

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591194

研究課題名(和文)敗血症性急性腎傷害におけるミトコンドリア由来ダメージ関連分子パターンの役割の検討

研究課題名(英文)Role of mitochondrial damage-associated molecule patterns on septic acute kidney injury

研究代表者

安田 日出夫(Yasuda, Hideo)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60432209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：目的は1)敗血症でミトコンドリア(mt)DNAが全身循環に放出されるか、2)全身循環性mtDNAは急性腎傷害(AKI)を誘導するか、3)mtDNAによるAKIはToll-like Receptor (TLR) 9を介するかを明らかにすることである。マウスでの腹膜炎による敗血症では早期に血中mtDNAは大量に検出され、その後に腎機能は低下した。TLR9ノックアウト(KO)によって敗血症性AKIは軽減した。mtDNAを多く含むmt成分をマウスに注入すると腎に酸化ストレス障害が誘導され、TLR9KOによって軽減された。以上より、敗血症で放出されたmtDNAはTLR9を介してAKIを誘導する。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify whether 1) mitochondrial (mt) DNA is released during sepsis, 2) circulating mtDNA can induce acute kidney injury (AKI), and 3) the effects of mtDNA on kidney injury can be exerted via Toll-like Receptor (TLR) 9. Polymicrobial sepsis by peritonitis in mice early caused lots of circulating mtDNA followed by renal failure. Septic AKI was improved by TLR9 knockout (KO). Administration of mt debris including much mtDNA caused renal oxidative stress and mt injury, which was reduced by TLR9KO. Circulating mtDNA released during sepsis contributes to AKI via TLR9.

研究分野：腎臓学

キーワード：急性腎障害 敗血症 自然免疫 ミトコンドリアDNA

1. 研究開始当初の背景

急性腎障害(Acute Kidney Injury ; AKI)の罹患率は近年増加の一途を辿り、集中治療室で発生した AKI は多臓器不全を伴い、死亡率は 60-70%にも及ぶ。敗血症は集中治療室での AKI の原因で最も多く、予後不良である。以上のことから、敗血症による AKI は現代の AKI の最重要課題でありその対策は急務である。敗血症による臓器障害は、外来侵入物によって引き起こされる生体反応によって導かれる。その生体反応は外来微生物のコンポーネントを認識する Toll-like Receptors (TLR) によって活性化される。TLR4 はグラム陰性桿菌由来のエンドトキシンを認識し、TLR9 は細菌由来の DNA を認識する。cecal ligation and puncture(CLP)腹膜炎モデルで、AKI が TLR4 欠損マウスでは軽減されず、TLR9 欠損マウスで軽減される。このことから、細菌性 DNA 以外に TLR9 を活性化するリガンドが存在する可能性がある。TLR のリガンドには内因性分子の存在も知られ、ダメージ関連分子パターン (damage-associated molecular patterns: DAMPs)と呼ばれている。外傷患者の血中にミトコンドリア由来 DAMPs が循環し、それが SIRS の引き金になることが知られている。以上のことから、腹膜炎による敗血症では腹膜もしくは網内系で生じる免疫反応による細胞傷害もしくは細胞死からミトコンドリア DAMPs が血中に放出され、TLR9 を介する AKI を含む臓器不全をきたし死に至るのではないかと仮説を立てた

2. 研究の目的

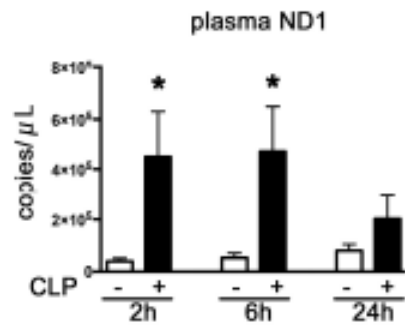
ミトコンドリア DAMPs としてのミトコンドリア DNA が敗血症性 AKI に関与するかどうかを検証することが目的で、1)敗血症でミトコンドリア(mt)DNA が全身循環に放出されるか、2)全身循環性 mtDNA は急性腎傷害 (AKI)を誘導するか、3)mtDNA による AKI は Toll-like Receptor (TLR) 9 を介するかを明らかにする。

3. 研究の方法

雄性 C57/BL6 の wild type(WT)マウスと TLR9 knock out (KO)マウスに対して Cecal ligation and puncture (CLP)による敗血症を惹起し、2,6,24 時間後の、血中、腹水中の mtDNA 量と腎障害、血中サイトカイン、脾臓アポトーシスを検討した。さらに mitochondria debris(MTD)を投与し、腎障害とサイトカイン、脾臓アポトーシスを検討した。

4. 研究成果

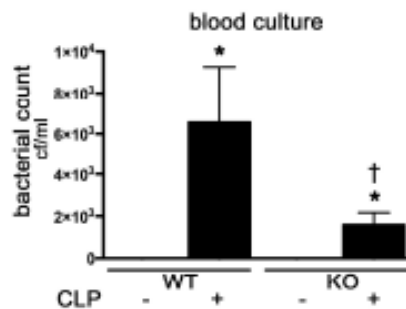
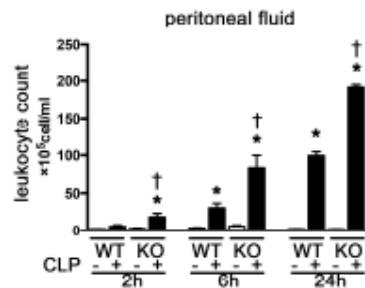
1)CLP 後のミトコンドリア DNA 動態
血中ミトコンドリアは CLP では Sham と比べて mtDNA は 2, 6h で高値を示した。



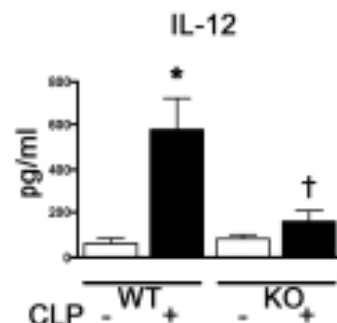
(* P<0.05 vs sham)

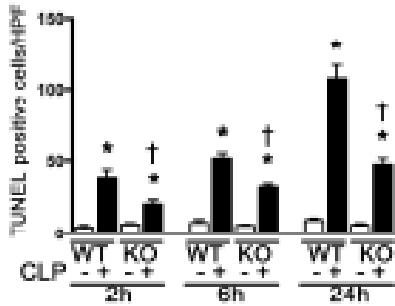
腹水中ミトコンドリア DNA は sham と比較して CLP で 2,6 時間後に増加したが、TLR9KO でより一層増加した。

2)CLP 後の腹水中白血球、血液培養
sham に比べて CLP では腹腔内白血球は増加した。TLR9KO で腹腔内白血球浸潤はさらに増加した。CLP 後の菌血症は TLR9KO で軽減した。

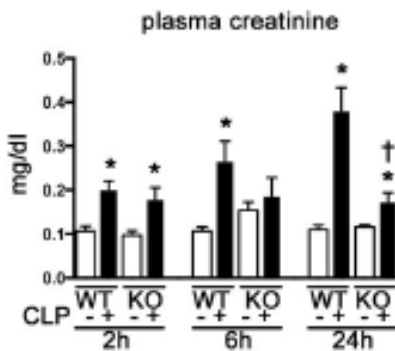


3)CLP 後の脾臓内アポトーシス、血中 IL-12
脾臓内アポトーシスおよび血中 IL-12 は sham と比べて CLP で増加し、TLR9KO で軽減した。



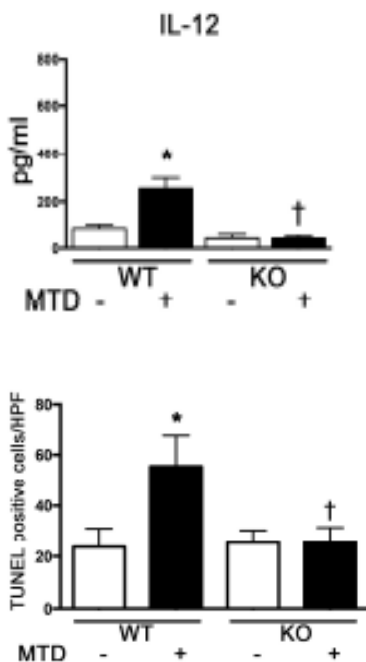


4)CLP 後の腎機能(血清クレアチニン値)
CLP 後の腎機能低下を TLR9KO は軽減した。

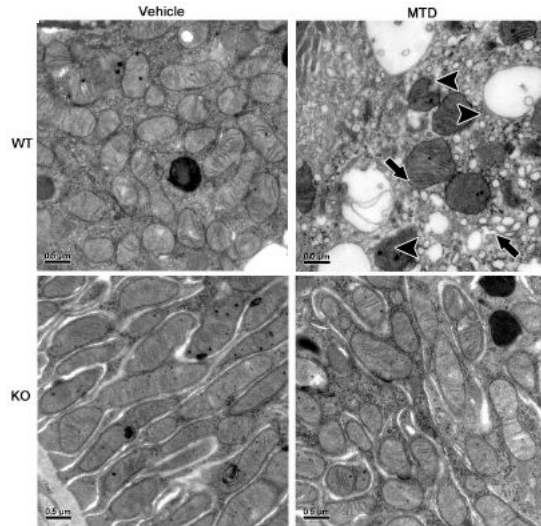


5)CLP 後の腎ミトコンドリア障害
mitoSOX 取り込みおよび電子顕微鏡での腎尿細管ミトコンドリア障害を評価した。Sham と比較して CLP2h 後よりミトコンドリア障害がみられ、TLR9KO で軽減した。

6)MTB 投与後の脾臓アポトーシスと IL-12
MTB 投与 2 時間後に脾臓アポトーシスおよび血漿 IL-12 は増加し、TLR9KO で軽減した。



7)MTB 投与後の腎ミトコンドリア障害
MTB 投与 2 時間後の電子顕微鏡での形態観察では、近位尿細管細胞のミトコンドリア形態異常が見られ、TLR9KO で軽減した。



以上より、腹膜炎による敗血症ではミトコンドリア DNA が全身循環に大量に早期から放出され、TLR9 を介して自然免疫を活性化し腎尿細管ミトコンドリア障害を惹起することに関わることが示された。

さらに、TLR9 は感染巣への白血球遊走を阻害することで細菌除去を妨げることが示唆された。

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 1 件)

安田日出夫 辻孝之 辻尚子 山本龍夫 :
敗血症性 AKI の病態生理と臨床における課題
日本腎臓学会誌 57(2): 284-290、2015 年

〔学会発表〕(計 1 件)

辻尚子、安田日出夫、辻孝之、大橋温、加藤明彦、藤垣嘉秀 ミトコンドリア DNA は TLR9 を介して敗血症性急性腎障害に関与する 第 57 回日本腎臓学会学術総会 2014 年 7 月 6 日 横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田日出夫 (Yasuda Hideo)
浜松医科大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：60432209

(2) 研究分担者

辻孝之 (Tsuji Takayuki)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号：30464126

加藤明彦 (Kato Akihiko)
浜松医科大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：60324357