

細菌感染症の死因学

愛知医科大学医学部・薬理学講座

丸山 健太

【目的】

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。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。

【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。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。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 Reg3 γ 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 Reg3 γ の濃度上昇がみられず、Reg3 γ を全身で欠損するマウスに LPS と Reg3 γ を同時に投与すると脳で Reg3 γ が検出された。興味深いことに、Reg3 γ 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 Reg3 γ 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、Reg3 γ を痛覚神経特異的に欠損するマウス (*Nav1.8Cre Reg3 γ flox/flox*) を作成したところ、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 Reg3 γ の濃度上昇が消失していた。最後に、Reg3 γ 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 Reg3 γ 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、Reg3 γ は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？Reg3 γ 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、Reg3 γ による IDO1 の発現抑制効果が消失したことから、Reg3 γ 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。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。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。詳細な生化学的解析の結果、Reg3 γ 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、Reg3 γ 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、Reg3 γ による IDO1 の発現抑制が観察されなかった。以上より、Reg3 γ 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)。

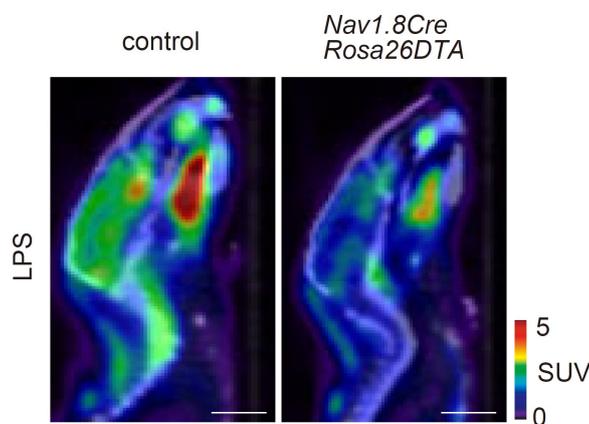


図1. LPSを投与された無痛覚神経マウス(*Nav1.8Cre Rosa26DTA*)のFDG-PET
LPSを投与された無痛覚神経マウスの脳では、FDGの集積が殆どみられない。Scale bar : 5mm.

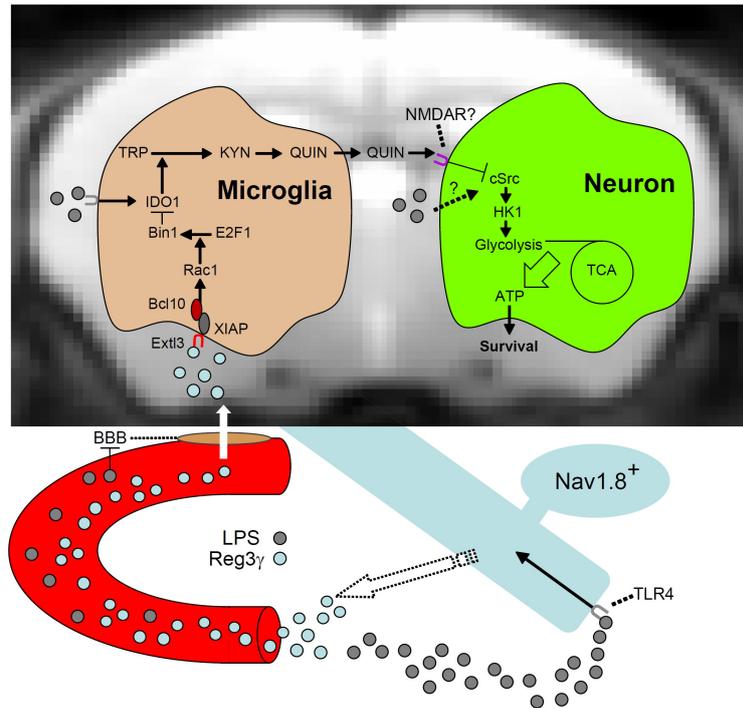


図2. 痛覚神経性トレランスの分子機構

LPSで刺激された痛覚神経由来のReg3 γ は、脳ミクログリアのIDO1発現を抑制している

【考察】

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。また、敗血症の際の痛覚神経性トレランスは、LPS で刺激された痛覚神経由来の Reg3 γ が脳ミクログリアの IDO1 の発現を抑制することで生じていると考えられる。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、敗血症死をふせぐための新しい方法を開発できる可能性がある。

【出版論文】

1. Kondo T, Okada Y, Saika S, Yamaguchi N, Hatakeyama S, **Maruyama K***.
Neuroimmune modulation by tryptophan derivatives in neurological and inflammatory disorders.
Eur J Cell Biol accepted.
2. Miyamoto S, Kondo T, **Maruyama K***.
Senso-immunology: the past, present, and future.
J Biochem 174: 305-315. 2023
3. **Maruyama K***.
Senso-immunology: The Emerging Connection between Pain and Immunity.
Keio J Med 72: 77-87. 2023
4. Sugisawa E, Kondo T, Kumagai Y, Kato H, Takayama Y, Isohashi K, Shimosegawa E, Takemura N, Hayashi Y, Sasaki T, Martino MM, Tominaga M, **Maruyama K***.
Nociceptor-derived Reg3 γ prevents endotoxic death by targeting kynurenine pathway in microglia.
Cell Rep 38: 110462. 2022