52. 敗血症の死因学

丸山　健太

自然科学研究機構 生理学研究所

Key words：敗血症，痛覚神経，脳代謝，トレランス

緒　言

敗血症は、炎症を誘発するグラム陰性菌成分の LPS 等が原因で 3 割が絶命する重篤な疾患である。地球全体では 3 秒に 1 人が敗血症で死んでいるとされ、その直接死因は過剰な炎症にあるものと考えられているが、炎症性サイトカインを標的とした抗体医薬やステロイドの救命効果が限定的であることから、これまでにない病態仮説の提唱が求められている［1］。我々は、無痛覚神経マウス（Nav1.8Cre Rosa26DTA）が、末梢組織の炎症状態が野生型マウスと同程度であるにもかかわらず、LPS の投与に対してきわめて脆弱であることを見出した。当該マウスは LPS 投与後、痙攣を伴いながら死亡するため、中枢異常が直接死因となっている可能性を考えて脳の FDG-PET とメタボローム解析を実施したところ、脳全域にわたる FDG の集積障害と解糖系・TCA サイクルの減弱、ならびにキヌレニン経路代謝産物の増加が観察された。これらの結果は、LPS を投与されたマウスの痛覚神経がなんらかのメカニズムで脳の細胞呼吸低下とキヌレニン経路の過剰な活性化を抑制していることを示唆する。そこで本研究では、こうした LPS に対する痛覚神経性トレランスの分子機序の解明を通じて、これまでにない病態仮説に立脚した新しい敗血症治療戦略の提案を目指した。

方　法

1.　無痛覚神経マウス由来組織のオミックス解析

LPS を投与された無痛覚神経マウス脳組織のトランスクリプトーム＆メタボローム、ならびに後根神経節のトランスクリプトームデータを分析することで、痛覚神経が脳代謝に与える影響を検討した。

2.　痛覚神経由来脳代謝保護因子の探索

LPS で刺激された痛覚神経より放出される液性因子の中で、全身炎症状態にある個体の脳代謝を正常化させるものを、遺伝子改変マウスを駆使することで探索した。

結　果

LPS を投与された無痛覚神経マウスの脳では FDG の取り込みが顕著に低下する（図 1）。FDG はリン酸化された活性化型の HK1 によってリン酸化を受け、細胞内に集積することが知られている。LPS を投与した無痛覚神経マウスの脳神経をとりだして生化学的に解析したところ、HK1 のリン酸化が顕著に障害されていたことから、HK1 の活性化障害が脳における FDG の集積低下ならびに細胞呼吸障害の原因であると考えられた。その証拠に、グルコースの投与は無痛覚神経マウスの LPS 脆弱性を改善しなかった一方、ケトン体の投与あるいはプリンサルベージ経路を活性化することで脳の ATP 量を増加させるイノシン＋フェブキソスタットの投与は、無痛覚神経マウスの LPS 脆弱性を改善した。LPS を投与された無痛覚神経マウスの脳ミクログリアでは、キヌレニン経路の律速酵素である IDO1 の発現が上昇すると同時に、キヌレニン経路の最終代謝産物である QUIN の産生が増加していた。また、QUIN は脳神経の HK1 のリン酸化を障害することで細胞呼吸を抑制し、抗 QUIN 抗体または IDO1 阻害剤の髄注は、無痛覚神経マウスの LPS

脆弱性を改善した。近年、IL-22を欠損するマウスの腸では抗菌ペプチドの産生が減弱する一方、IDO1の発現が上昇していることが報告された［2, 3］。また、痛覚神経の損傷に伴い、後根神経節において腸で発現する抗菌ペプチドの発現が上昇することも報告されている［4］。LPS を投与した無痛覚神経マウスの後根神経節における炎症性サイトカイン・抗炎症性サイトカインの発現量は野生型マウスと変わらなかったことから、腸で発現する抗菌ペプチドの発現を網羅的に定量したところ、C-type lectinの一種である抗菌ペプチドのReg3γが、無痛覚神経マウスの後根神経節で消失していることを見出した。無痛覚神経マウスでは、LPS投与後の血中Reg3γの濃度上昇がみられず、Reg3γを全身で欠損するマウスにLPSとReg3γを同時に投与すると脳でReg3γが検出された。興味深いことに、Reg3γの受容体であるExtl3の発現はマクロファージよりもミクログリアで4倍ほど高く、これを反映してReg3γは脳ミクログリアのIDO1の発現を強力に抑制する一方、マクロファージのIDO1の発現には殆ど影響しなかった。また、Reg3γを痛覚神経特異的に欠損するマウス（*Nav1.8Cre Reg3γflox/flox*）を作製したところ、当該マウスはLPS投与に対して脆弱であると同時に、LPS 投与後の血中 Reg3γの濃度上昇が消失していた。最後に、Reg3γをマウスに髄注したところ、無痛覚神経マウスと野生型マウスのLPS投与後の生存率を顕著に改善することができた。以上より、LPSで刺激された痛覚神経はReg3γを産生し、これがホルモンとして脳のミクログリアに作用することでIDO1の発現が抑制され、痛覚神経トレランスが成立しているものと考えられた。それでは、Reg3γどのようなメカニズムで、脳ミクログリアの IDO1 の発現を抑制しているのだろうか？Reg3γの受容体である Extl3 と結合する可能性のある遺伝子をSTRINGデータベースで検索したところ、Ext1、Ext2、Extl1、Atxn1、XIAPの5つがヒットした。この中で実際にExtl3と結合するものを免疫沈降によって検証したところ、XIAPがExtl3の結合パートナーであることが判明した。Extl3あるいはXIAPをミクログリアの細胞株でノックダウンすると、Reg3γによるIDO1の発現抑制効果が消失したことから、Reg3γによるIDO1発現抑制のためにはExtl3-XIAP axisが必須であると考えられた。これまでの報告により、XIAPはBcl10と結合し、炎症シグナルを伝達することが報告されている［5］。そこでLPSを投与したBcl10欠損マウス由来の脳におけるIDO1の発現とQUIN濃度を定量したところ、LPSを投与した野生型マウス由来の脳と比べてこれらの量が顕著に増加していた。IDO1の発現はBin1によって抑制され、Bin1の発現は転写因子E2F1によって誘導されることが知られている［6, 7］。また、E2F1はRac1によって活性化され、炎症シグナル存在下においてBcl10はRac1を活性化しうることが報告されている［8］。詳細な生化学的解析の結果、Reg3γで刺激されたミクログリアではBcl10依存性にRac1が活性化され、これに続いてE2F1がBin1のプロモーターに結合することでBin1の発現が誘導された。また、Reg3γで誘導されるBin1の発現上昇は、Rac1阻害剤の処理によって消失し、Bin1をノックダウンしたミクログリアの細胞株では、Reg3γによるIDO1の発現抑制が観察されなかった。以上より、Reg3γはExtl3-XIAP-Bcl10-Rac1 axisによるE2F1の活性化によって、IDO1の発現を抑制するBin1を誘導していることが明らかとなった（図2）［9］。

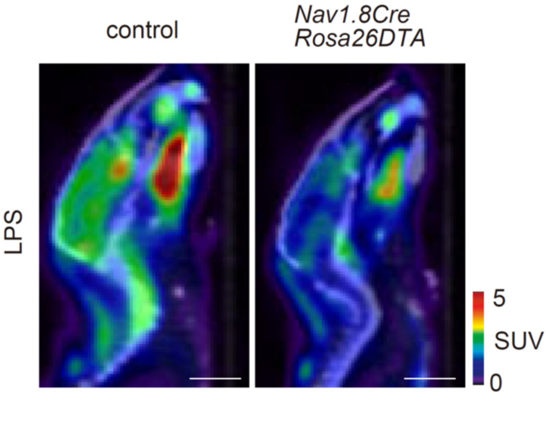

図1．LPSを投与された無痛覚神経マウス（Nav1.8Cre Rosa26DTA）のFDG-PET

LPSを投与された無痛覚神経マウスの脳では、FDGの集積が殆どみられない。Scale bar：5 mm。

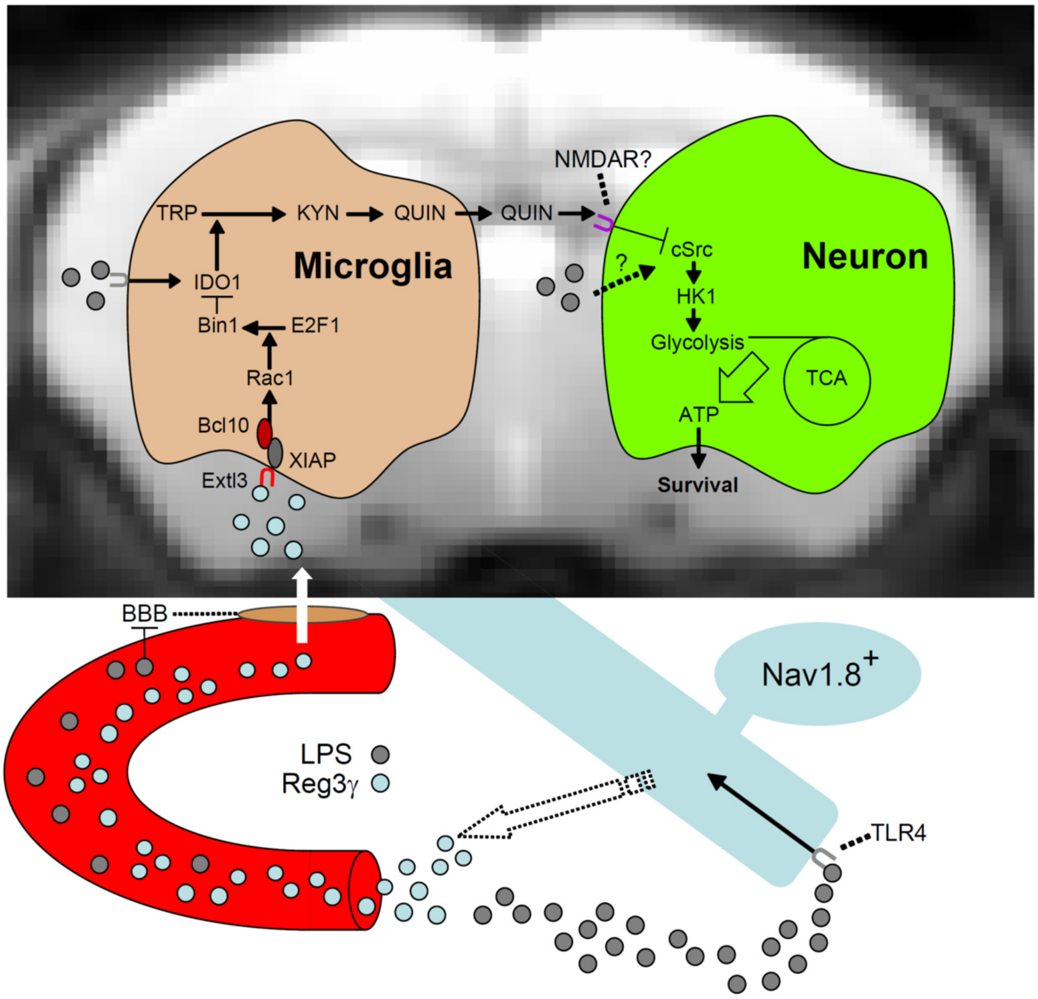

図 2. 痛覚神経性トレランスの分子機構

LPS で刺激された痛覚神経由来の Reg3γは、脳ミクログリアの IDO1 発現を抑制している。

考　察

本研究により、脳ミクログリアにおける IDO1 の発現上昇に伴った QUIN の過剰産生が、敗血症の“真の”死因である可能性が浮上した。LPS で刺激された痛覚神経は、Reg3γを産生することで脳ミクログリアの IDO1 の発現を抑制し、敗血症の死亡率を低減させている可能性がある。今後、敗血症を“脳の代謝異常病”として再定義し、感覚免疫学の視点から研究をすすめることで、敗血症の革新的な救命法を開発できる可能性がある。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、北海道大学医学部の近藤豪博士、大阪大学医学部の加藤弘樹博士、産業技術総合研究所の熊谷雄太郎博士、東北大学薬学部の佐々木拓哉博士である。上原記念生命科学財団には衷心より感謝申し上げます。

文 献

1) Berger, R.E., Rivers, E., and Levy, M.M. (2017). Management of Septic Shock. N Engl J Med 376, 2282-2285. PMID:28591533 DOI: 10.1056/NEJMclde1705277.

2) Shindo, R., Ohmuraya, M., Komazawa-Sakon, S., Miyake, S., Deguchi, Y., Yamazaki, S., Nishina, T., Yoshimoto, T., Kakuta, S., Koike, M., et al. (2019). Necroptosis of Intestinal Epithelial Cells Induces Type 3 Innate Lymphoid Cell-Dependent Lethal Ileitis. iScience 15, 536-551. PMID: 31132747 PMCID: PMC6538961 DOI: 10.1016/j.isci.2019.05.011

3) Behnsen, J., Jellbauer, S., Wong, C.P., Edwards, R.A., George, M.D., Ouyang, W., and Raffatellu, M. (2014). The cytokine IL-22 promotes pathogen colonization by suppressing related commensal bacteria. Immunity 40, 262-273. PMID: 24508234 PMCID: PMC3964146 DOI: 10.1016/j.immuni.2014.01.003

4) Ben-Yaakov, K., Dagan, S.Y., Segal-Ruder, Y., Shalem, O., Vuppalanchi, D., Willis, D.E., Yudin, D., Rishal, I., Rother, F., Bader, M., et al. (2012). Axonal transcription factors signal retrogradely in lesioned peripheral nerve. Embo J 31, 1350-1363. PMID: 22246183 PMCID: PMC3321171 DOI: 10.1038/emboj.2011.494

5) Hsieh, W.C., Chuang, Y.T., Chiang, I.H., Hsu, S.C., Miaw, S.C., and Lai, M.Z. (2014). Inability to resolve specific infection generates innate immunodeficiency syndrome in Xiap-/- mice. Blood 124, 2847-2857. PMID: 25190756 DOI: 10.1182/blood-2014-03-564609

6) Muller, A.J., DuHadaway, J.B., Donover, P.S., Sutanto-Ward, E., and Prendergast, G.C. (2005). Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. Nat Med 11, 312-319. PMID: 15711557 DOI: 10.1038/nm1196

7) Cassimere, E.K., Pyndiah, S., and Sakamuro, D. (2009). The c-MYC-interacting proapoptotic tumor suppressor BIN1 is a transcriptional target for E2F1 in response to DNA damage. Cell Death Differ16, 1641-1653. PMID: 19629135 DOI: 10.1038/cdd.2009.98

8) Zaldua, N., Llavero, F., Artaso, A., Gálvez, P., Lacerda, H.M., Parada, L.A., and Zugaza, J.L. (2016). Rac1/p21-activated kinase pathway controls retinoblastoma protein phosphorylation and E2F transcription factor activation in B lymphocytes. Febs J 283, 647-661. PMID: 26663827 DOI: 10.1111/febs.13617

9) Sugisawa, E., Kondo, T., Kumagai, Y., Kato, H., Takayama, Y., Isohashi, K., Shimosegawa, E., Takemura, N., Hayashi, Y., Sasaki, T., Martino, M.M., Tominaga, M., and Maruyama, K. (2022). Nociceptor-derived Reg3□ prevents endotoxic death by targeting kynurenine pathway in microglia. Cell Rep, accepted