

令和 6 年 4 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20934

研究課題名（和文）糖尿病患者の感染症重症化機序の解明：血管内皮細胞pyroptosisによるIL-1 放出

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of aggravation of infectious diseases in diabetic patients

研究代表者

三瓶 想 (Sampei, So)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：60966646

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病モデルマウスおよび対照群の野生型マウスにLPSを用いて炎症を惹起し、6時間後にsacrificeした両マウスの肺および心臓、腎臓、肝臓について抗IL-1 抗体を用いて免疫組織染色した。肺と心臓ではほとんどIL-1 陽性細胞が確認できなかったが、腎臓と肝臓において陽性細胞の集積が確認された。また血管内皮細胞のpyroptosisについて評価するため、抗CD31抗体と抗Caspase-1抗体および抗NLRP3抗体を用いて蛍光二重免疫染色を施行したところ、Caspase-1およびNLRP3が肺と腎臓の血管内皮細胞と共局在することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病患者は感染症に罹患すると重症化することが多く、死亡率が高いが、重症化予防のための治療法は確立していない。重症化や転帰不良の機序として、免疫機能低下が報告されているが、感染急性期の過剰炎症による臓器障害もその一因であることが示唆されている。本研究では過剰炎症の原因について血管内皮細胞に着目し、その傷害がpyroptosisを起こし炎症を持続させると仮定し、IL-1 産生細胞やpyroptosisを起こす細胞の同定を試みたところ、臓器によって障害の程度に差異がありそうなのが判明した。即ち障害されやすい臓器にアプローチすることで、過剰炎症を改善し、転帰を完全する足がかりとなる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Inflammation was induced in diabetic model mice and control wild-type mice using LPS, and 6 hours later, the lungs, hearts, kidneys, and livers of both mice were removed and immunohistostained using an anti-IL-1 antibody. Almost no IL-1 positive cells were observed in the lungs and heart, but accumulation of positive cells was observed in the kidney and liver. Next, to evaluate pyroptosis in vascular endothelial cells, we performed double fluorescence staining using anti-CD31 antibody, anti-caspase-1 antibody, and anti-NLRP3 antibody. Caspase-1 and NLRP3 were detected in vascular endothelial cells in the lungs and kidneys. It was found that they colocalized.

研究分野：救急医学

キーワード：敗血症 血管内皮グリコカリックス 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者は感染症に罹患すると重症化することが多く、死亡率が高いが重症化予防のための治療法は確立していない。重症化や転帰不良の機序として、免疫機能低下が報告されているが、感染急性期の過剰炎症による臓器障害もその一因であることが示唆されている。

本研究では、糖尿病モデルマウスを用いて血管内皮細胞に注目し感染時の重症化機序の解明を行う。申請者はこれまでの研究で、糖尿病モデルマウスにおいて、血管内皮細胞を保護する血管内皮グリコカリックスが慢性的に菲薄化、即ち物理的バリアが減弱し、全身性炎症誘導モデルで肺傷害および生存率が悪化し、血清 IL-1 が高値遷延することを示した。しかし、IL-1 産生細胞や産生機序は明らかになっていない。そこで本研究では、「糖尿病モデルマウスでは、易傷害状態の血管内皮細胞が感染時に pyroptosis を起こし、IL-1 を放出することが臓器障害および生存率悪化に繋がる」と仮説をおき、これを証明する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、仮説「糖尿病モデルマウスにおいて、感染症罹患時に血管内皮細胞が傷害されて多くの pyroptosis が生じ、IL-1 が多量に放出されることによって感染急性期の炎症が過剰となり、死亡率が上昇する」を証明することである。これが証明されれば、血管内皮グリコカリックスを治療ターゲットと捉え、糖尿病患者に対して、日常的(感染症罹患前)に「血管内皮グリコカリックスを正常に保つ=血管内皮細胞を保護する」ことによる、感染症罹患時の重症化予防の開発という、さらなる研究に繋げる。

3. 研究の方法

(1) 糖尿病モデルマウスを用いた感染モデルの検討

雄 9-12 週齢の C57BLKS/J *Iar-+Iepr^{db}/Iepr^{db}* (db/db) マウスを本研究の 2 型糖尿病のモデルとして使用する。本マウスを用いた感染モデルとして、Lipopolysaccharide (LPS) を麻酔下に腹腔内から投与して全身性炎症誘導モデルとし、生存率が 30-50%程度となる LPS の投与量を検討する。

(2) IL-1 産生細胞の同定

糖尿病モデルマウスについて、野生型マウス (C57BLKS/J) を対照群とし、(1)で検討した容量の LPS を投与し、6 時間後に sacrifice する。その後肺および心臓、腎臓、肝臓の臓器を摘出してパラフィン包埋し、得られた各臓器について切片を作成し、抗 IL-1 抗体(ab205924, Abcam)を用いて免疫組織染色を施行する。

(3) pyroptosis 細胞の同定

(2)で得られた切片を抗 Caspase-1 抗体 (A0964, ABclonal)、抗 NLRP3 抗体(A5652, ABclonal) および抗 CD31 抗体(GB13063, Servicebio)で蛍光二重免疫染色を行う。Caspase-1 および NLRP3 は pyroptosis の評価目的に使用し、CD31 は血管内皮細胞に対する抗体として、pyroptosis を起こしている細胞と血管内皮細胞との共同在を評価するために使用する。

4. 研究成果

(1) 糖尿病モデルマウスを用いた感染モデルの検討

糖尿病モデルマウスに投与する LPS の量を 5.0-10.0 mg/kg まで投与し、生存率を評価した。その結果、LPS 5.0 mg/kg の腹腔内投与で生存率 42.9%となったため、以下の実験でこの投与量を採用した。

(2) IL-1 産生細胞の同定

LPS 投与 6 時間後の糖尿病モデルマウスおよび対照群の野生型マウスの肺、心臓、腎臓、肝臓について、抗 IL-1 抗体を用いて免疫組織染色した後、光学顕微鏡にて観察を行った。糖尿病モデルマウスおよび対照群の野生型マウスの両者共に、肺および心臓で明らかな IL-1 陽性細胞を確認することができなかった。一方、腎臓の近位尿細管上皮細胞および肝臓の門脈付近に IL-1 陽性細胞を認めた。また光学顕微鏡下での観察では、糖尿病モデルマウスと野生型マウスとの差異は明らかでなかった。この結果について、当初、重症敗血症は microthrombosis や多臓器不全を起こすことから、pyroptosis は全身の臓器で惹起され、主たる pyroptosis の場を血管内皮細胞と考えていた。しかし、IL-1 陽性細胞は肺および心臓ではほとんど

確認できず、腎臓や肝臓などでみられるといった、臓器に差異があることが分かった。心臓、肺の血管内皮細胞は共に連続型であり血管内皮グリコカリックスも正常構造では隙間なく血管内皮細胞を覆っている一方、腎臓および肝臓の血管は、有窓構造や類洞を有しており、血管内皮グリコカリックスはやや粗な構造をとることから、これらの構造の違いが何らかの影響を与えた可能性がある。今後、臓器間での IL-1 の差異について、定量的評価を行うことを検討中である。また LPS 投与 6 時間後の組織評価であることから、併せて経時的な変化がないか、今後検討を行う予定である。

(3) pyroptosis 細胞の同定

(2)と同様、LPS 投与 6 時間後の肺、心臓、腎臓、肝臓に対して抗 NLRP3 抗体および抗 Caspase-1 抗体と抗 IL-1 抗体を用いた蛍光二重免疫染色を施行した後、蛍光顕微鏡下にて観察を行った。肺および腎臓で NLRP3 および Caspase-1 と血管内皮細胞との共局在がみられたが、心臓および肝臓では明らかでなかった。この結果について、(2)において肺では IL-1 陽性細胞が確認できていないことから、他の抗体などを用いてさらに血管内皮細胞の pyroptosis への関与について検討する。一方、(2)で IL-1 陽性細胞がみられた腎臓の近位尿細管上皮細胞において、NLRP3 および Caspase-1 の集積がみられたことから、これらの細胞が pyroptosis に何らかの関与をしている可能性が示唆された。今後は血管内皮細胞だけでなく、これらの細胞の pyroptosis への関与についても引き続き評価を行っていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三瓶想、岡田英志、工藤大介、久志本成樹
2. 発表標題 血管内皮グリコカリックスの回復は敗血症重症化を予防する可能性がある
3. 学会等名 第51回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2024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
---------------------------	-----------------------	----

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