルとして盲腸結紮穿孔(cecal ligation puncture; CLP)手術を施行する。具体的には、8~12週の C57B/6 マウスに対して全身麻酔後に開腹し腸内容を盲腸先端まで圧搾した後に盲腸の根部を結紮する。結果として緊満した盲腸を、25 ゲージ注射針で 2 回穿刺する。その後、盲腸の穿孔部位から便が搾り出されることを確認し、盲腸を環納して閉腹する。コントロール群として、盲腸の結紮穿孔以外は全て同じ処置を行う単開腹(Sham)モデルを使用する。より臨床患者に近い敗血症モデルを作成するために、術後に蘇生輸液として 1mL の生理食塩水と抗菌薬投与を行う。この敗血症モデルの 1 週間以内の死亡率は 50%程度が見込まれる。

続いて、血清及び小腸から抽出した上澄み液中の IL-22 濃度測定を行う。また、IL-22 と IL-22BP を分泌する腸管免疫担当細胞の解析を行う。CLP 手術を施行したマウスから小腸を採取し、パイエル板や腸管上皮細胞間 T 細胞、粘膜固有層に存在する免疫担当細胞を分離する。単離した細胞を表面マーカー及び IL-22、IL-22BP 抗体で染色した後、フローサイトメトリーで白血球の分画ごとに IL-22 関連蛋白の陽性細胞数を解析する。さらに免疫組織染色により局在を確認する。

(2) 敗血症病態における IL-22 及び IL-22BP 欠損マウスを用いた機能解析

敗血症において、いずれの IL-22 関連蛋白を阻害もしくは補充することが生体にとって好ましいかを検証するために、CLP 手術を施行した IL-22 及び IL-22BP 欠損マウス(東京医科大学医学総合研究所・善本隆之教授および理化学研究所よりそれぞれ供与)を用いて機能解析を進める。術後 24 時間の時点で以下について解析する。

クレアチニンと蛍光標識色素投与 (Fluorescein isothiocyanate-dextran [FD4]: 4kDa, Rhodamine 70: 70 kDa) を用いた分子量の異なる腸管透過性の解析
 Western blotting による tight Junction (TJ) 蛋白発現の解析
 腸管の病理組織学的解析
 フローサイトメトリーによる腸管免疫担当細胞の動態解析
 IL-1 , IL-6, Tumor necrosis factor (TNF)- などの血中サイトカイン濃度測定

これらの解析により野生型 (WT) マウスと比較することで IL-22 シグナルの敗血症病態における役割を明らかにする。

(3) IL-22 及び IL-22BP 欠損マウスにおける敗血症病態での腸内細菌叢の変化

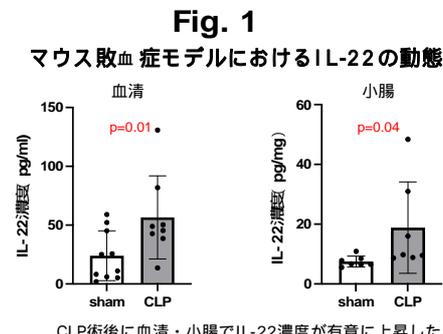
敗血症において IL-22 と IL-22BP が腸内細菌叢に及ぼす影響を検証するために, CLP 術後の腸内細菌叢の定量的評価と 16S rRNA 遺伝子を用いた菌叢解析を行う。腸内細菌叢の定量的評価を行うために便中の DNA を抽出し, 全ての細菌に共通の 16S rRNA 遺伝子と腸内細菌叢に共通の 16S rRNA 遺伝子を Real-time PCR により細菌のコピー数を解析する。また, 16S rRNA 遺伝子を用いた菌叢解析については, 検体から抽出した DNA をもとに 16S rRNA 遺伝子の V3-4 領域を PCR で増幅して DNA ライブラリを作成後, シークエンサー (HiSeq2000, illumina) で腸内細菌叢の配列を決定する。以上の実験方法により腸内細菌叢の変化を解析する。

4. 研究成果

(1) 敗血症モデルにおける腸管 IL-22 と IL-22BP の動態解析

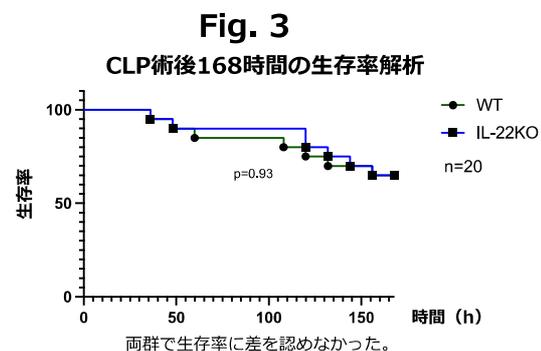
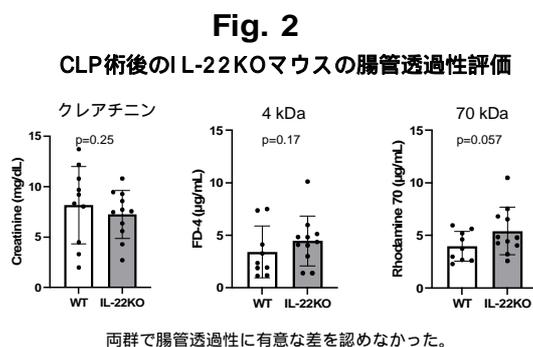
CLP 術後 24 時点での血清中の IL-22 濃度は sham マウスに比べて CLP マウスで有意に上昇していた。また, 小腸上澄み液の IL-22 濃度についても sham マウスに比べて CLP マウスで有意に上昇していた (Fig. 1)。

現在, 腸管免疫細胞解析と免疫組織染色による局在評価を進めている。

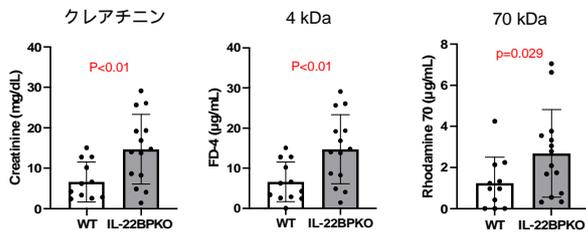


(2) 敗血症病態における IL-22 及び IL-22BP 欠損マウスを用いた機能解析

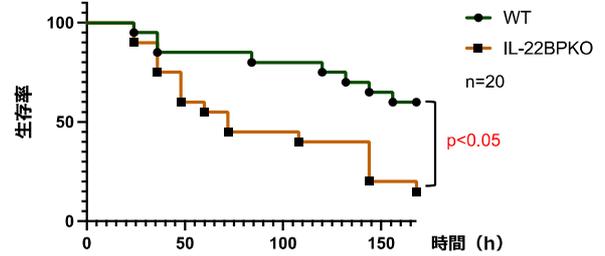
IL-22 の制御を企図した遺伝子欠損マウスとして IL-22 欠損マウスを用いて, CLP24 時間後の腸管透過性測定 (クレアチニン, FD-4, Rhodamine 70) や生存率解析を行ったが, WT マウスと IL-22 欠損マウスで有意な差を認めなかった (Fig. 2 及び Fig. 3)。



一方, IL-22 の抑制系蛋白である IL-22 binding protein (BP) を欠損させた IL-22BP KO マウスを用いて CLP 術後の腸管透過性測定 (クレアチニン, FD-4, Rhodamine 70) と生存率解析を行ったところ, WT マウスに比べて IL-22BP KO マウスで有意な腸管透過性亢進 (Fig. 4) と生存率低下を認めた (Fig. 5)。

Fig. 4**CLP術後のIL-22BPKOマウスの腸管透過性評価**

IL-22BPKOマウスで全ての経路において有意に腸管透過性が亢進した。

Fig. 5**CLP術後168時間の生存率解析**

WTと比較してIL-22BPKOマウスの生存率が有意に低下した。

以上の結果から IL-22BP が腸管恒常性の破綻を介して敗血症の病態に大きく関わっている可能性があると考えた。現在 IL-22BP の敗血症病態への影響をさらに検証するために、TJ 蛋白発現の解析やフローサイトメトリーによる腸管免疫担当細胞の動態解析、腸管の病理組織学的解析を進めている。

(3) IL-22 及び IL-22BP 欠損マウスにおける敗血症病態での腸内細菌叢の変化

現在 CLP 術後の腸内細菌叢の定量的評価と 16S rRNA 遺伝子を用いた菌叢解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------