

令和元年5月29日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09965

研究課題名(和文)放射線曝露個体における敗血症発症機序の解明とその治療法の解析

研究課題名(英文) Analysis of intestinal mucosal damages and septic complications cause by gamma-irradiation

研究代表者

仲村 究 (Kiwamu, Nakamura)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：30736690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：申請者のこれまでの検討から、急性期炎症状態にある個体で誘導される血清蛋白の一つであるオロソムコイドは、過剰な炎症進行を抑制する作用のある抗炎症性蛋白としても機能し、M2マクロファージの誘導に関与する。本研究では放射線障害が腸管にもたらすダメージについて検討しており、放射線照射量に比例して、特にマウス空腸での腸管絨毛構造の配列の明らかな乱れをH-E染色による切片あるいは電子顕微鏡的に観察することが出来た。上記の抗炎症性物質であるオロソムコイド投与群では放射線照射による腸管細胞のダメージが軽減される傾向を認めており、それらの物質が腸管保護的に作用する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線障害により起こる腸管からのbacterial translocationが発生する機序の一つとして、骨髄抑制によって腸管粘膜の自然免疫リンパ球がダメージを受けることが想定される。本研究結果により、骨髄抑制以外にも腸管の絨毛構造や微絨毛の脱落によっても発生することが示唆された。このように絨毛構造が剥離した部分は正常な構造的バリアを有さないことから細菌感染が促進すると考えられ、敗血症の進展に至ると考えられる。本研究から、抗炎症性作用を持つオロソムコイドはIL-10の産生を介して放射線性粘膜障害を軽減し、治療等の合併症によって腸管粘膜ダメージを受けた場合にそれを軽減する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this research, irradiation damages to mice gut mucous membrane were analyzed with H-E staining and scanning electron microscopy. In both analysis, peelings of gut epithelium were observed and the frequency of damaged areas increased with the amount of gamma-irradiation. Orosomuroid is an acute-phase protein and reported to induce anti-inflammatory immune cells, such as type II monocytes through the production of interleukin(IL)-10. We administered recombinant orosomuroid to irradiated mice and compared gut mucosal damages with non-irradiated controls. Mucosal damages decreased in orosomuroid administered mice. These results suggested anti-inflammatory proteins may improve intestinal irradiation damages by inducing anti-inflammatory immune cells and IL-10 production.

研究分野：敗血症

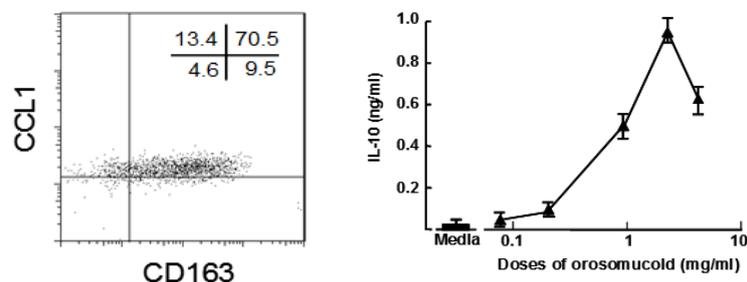
キーワード：放射線障害 日和見感染症

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

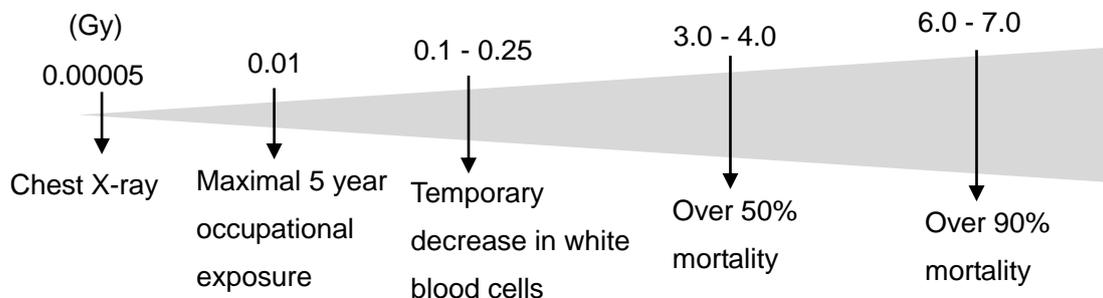
申請者はこれまで敗血症状態にある個体の好中球や単球を用いた感染免疫応答について検討を行ってきた。熱傷や放射線障害を受けたマウスを用いて経口感染や経静脈感染に続発して引き起こされる敗血症のモデルを作製し、II型好中球やM2マクロファージなど免疫抑制性細胞群の誘導に関する解析を行った (*PLoS One*. 9:e83747, 2014., *J. Immunol.* 189:296, 2012., *J Leukoc Biol.* 92:859, 2012)。自然免疫応答では、細菌の排除に機能するTh1サイトカインやそれにより誘導されるM1マクロファージ等の細胞群があるが、同時に抗炎症性に機能するTh2サイトカインやII型の免疫細胞群が存在する。急性期の炎症性蛋白の一つであるオロソムコイド(Orosomucoid)はII型単球、M2マクロファージの誘導に関わっており、高炎症状態で産生される蛋白に曝露された自然免疫細胞が、過剰な炎症の抑制に向けてその機能を調整していることがこれらの研究から示唆されている。申請者による検討では、敗血症や全身性放射線障害下での急性期炎症状態にある個体の血中で検出されるオロソムコイドを末梢血中の単球に *in vitro* で作用させた場合、感染防御に対し抑制的に作用するIL-10やCCL1を産生させ、抗炎症性であるM2マクロファージのマーカーであるCD163の発現を誘導することが分かった (Nakamura K, *et al. Cytokine.* 73:8, 2015)。また、放射線障害マウスでは、感染免疫応答に対して抑制的に作用するIL-10産生性の抗炎症性好中球が誘導される事についても、これまで確認している。

(図：オロソムコイドによる抗炎症性単球の誘導効果)



下図は放射線障害による全身性ダメージの進行を示したものである。6Gyを超えるような高容量の全身放射線被曝を受けた場合、著しい造血管障害による易感染から多くの個体が死に至る事が知られている。

(図：全身性放射線照射でのダメージの進行)



一方で、医療行為等に伴う被曝の多くはそれ以下の低～中等度の全身または部分的な放射線障害である事が多く、癌患者などで行われる放射線治療の多くも局所への照射によって行われる。しかし、そのような低～中容量(5Gy以下)の全身または局所への放射線障害を受けた個体での易感染性の機序についての検討は、これまで十分に行われていない。放射線照射によるダメージをより受けやすい臓器の一つに消化管がある。この理由として、消化管には多くのリンパ球が浸潤し、放射線被曝によるダメージを受け易いと考えられている。消化管の常在細菌叢を構成する微生物は、通常の免疫状態の保たれている宿主においては感染症状を示さない。しかし被曝個体では、腸管粘膜防御の破綻から、しばしばそれらの常在菌群による bacterial translocation、およびそれに起因する敗血症を来す。この例として、実験動物を用いた放射線障害モデルでは、1.1Gyの放射線照射をラットの腹部に行った場合、肉眼的には明らかな消化管粘膜への障害所見を認めないものの、病理組織の評価では bacterial translocation が頻繁に起こっている事が報告されている (*J. Surg. Res.*, 1989)。

2. 研究の目的

本研究は、中等度線量以下の放射線被曝を受けた個体における病原性細菌への易感染性の評価と、放射線障害の改善による敗血症への進展抑制を目的とする。放射線被曝を受けた個体における敗血症の進展機序の解析と、敗血症に伴い上昇する炎症性蛋白の作用阻害による敗血症治療効果について明らかにする。このため、低～中等度の放射線照射(γ -irradiation)を行ったマウスを用いて腸管からの bacterial translocation による敗血症モデルを作製する。これを用い

て、放射線障害と腸管粘膜破壊の相関関係について解析し、どのような機序で敗血症に至るかを検討する。さらに、抗炎症性作用を有するオロソムコイドを投与し消化管粘膜障害の改善をもたらされるかについて検討を行う。

3. 研究の方法

本研究では、中等度線量以下の放射線被曝を受けたマウスにおける免疫抑制性機序の解析と、腸管感染によって引き起こされた敗血症治療効果の改善を目的としている。

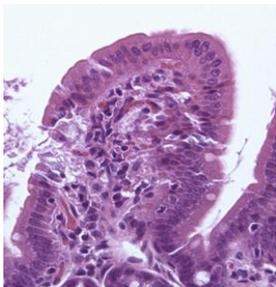
全身または腹部へ1~10Gyまでの放射線を照射した雌雄の8~10週のC57/BL6またはBALB/cマウス(以下、被曝マウス)を用いる。初めに、それぞれのマウスで被曝後Day1, 3, 5, 7での血中の炎症性蛋白濃度を測定し、被曝とそれらの血中での増加との関係性について解析する。各放射線照射量あたり1群8匹以上のマウスを使用し、コントロールとしては未照射のマウスを用いる。また、血中の好中球、単球とリンパ球、腹腔マクロファージ、リンパ節内の細胞を分離し、それぞれについてサイトカイン産生やCD抗原の発現等について評価を行う。それらの結果によって誘導されるマクロファージのタイプの判定や、抗炎症性好中球、抗炎症性単球(Ⅱ型単球)の出現、また制御性T細胞の増加等について検討し、それらと血中炎症性蛋白との関係性について評価を行う。この検討から放射線障害と血中炎症性蛋白、免疫抑制性細胞群の出現との関係について明らかとする。また、放射線障害による実際の粘膜ダメージを画像的に検討し、抗炎症作用のある急性期蛋白(オロソムコイド等)を投与することによって粘膜障害の軽減がもたらされるかについて検討を行う。

4. 研究成果

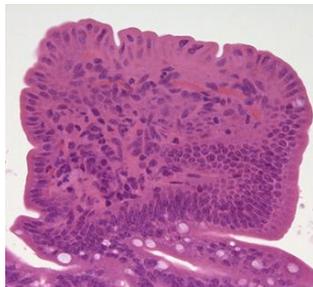
本研究では、放射線障害により誘導された anti-inflammatory cells や急性期炎症性蛋白が腸管粘膜にどのような影響を与えるかについて検討を開始した。これまでの報告では放射線障害後にサイトカイン機能を阻害する等によって予後を比較した報告が見られるが、それが実際に腸管粘膜構造の改善に寄与しているかについては十分に検討されていないことから、本研究では実際の腸管粘膜ダメージを評価しながら自然免疫応答について解析を行うことが重要と考えている。

下の画像はNormalマウス、5Gy照射マウス、10Gy照射マウスの空腸粘膜をH-E染色により光学顕微鏡にて観察したものである。放射線被曝量を増加すると腸絨毛構造の委縮が認められ、絨毛先端は平坦化し全体長が短縮している像が認められた。

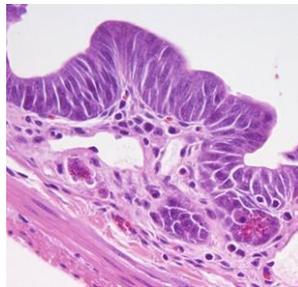
(a) Normal マウス



(b) 5Gy 照射マウス

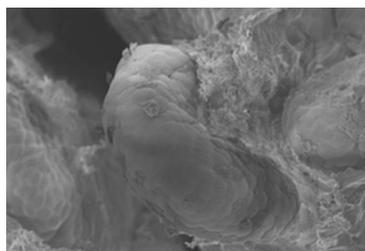


(c) 10Gy 照射マウス

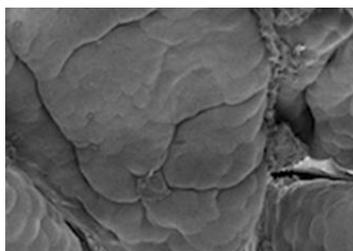


さらに、下の画像はNormalマウス、5Gy照射マウス、10Gy照射マウスの空腸粘膜を電子顕微鏡にて観察したものである。画像(d)~(f)は500倍での観察であるが、放射線被曝量を増加すると腸絨毛構造の粗造化が起こることが分った。

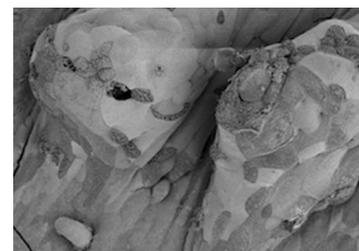
(d) Normal マウス



(e) 5Gy 照射マウス



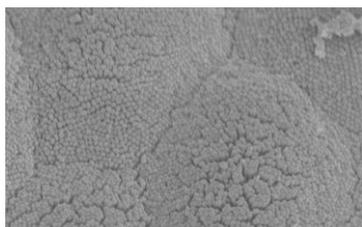
(f) 10Gy 照射マウス



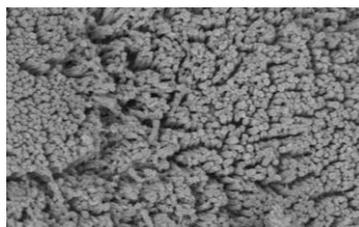
5Gy照射では絨毛構造に亀裂がはいることで破壊が起こり、10Gyへと放射線照射量を増加することで、絨毛表面粘膜の剥離が観察された。この事により、これまで腸管からの bacterial translocation は血球減少によって起こると考えられたが、実際の粘膜構造の破壊から translocation が起こり、それによって敗血症へ進展することが示唆された。

それらをさらに高倍率(10000倍)で観察すると、画像(g)~(i)に示す様に、微絨毛の脱落が起こっていることが明らかとなった。

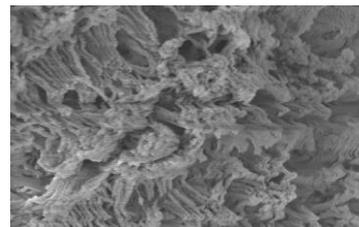
(g) Normal マウス



(h) 5Gy 照射マウス



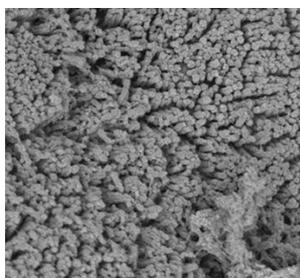
(i) 10Gy 照射マウス



研究背景で述べた様にオロソムコイドは IL-10 陽性の抗炎症性単球の産生を誘導する。5Gy 照射マウスにオロソムコイドの腹腔内投与を行ったところ、回腸粘膜障害が改善される可能性が示唆された。(j)は5Gy照射のみを行った群、(k)は5Gy照射後にオロソムコイド投与を行ったマウス腸管となる。オロソムコイド投与群では腸管の微絨毛の配列の乱れが軽減され、微絨毛の脱離が殆ど認められなくなっている。

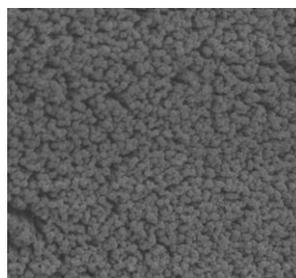
(j) 5Gy 照射マウス 回腸

コントロール(生食投与)群



(k) 5Gy 照射マウス 回腸

オロソムコイド投与群



今後、より多くのマウスを用いて検討を行い、オロソムコイドの腸管粘膜障害への修復機序について明らかにすることが必要である。オロソムコイド投与群、非投与群で放射線障害を行い、腸管リンパ節内の自然免疫リンパ球や腹腔内に滲出するマクロファージなどについて、両群間で特徴を比較している。また、オロソムコイドにより誘導される M2 マクロファージからの IL-10 産生が粘膜障害の改善に寄与しているかについて現在も継続して検討を行っている。

5. 主な発表論文等

Abe Y, Yamamoto N, Nakamura K, Arai K, Sakurai C, Hatsuzawa K, Ogura Y, Iseki K, Tase C, Kanemitsu K. IL-13 attenuates early local CXCL2-dependent neutrophil recruitment for *Candida albicans* clearance during a severe murine systemic infection. *Immunobiology*. 224:15-29, 2019.

Nakamura K, Saito K, Hara Y, Aoyagi T, Kitakawa K, Abe Y, Takemura H, Ikeda F, Kaku M, Kanemitsu K. Severe epidemic myalgia with an elevated level of serum interleukin-6 caused by human parechovirus type 3: a case report and brief review of the literature. *BMC Infect Dis*. 7;18:381, 2018.

Ikeda H, Nakamura K, Ikenori M, Saito T, Nagamine K, Inoue M, Sakagami T, Suzuki H, Usui M, Kanemitsu K, Matsumoto A, Shinbo T. Severe Disseminated *Mycobacterium avium* Infection in a Patient with a Positive Serum Autoantibody to Interferon- γ . *Intern Med*. 55:3053-3058, 2016.

[雑誌論文] (計 3 件)

仲村 究, 金光敬二 プロカルシトニン, プレセプシンを含めた新しいバイオマーカー 臨床病理, 65:8, 935-942, 2017.

山本夏男, 仲村 究, 金光敬二 感染症に関わる新しい炎症の概念と感染制御 日本臨床微生物学会 209-222, 2016.

仲村 究, 金光敬二. 感染症のバイオマーカー、抗原、抗体検査 プロカルシトニン、プレセプシンの臨床的意義. 臨床と微生物. 43:121-127, 2016.

〔学会発表〕（計 6 件）

仲村 究 「抗菌薬、宿主、微生物の関係を基礎、臨床の両面から再考する」 第 65 回日本感染症学会東日本地方会学術集会、新潟、2016.

仲村 究 「敗血症診断におけるバイオマーカーの役割」 第 23 回日本臨床微生物学会教育セミナー、金沢、2016.

山本夏男, 仲村 究, 大橋一孝, 大花 昇, 金光敬二. 血流感染後 3 時間以内の臓器別バイオマーカー（マウス）の検討. 第 27 回日本臨床微生物学会総会・学術集会; 20160131; 仙台.

山本夏男, 仲村 究, 阿部良伸, 大橋一孝, 高野由喜子, 大花 昇, 金光敬二. 敗血症後早期の NLRP3 発現と抗インフラマソーム分子による炎症緩和が予後に寄与する機序の解析. 第 65 回日本感染症学会東日本地方会学術集会; 20161027; 新潟.

仲村 究 「感染症のバイオマーカー」 第 27 回日本臨床微生物学会総会・学術集会 2016.1.29; 仙台.

仲村 究 「ヒト末梢血単球に対する急性期炎症性蛋白の作用効果についての検討」 第 89 回日本感染症学会・学術講演会; 2015.4.16; 京都.

〔図書〕（計 1 件）

仲村 究 タイトル：微生物検査における技術革新：プロカルシトニン、プレセプシンについて. 2016. 株式会社 近代出版.