

# Role of mitochondrial DNA in septic AKI via Toll-like receptor 9

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2016-05-21 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 辻, 尚子 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/3014">http://hdl.handle.net/10271/3014</a>

博士(医学) 辻 尚子

論文題目

Role of mitochondrial DNA in septic AKI via Toll-like receptor 9

(敗血症性急性腎障害における Toll 様受容体 9 を介するミトコンドリア DNA の役割)

論文の内容の要旨

[はじめに]

集中治療室における急性腎障害 (AKI) の 40-70%は敗血症および敗血症性ショックが原因でその死亡率は 60-70%と高率である。マウス腹膜炎による敗血症モデルである虫垂結紮穿孔(CLP)モデルでは AKI を引き起こすが、グラム陰性桿菌由来のリポ多糖 (LPS) をリガンドとする Toll 様受容体 (TLR) 4 のノックアウト (KO) マウスでは AKI が軽減せず、TLR9KO マウスで AKI が軽減する。TLR9 のリガンドは細菌由来 DNA が知られているが、腹膜炎で LPS よりも優位に作用するとは考えにくく、TLR9 を活性化するメカニズムは不明であった。近年、ミトコンドリア DNA が TLR9 のリガンドとして報告されるようになり、内因性ミトコンドリア DNA が敗血症性 AKI 進展に関与していると仮説を立て、立証することを本研究の目的とした。

[材料ならびに方法]

本研究は、浜松医科大学の組換え DNA 実験安全委員会および動物実験委員会の承認を得て行われている。雄性 C57BL/6 wild type (WT) と TLR9KO マウスに対し CLP モデルを作製し、2、6、24 時間で屠殺した。血漿、腎組織、腹水を回収し、以下を評価項目とした。1) 血漿、腹水中のミトコンドリア(Mt)DNA(NADH dehydrogenase 1: ND1、cytochrome B: CytB、cytochrome C oxidase subunit III :COX3) 、2) 全身の炎症、免疫応答の評価として、脾臓のアポトーシス(TUNEL および Caspase-3 染色)、血液培養、腹水培養、腹腔内白血球数、血漿サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-12) 、3) 腎臓評価として、腎機能 (BUN, plasma creatinine: pCr) 、腎内のミトコンドリア酸化ストレス (mitoSOX による蛍光免疫染色) 、腎尿細管細胞の電子顕微鏡検査、腎内 ATP 量。

さらに、MtDNA を大量に含んだミトコンドリアデブリスをマウス肝臓から作製し、WT と TLR9KO マウスに経静脈に投与をし、脾臓のアポトーシスおよび上記と同様の腎臓評価を行った。MtDNA の効果を確認するために DNase で処理したミトコンドリアデブリスを投与し同様の評価を行った。

[結果]

血漿中 MtDNA は WT の CLP 2h 後に sham と比較し有意に上昇(sham vs CLP; ND1:  $3.98 \times 10^4 \pm 1.17 \times 10^4$  vs  $4.48 \times 10^5 \pm 1.82 \times 10^5$  copies/ $\mu$ L, CytB:  $5.30 \times 10^4 \pm 1.69 \times 10^4$  vs  $7.83 \times 10^5 \pm 3.60 \times 10^5$  copies/ $\mu$ L, COX3:  $3.07 \times 10^4 \pm 1.05 \times 10^4$  vs  $4.39 \times 10^5 \pm 1.75 \times 10^5$  copies/ $\mu$ L,  $p < 0.05$ )し、少なくとも 6h まで持続した。TLR9KO マウスでも血漿中 MtDNA は同様に増加していた。腹水中の MtDNA は CLP 2h 後に両マウ

スとも増加していたが、WT と比較し、TLR9KO マウスで有意に増加していた(WT vs TLR9KO; ND1:  $3.55 \times 10^4 \pm 1.16 \times 10^4$  vs  $2.56 \times 10^5 \pm 7.66 \times 10^4$  copies/ $\mu$ L, CytB:  $5.62 \times 10^4 \pm 1.94 \times 10^4$  vs  $2.73 \times 10^5 \pm 8.85 \times 10^4$  copies/ $\mu$ L, COX3:  $5.10 \times 10^4 \pm 1.81 \times 10^4$  vs  $3.39 \times 10^5 \pm 1.44 \times 10^5$  copies/ $\mu$ L,  $p < 0.05$ )。TLR9KO マウスにおける腹水中の白血球数はWTと比較し有意に増加しており、高い遊走能を認めた。腹水培養では有意差はなかったが、血液培養ではTLR9KO マウスで有意に細菌数の低下を認めた。また、TLR9KO マウスのCLPでは脾臓内アポトーシスが抑制され、IFN- $\gamma$ とIL-12の産生もWTと比較し抑制されていた。また、TLR9KO マウスでCLP 24h後の腎障害が有意に抑制された(WT vs TLR9KO; BUN:  $104.8 \pm 7.13$  vs  $56.2 \pm 10.2$  mg/dl, pCr:  $0.38 \pm 0.05$  vs  $0.17 \pm 0.02$  mg/dl,  $p < 0.05$ )。WTではCLP 2h後、腎近位尿細管のミトコンドリア酸化ストレスと形態異常を認め、腎内ATP産生量も低下していたが、TLR9KO マウスではこれらの変化が軽減していた。ミトコンドリアデブリス投与モデルではWTでIL-12は2h後から、TNF- $\alpha$ は4h後に有意に上昇し、脾臓のアポトーシスを認め、TLR9KO マウスではこれらは軽減した。腎臓においては、WTでpCrが2h後から上昇し(Vehicle vs TLR9KO; pCr:  $0.09 \pm 0.004$  vs  $0.12 \pm 0.009$  mg/dl,  $p < 0.05$ )、腎近位尿細管のミトコンドリア酸化ストレス及び形態異常、ATP産生低下も認めたが、TLR9KO マウスおよびDNase処理したデブリスではこれらのミトコンドリア障害は軽減した。

#### [考察]

我々は内因性MtDNAがCLPによる敗血症性AKIの早期から、全身および腹腔内に放出されていたことを初めて明らかにした。TLR9KOは腹腔内へ白血球を遊走させ、菌血症を軽減させた。腹腔内に死滅白血球が多数存在するTLR9KOマウスで有意に腹腔内MtDNAが増加することから、MtDNAの由来は、障害臓器以外にも、白血球由来の可能性が示唆された。またTLR9KOのCLPでは炎症性サイトカイン産生、脾臓のアポトーシス、腎尿細管ミトコンドリア障害、腎内のATP合成低下を軽減させた。しかし、TLR9経路が直接的に尿細管障害を引き起こすかはわかっていない。通常、TLR9は腎臓においては尿細管上皮ではなく、間質の樹状細胞などに細胞内受容体として存在している。腎ミトコンドリア障害を惹起しているものは、腹腔内や網内系でTLR9経路により誘導された炎症性サイトカインか、TLR9を発現している腎内の樹状細胞による免疫応答の2つの可能性がある。近年TLR9はCLP24h後に尿細管上皮内にわずかに発現している報告もあるが、これが早期のミトコンドリア尿細管障害に関与しているかは明らかではない。我々はまた、MtDNAを含むミトコンドリアデブリスの投与はCLPと同様の免疫不全や腎ミトコンドリア障害を引き起こし、TLR9KOやDNase処理でこれらは軽減することを明らかにした。以上から、敗血症性AKIではミトコンドリアDNAがTLR9を介して、免疫不全や腎障害に重要な役割を担うことがわかった。

#### [結論]

MtDNAは敗血症の早期で全身循環に放出され、TLR9を介してサイトカイン産生や脾臓のアポトーシス、尿細管のミトコンドリア障害に関与している。MtDNAは治療の

標的となり、敗血症の重症度を定めるバイオマーカーとして有用な可能性がある。