

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10979

研究課題名(和文) セプシス・外傷に対するリンパ球・好中球の生体反応からみた免疫学的病態解析法の確立

研究課題名(英文) Establishment of methods for immune response analysis of lymphocytes and neutrophils against sepsis and trauma

研究代表者

清水 健太郎 (Shimizu, Kentaro)

大阪大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60379203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：生体の免疫システムは、病原体だけでなく外傷などの自身の組織が抗原となって、生体に対する炎症反応が引き起こされる。侵襲早期の生体応答の評価と制御は重症病態の診断治療に重要である。本研究では、以下の結果を得た。免疫担当細胞の検体保存の方法を確立した。Danger Signalのひとつであるインフラマソームが活性化することを確認した。また、CD8+T細胞が減少しCD4+T細胞、B細胞が増加していることを確認した。吸引痰の免疫担当細胞は、好中球が中心で、リンパ球は少数であった。腸管内の免疫応答は、腸内細菌叢の有無によって異なっていた。

研究成果の概要(英文)：Immune system occurred inflammatory response against host in respond to not only pathogenic organisms but also self tissues following trauma. Evaluation and modulation of this inflammatory response is critical for treatments of critically illnesses. In this research, we investigated following results; 1. A preservation method of immune cells was developed. 2. Inflammasome, which is one of the danger signals, was activated following injury. CD8+Tcells were decreased and CD4+Tcells and Bcells were increased. 3. Immune cells from aspirated sputum mainly consisted of neutrophils. There were few lymphocytes. 4. Immune response in the intestine might be different with gut microbiota.

研究分野：救急医学・集中治療医学

キーワード：免疫 インフラマソーム T細胞 痰 保存 フローサイトメトリー 全身性炎症反応

1. 研究開始当初の背景

生体の免疫システムは、病原体だけでなく外傷などの我々自身の組織が抗原となって生体自身と反応して炎症が引き起こされる。この感染、外傷（手術侵襲、熱傷等）などの侵襲によって引き起こされる、一連の細胞やメディエーターによる炎症性変化は全身性炎症反応症候群（SIRS）と呼ばれ、進行すると多臓器不全などの合併症を引き起こし死亡原因となる。

疫学的にも、日本の死因の第3位は肺炎であり、感染症への対応は課題である。外科手術時の炎症反応を制御することは術後合併症予防には重要である。また、若年者の外傷は死因の第1位である。様々な要因による外傷や感染などの生体への侵襲が、炎症反応を引き起こし、マクロファージや好中球が主になり、大量のサイトカインや活性酸素を放出して、生体の免疫力を変化させてSIRSを引き起こすと考えられている。SIRSが悪化すると、腸炎や肺炎などさらなる感染合併症や多臓器不全などを引き起こす。この炎症反応を制御することはいずれの疾患や疾患群においても重要な課題であり、その治療法の開発は非常に重要である。

炎症反応が引き起こされると同時に抗炎症作用も惹起される。これは代償性抗炎症反応症候群（compensatory anti-inflammatory response syndrome : CARS）と呼ばれ、免疫抑制の状態となり易感染性になると考えられる。これは、Th1型免疫反応の抑制およびTh2型免疫反応の亢進や、制御性T細胞の活性化が関連していると考えられている。この相反する免疫反応は、生体の恒常性を保つために有効であるが、その変化が過剰である場合は生体に害をなしSIRS、CARSとよばれる状態となり致命的な病態となりうると考えられている。

このような概念が提起され、重症救急患者を管理する上で、炎症や抗炎症のバランスを

免疫学的観点から把握することは治療方針にかかわる重要なことであるが、その評価方法は定まっていない。本研究では、免疫担当細胞を評価することで侵襲に対する生体応答の評価を行った。

気道の免疫担当細胞の一つであるマクロファージに関しては、気道への感染やアレルギーに対する主な抗原提示細胞であることが知られている。呼吸器感染症では好中球、マクロファージが主体であるが、重症患者でのリンパ球の動態は明らかでない。本研究では、重症患者の吸引痰の免疫染色を試みた。

腸内細菌叢は重症病態では、特に総偏性嫌気性菌が減少し、感染合併症や死亡率と関連することが知られている。本研究では、抗生物質投与による腸内細菌叢崩壊モデルを用いた侵襲モデルの動物実験で侵襲応答の変化を観察した。

2. 研究の目的

感染、外傷（手術侵襲、熱傷等）などの侵襲によって引き起こされる全身性炎症反応症候群（SIRS: systemic inflammatory response syndrome）と呼ばれる一連の生体応答をテーマに研究を進めている。本研究では、以下の3点に目標を絞り研究を実施する。

侵襲の生体反応の引き金となるインフラマソームの研究：SIR患者において、インフラマソームを定量的に評価し、侵襲の重症度との関連性を明らかにする。生体応答を引き起こす免疫担当細胞の変化の研究：侵襲に伴う血液中の免疫担当細胞（Tregなど）の推移を明らかにし自然免疫・獲得免疫応答のバランスを明らかにする。局所炎症と全身の免疫応答に関する研究：臨床および侵襲モデルを用いて、気道の免疫担当細胞の変化や腸内細菌叢の変化を経的に評価し、局所炎症と全身免疫応答との関連性を明らかにする。以上、侵襲に対する生体反応の免疫学的な病態解析法を確立することによって効果的な

重症管理や治療戦略につなげていくのが目的である。

3. 研究の方法

重症救急患者の血液からインフラマソーム、免疫担当細胞(B 細胞、T 細胞、NK 細胞、樹状細胞、マクロファージ等) の変化を経時的に評価する。方法は、単球、好中球を抽出してフローサイトメトリー法を用いて観察した。

痰に関しては、人工呼吸関連肺炎と白血球の形態との関連を調査すると同時に、免疫担当細胞の解析方法を構築して評価した。

腸内細菌叢に関しては、腸内細菌叢の免疫担当細胞の変化については動物モデルを用いて、侵襲後の免疫応答を観察した。

4. 研究成果

検体保存法の確立

血球の寿命は数日であるためフローサイトメトリーの血球解析は通常当日に行われている。検体をまとめてフローサイトメトリー解析を行うためには、保存法の確立が必要であると考え、CryoStor CS10 を用いた検体保存を試みた。

1、EDTA 容器に血液を採取する。

2、Histopaque 1077 を EDTA 容器底にいれて 1200rpm、10 分間遠心する。

3、白血球を採取して CryoStor CS10 と混ぜて冷凍保存する。解凍は、37 度で解凍して表面マーカーおよび細胞内マーカーの染色を行った。

以上の手法により一か月の保存後の解析が可能となった。

侵襲に対する免疫担当細胞の動き

(1) 血液

1、細胞表面マーカー

のべ 89 人の患者を対象として、細胞表面マ

ーカー抗体(CD3、CD4、CD8、CD16、CD56、CD19) (Multitest 6-color TBNK(BD Biosciences)) で染色してフローサイトメトリーで計測した。

結果は、以下の如くであった。(患者群 vs. 健常群) CD3+CD8 + T 細胞 ($24.5 \pm 1.3\%$ vs. $34.2 \pm 3.7\%$, $p < 0.05$) (平均 \pm 標準偏差) CD3 + CD4 + T 細胞 ($41.3 \pm 1.8\%$ vs. $33.3 \pm 5.0\%$, $p < 0.05$)、CD16+CD56 細胞 (NK 細胞) ($22.2 \pm 2.0\%$ vs. $20.6 \pm 5.6\%$, $p = 0.68$)、CD19 細胞 (B 細胞) ($13.3 \pm 1.2\%$ vs. $10.6 \pm 3.5\%$, $p = 0.08$) 以上より、CD8 + T 細胞が減少し CD4 + T 細胞、B 細胞が増加している傾向があった。

2、細胞内マーカー

制御性 T 細胞

制御性 T 細胞を観察するために CD25 + Foxp3 + 細胞を測定した。制御性 T 細胞を表す CD25+FoxP3+細胞は、患者群で健常群より有意に高値であった (median 3.9% vs. 0.2% , $p < 0.05$)。

インフラマソーム

24 検体で測定が可能であった。インフラマソームの指標となる caspase-1 の産生を Green FAM-FLICA Caspase 1 Assay Kit (Immunochemistry Technologies) を用いて測定した。健常群と比較して有意に高値であった (median 80.9% vs. 43.5% , $p < 0.05$)。

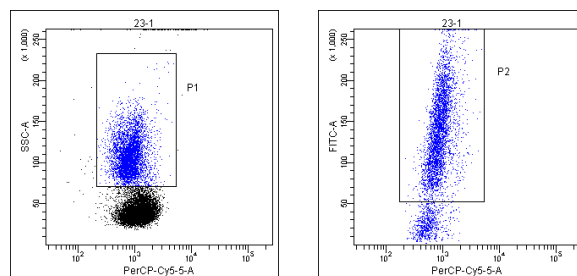


図 : (左)PerCP-Cy5.5 -CD45 (右)FLICA-FITC

以上の結果より、侵襲により Danger Signal のひとつであるインフラマソームが活性化

するとともに、CD8 + T 細胞が減少し、CD4 + T 細胞、B 細胞が増加していた。生体への感染および外傷によるシグナルが生体応答を惹起し、Th1 から Th2 の方向へ免疫細胞が変化したことが考えられる。また、制御性 T 細胞はこの免疫機構のバランスをとるために増加していることが予想された。

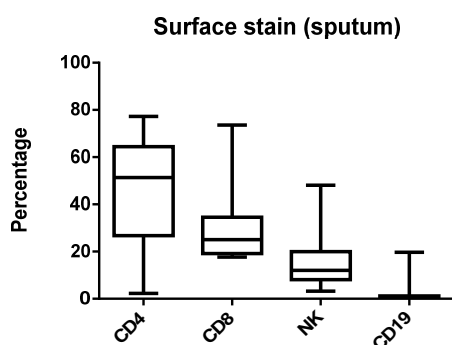
(2) 気道

吸引痰は粘調痰のため濾過を 2 回おこなって血球試料を得た。Multitest 6-color TBNK(BD Biosciences)および + T 細胞を Anti-human TCR gamma delta (BD Biosciences)を用いて染色した。

結果、吸引痰の白血球分画は、好中球 93.7 (92.0-95.3) %、リンパ球 4.4 (1.6-4.8) %、単球 1.4 (1.9-3.6) %と好中球の分画がいずれも大部分を占めた (n=9)。リンパ球比率の増加はなかった。

フローサイトメトリーを用いて、CD4 および CD8 の表面抗原を観察したところ、CD4 51.4(26.8 - 64.5) %、CD8 25.0(19.2 - 34.6) %、CD4/CD8 比 0.77(1.74-2.98)と CD4 が CD8 に対して増加している結果であった (n=16)。

細胞の染色は、殆ど染色されなかった。



以上の結果より、人工呼吸器装着の重症患者の吸引痰の検討では、免疫担当細胞は、好中球が中心であり、自然免疫が主に対応し続けていると考えられた。

(3) 腸管

C57BL6/J マウスを用いて、抗生物質を投与した腸内細菌叢減少モデルを使用した。抗生物質は、ampicillin、vancomycin、neomycin sulfate、metronidazoleの4種類を用いた。1~2週間投与後のマウスの虫垂は、過去の文献同様に非常に大きく腫脹していた。腸内細菌叢減少モデルにおいてCecal Ligation Punctureを行ったところ、全例翌日までに斃死した(n=4)、熱傷についても同様の結果であった(n=3)。

以上より、腸内細菌叢の異常は侵襲に対して脆弱になる可能性があることが示唆される。今後、機序解明のためには、免疫能やバクテリアアルトランスロケーションなどを調べていく必要があると考えられる。

まとめ

検体保存の方法を確立することにより、免疫担当細胞を用いて評価することが可能となった。

侵襲に対して、免疫担当細胞の変化を観察し得た。Danger Signal のひとつであるインフラマソームが活性化することを確認した。また、CD8 + T 細胞が減少し CD4 + T 細胞、B 細胞が増加していることから、生体への感染および外傷によるシグナルが生体応答を惹起し、Th1 から Th2 の方向へ免疫細胞が変化したことが考えられた。

吸引痰の免疫担当細胞は、好中球が中心で、リンパ球は少数であった。

腸管内の免疫応答は、腸内細菌叢の有無によって異なっており、今後、機序解明のためのさらなる研究が必要である。

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)

清水健太郎, 小倉裕司. 【ショック管理-ショックと臓器障害関連のメカニズム-】 ショックにおける臓器障害関連と治療戦略のトピックス 消化器

系と急性肺障害の臓器連関を考慮した治療戦略とは? 救急・集中治療 2017;29:397.

〔学会発表〕(計 1件)

Ikeda M, Shimizu K, Ogura H, Shimazu T. Dynamic alterations of gut microbiota, metabolites and IgA secretion in a murine model of sepsis. Critical Care Medicine 2016;44 (12).

〔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：
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

清水 健太郎 (SHIMIZU, Kentaro)
大阪大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60379203

(2) 研究分担者

小倉 裕司 (OGURA, Hiroshi)
大阪大学・医学(系)研究科・准教授
研究者番号：70301265

嶋津 岳士 (SHIMAZU, Takeshi)
大阪大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：50196474

吉矢 和久 (YOSHIYA, Kazuhisa)
大阪大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40379201

池田 光憲 (IKEDA, Mitsunori)
大阪大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：60548444

松本 寿健 (MATSUMOTO, Hisatake)
大阪大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：70644003

高橋 弘毅 (TAKAHASHI, Hiroki)
大阪大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：30609590

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()