

令和 2 年 5 月 12 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11592

研究課題名(和文)敗血症予後改善に向けたリンパ球機能維持戦略

研究課題名(英文)Therapeutic strategy for maintenance of lymphocyte function to improve the prognosis of sepsis

研究代表者

鈴木 武志 (SUZUKI, Takeshi)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：80327600

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、敗血症の重症度に応じたTリンパ球機能低下を確認した後に、Tリンパ球ミトコンドリア細胞内膜上にありアポトーシス誘導に関わるカリウムチャネルであるKv1.3を不活化することが、敗血症におけるリンパ球アポトーシスを抑えて予後を改善する、との仮説のもと行われた。盲腸穿孔術による敗血症モデルにおいて、重症度に応じて脾臓内Tリンパ球の数が減少していることが確認できた。次に、リンパ球にアポトーシス耐性を持たせるために必要なプラスミドをレンチウイルスシャトルベクターを用いて作成する研究に移ったが、プラスミド作成がうまくいかずに、それ以降の研究が滞ってしまった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

目覚ましい医学の進歩に関わらず、敗血症の死亡率はいまだに高く、予後改善に向けての治療法の確立は急務である。リンパ球アポトーシスによる免疫能低下は、敗血症患者予後に関わる重要な部分であり、本研究にてリンパ球機能維持が敗血症予後改善につながるということが証明できれば、新たな治療戦略に向けて前進できるものと考えていた。しかし、技術的な問題から、リンパ球がアポトーシスに対して耐性を獲得するためのプラスミドの作成がうまくいかずに、研究は中断されてしまった。今後はこの点をクリアしたうえで、敗血症予後改善に向けた研究を続けていきたい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated T-lymphocyte dysfunction and apoptosis in septic model according to the severity of sepsis, and examined whether transfer of T-lymphocytes which have resistance to apoptosis through inactivation of Kv1.3, which is associated with apoptosis induction, can improve the prognosis of sepsis in cecum puncture and ligation (CLP) septic model. In CLP septic model, the number of normal T lymphocytes in spleen was reduced according to the severity of sepsis. In the next experiment, we failed to make a plasmid to inactivate the function of Kv1.3 in T-lymphocytes, thus, studies could not be proceeded anymore.

研究分野：麻酔学、集中治療医学

キーワード：敗血症 リンパ球 アポトーシス Kv1.3

1. 研究開始当初の背景

目覚ましい医学の進歩にも関わらず、敗血症の死亡率はいまだに高い。敗血症では、初期の高炎症反応に続いて生じるリンパ球のアポトーシスを伴う免疫能の低下が患者予後に影響していると言われている。これまでの動物実験において、敗血症におけるリンパ球アポトーシスを抑制することが予後を改善することが報告されている。よって、リンパ球アポトーシスを抑制し、リンパ球の正常機能を維持することは、今後の敗血症治療戦略の一つになり得る。リンパ球アポトーシスに関わる機序にはいくつかあるが、その中でミトコンドリアに存在するカリウムチャンネルである Kv1.3 がリンパ球アポトーシスに関与していると言われている。本研究では、敗血症にて生じるリンパ球アポトーシスにおける Kv1.3 の役割を明らかにするとともに、レンチウィルスを用いた Kv1.3 の機能修飾がリンパ球のアポトーシスに対する耐性を作り出し、予後改善につながるかどうかを検討する。

2. 研究の目的

敗血症では、高炎症反応に引き続いて起こる免疫能の低下が2次感染を引き起こし患者予後に影響することが指摘されるようになり、免疫能を維持する治療法の確立に目が向けられてきている。Hotchkissらは、多臓器不全を伴う敗血症患者の剖検所見から、脾臓 T リンパ球等において高い確率でアポトーシスが生じていることを報告し、敗血症後期の免疫能低下は、早期から生じる T リンパ球のアポトーシスに関与していることを指摘した。さらに、その後の敗血症モデルを用いた動物実験において、リンパ球アポトーシスに関与する酵素を阻害する治療がリンパ球アポトーシスを抑制して予後を改善することを報告している。これらの研究結果を見れば、敗血症においてリンパ球の細胞死を抑制することによって免疫能を維持する治療法は、今後の治療戦略の一つになり得ると考えられる。

リンパ球のアポトーシスの機序としては、FasL や tumor necrosis factor- α (TNF- α) が細胞表面のレセプターに結合することによって誘導される外因系やミトコンドリアからチトクローム C が放出されることで誘導される内因系など、いくつかの経路が考えられている。しかし、敗血症早期から生じる T リンパ球を中心としたリンパ球アポトーシスの詳細のメカニズムについては、解明されていない点が多い。

T リンパ球の細胞膜には、電位開口型のカリウムチャンネルの一つである Kv1.3 が存在し、細胞内の過分極による細胞内の負の電位を維持する役割を担っていることが報告されている。細胞内が負の電位に維持されることによって、電位差を利用したカルシウムイオンの流入が生じ、流入したカルシウムイオンは、T リンパ球の活性化に寄与しているとされている。近年、このカリウムチャンネルである Kv1.3 は細胞質内のミトコンドリアの内膜にも存在することが明らかとなり、このイオンチャンネルの働きに関する研究が進んでいる。その中でも、ミトコンドリア内膜上の Kv1.3 の活性化が、リンパ球アポトーシスの誘導に関与していることが指摘されており、敗血症におけるリンパ球アポトーシスの機序の一つとして注目されている。ミトコンドリア内膜上の Kv1.3 の活性化がリンパ球アポトーシスに関与していることを裏付ける根拠としては、このチャンネルが存在しない CTLL マウス T 細胞リンパ腫の培養細胞株は、*in vitro* の研究にてアポトーシスに抵抗性を示すことや、逆にこの細胞株にミトコンドリア内膜上の Kv1.3 を発現させると、容易にアポトーシスが誘導されるようになることが挙げられる。よって、このミトコンドリア内膜に存在する Kv1.3 の活性を選択的に抑えることができれば、敗血症におけるリンパ球のアポトーシスを抑制し、予後を改善できる可能性がある。

以上の背景を踏まえ、本研究では、「ミトコンドリア内膜上に存在するカリウムチャンネルである Kv1.3 活性の抑制は、T リンパ球のアポトーシスを抑制し、敗血症の予後を改善する」という仮説を立て、研究計画を企てた。

3. 研究の方法

(1) 敗血症におけるリンパ球機能低下と重症度との関係の検討

まずは、敗血症におけるリンパ球機能低下と重症度との関係を検討するための実験を行った。マウスに対して盲腸穿孔術を行い(盲腸結紮部位を近位、中間位、遠位の3群に分けてそれぞれ評価、結紮部位によって重症度を変えることができる) 24時間後に全身麻酔下で脾臓を摘出し、正常 T リンパ球の数ならびにアポトーシスを評価する。アポトーシスの評価は、早期アポトーシスの検出には AnnexinV を用い、晚期アポトーシスの検出には Popidium Iodine を用いてフローサイトメトリーにて行う。

(2) Jurkat cell ならびに CLTT cell に対する FasL によるアポトーシス誘導効果の検討

FasL による外因系アポトーシス誘導効果を、ミトコンドリア内膜上 Kv1.3 が存在する Jurkat

cell とミトコンドリア内膜上 Kv1.3 が欠如している CLTT cell を用いて反応の違いを検討する。それぞれの細胞を含む培養液に FasL を加えてアポトーシスを誘導する。刺激開始 4 時間後に細胞を培養液から取り出し、アポトーシスの評価をフローサイトメトリーにて行う。

(3) レンチウイルスシャトルベクターを用いたミトコンドリア内膜上の Kv1.3 を不活化する 3 種類のプラスミドの作成

ミトコンドリア内膜上 Kv1.3 を不活化できる 3 種類のプラスミドを作成する。プラスミドの作成には、レンチウイルスシャトルベクターを用いる。Kv1.3 を不活化するための 3 つの遺伝子、Kv1.3 に対する拮抗薬である margitoxin の遺伝子、dominant negative Kv1.3 の遺伝子、Kv1.3 をターゲットとした shRNA、それぞれをレポーター遺伝子である Enhanced Green Fluorescent Protein(EGFP)とともにレンチウイルスシャトルベクターに組み込む。

(4) 遺伝子操作によってミトコンドリア内膜上 Kv1.3 が不活化されたリンパ球のアポトーシス刺激に対する反応の検討

実験(3)で作成した 3 種類のプラスミドならびに EGFP のみを組み込んだプラスミド計 4 種を用いて、Jurkat cell ならびにマウス脾臓から抽出した primary T lymphocyte に対して transfection を行う。それぞれ 4 種類のプラスミドによって遺伝子導入された Jurkat cell ならびに primary T lymphocyte に対して、FasL (0.01、0.1、1、10、100 ng/ml) による刺激によりアポトーシスの誘導を行い、4 時間後にフローサイトメトリーにてアポトーシスの評価を行い、アポトーシスへの耐性獲得を確認する。

(5) アポトーシスに対する抵抗性を獲得した primary T lymphocyte の細胞移入療法の敗血症予後改善効果に関する検討

敗血症における、アポトーシスに対する抵抗性を獲得した primary T lymphocyte の細胞移入療法の効果について検討する。全身麻酔下で盲腸を 2 か所で穿孔した後に、閉腹して敗血症モデルを作成する (CLP 群)。これとは別に、閉腹のみで盲腸穿孔術を行わない sham 群も準備する。Sham 群ならびに CLP 群を無作為に 2 群に分け、EGFP のみを発現する primary T lymphocyte または遺伝子操作にてミトコンドリア内膜上 Kv1.3 が不活化された primary T lymphocyte の投与を行う。18 時間後に全身麻酔下で脾臓摘出および血液採取を行い、脾臓内 T リンパ球のアポトーシスがどの程度生じているかを検証する。また、血液検体を用いて血中の炎症性サイトカインの測定も行う。別の実験として、アポトーシスに対する抵抗性を獲得した primary T lymphocyte の細胞移入療法の生存率に与える効果についても検討する。

4. 研究成果

(1) 敗血症におけるリンパ球機能低下と重症度との関係の検討

それぞれ盲腸の違う箇所 (近位、中間位、遠位) で結紮して作成した重症度の違う 3 つの敗血症モデルにおいて、重症度に応じて脾臓内の正常 T リンパ球の数が減少したが、アポトーシスの評価において差はみられなかった (図 1)。重症度による正常 T リンパ球数の低下は、重症度が上がるに従い免疫能が低下していることが示唆される。

(2) Jurkat cell ならびに CLTT cell に対する FasL によるアポトーシス誘導効果の検討

FasL による Jurkat cell のアポトーシスの誘導ならびにミトコンドリア内膜上 Kv1.3 が欠如している CLTT cell の FasL によるアポトーシス誘導に対する耐性については、研究責任者が米国ウィスコンシン大学に研究員として留学している期間に行った実験にて証明しているため、今回は割愛した。

(3) レンチウイルスシャトルベクターを用いたミトコンドリア内膜上の Kv1.3 を不活化する 3 種類のプラスミドの作成

レンチウイルスを用いた 3 種類のプラスミドの作成がうまく進まず、それ以降の研究が滞ってしまった。

図 1

(a) 脾臓内正常 T リンパ球数

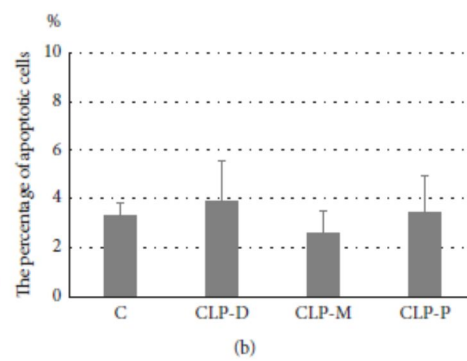
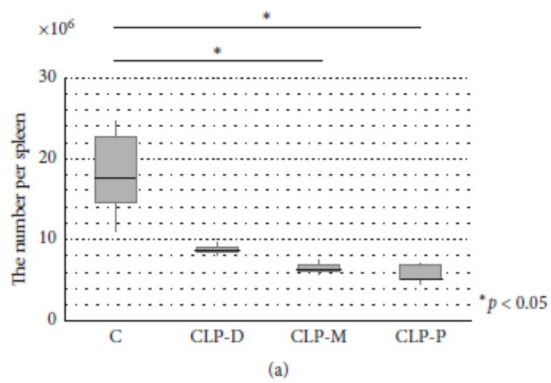
(b) アポトーシスの割合

C: sham operation group

CLP-D: CLP at the distal cecum

CLP-M: CLP at the mid-cecum

CLP-P: CLP at the proximal cecum



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takeshi Suzuki, Kei Inoue, Toru Igarashi, Jungo Kato, Hiromasa Nagata, Takashige Yamada, Shizuka Minamishima, and Hiroshi Morisaki	4. 巻 8157482
2. 論文標題 Beta-Blocker Therapy Preserves Normal Splenic T-Lymphocyte Numbers Reduced in Proportion to Sepsis Severity in a Sepsis Model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Critical Care Research and Practice	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1155/2019/8157482	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	南嶋 しづか (MINAMISHIMA Shizuka) (20622088)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師 (32612)	
研究分担者	加藤 純悟 (KATO Jungo) (40465018)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教 (32612)	