

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19592104
 研究課題名（和文）侵襲下骨髄細胞アポトーシス誘導と免疫抑制における TIR ファミリーレセプターの役割
 研究課題名（英文）The role of TIR family receptors in the induction of apoptosis of bone marrow cells and the immunosuppression after the endotoxemia.
 研究代表者
 小谷穰治 (Kotani Joji)
 兵庫医科大学・医学部・准教授
 研究者番号 80360270

研究成果の概要：本研究では IL-18 knock out マウス(KO)を用いて lipopolysaccharide (LPS) 投与によりエンドトキシン血症モデルを作成し、エンドトキシン血症下での過剰な IL-18 の存在が生存率に關与する可能性が示唆された。また、顆粒球の細胞動態とアポトーシスには性差が存在し、IL-18 は性別により血中濃度や顆粒球系細胞に対する作用が異なることが明らかとなった。このことは性差における致命率の差に IL-18 が關与していることを示しており、今後の IL-18 投与、又は中和療法において性別が重要であること示すものである。

交付額

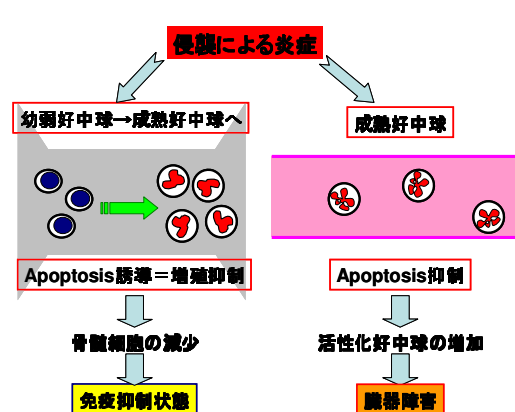
(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	4,320,000	1,680,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学
 科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学
 キーワード：集中治療医学

1. 研究開始当初の背景

外科手術後のような侵襲下では、敗血症などにより正常な免疫応答が阻害されており、過度の炎症反応状態から一転して免疫抑制状態や多臓器不全に陥って死に至る。侵襲後早期の臓器不全発症の機序としては、好中球の活性化、特に apoptosis 抑制とそのメカニズムについて多く報告されてきた。しかし一方で、侵襲後期に起こる免疫抑制状態についての機序は未だ明らかではない。我々は自然



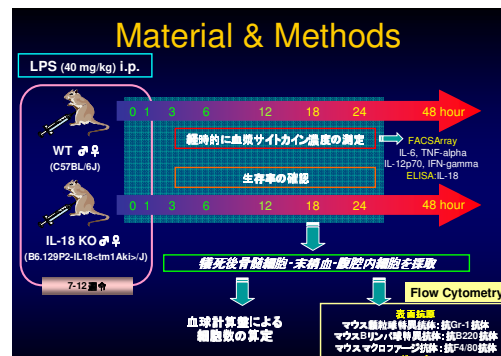
免疫の first line である好中球に着目して研究を行ってきたが、好中球の起源である骨髄細胞に著しい apoptosis が誘導されること、骨髄細胞が好中球への分化に伴って apoptosis 抵抗性を獲得していくこと、を急性エンドトキシン血症モデルで発見し、侵襲下の免疫抑制・易感染性の一機序として報告し、高い評価を得ている（アメリカ外科感染症学会で AWARD 受賞）。本研究では、マウス敗血症モデルで骨髄細胞の apoptosis 誘導および apoptosis 関連蛋白発現における Toll-like receptors (TLRs) のシグナルの役割と、骨髄細胞の好中球への成熟度に応じたそれらの変化を解明する。IL-18 は多様な役割が報告されており、侵襲下でも血中に長く検出されるが、侵襲下で具体的にどのような役割を担っているかは不明な点が多い。IL-18 のレセプターは TLR とシグナル伝達経路が非常によく似ていることから、侵襲下における IL-18 が炎症反応を増大させる可能性も考えられるが、我々の研究では既に IL-18 KO マウスはエンドトキシン血症での生存率を改善する結果を得ており（未発表）、骨髄の apoptosis も IL-18 KO マウスでは改善されるのではないかと予測している。侵襲下の骨髄幼弱好中球の apoptosis 誘導は、自然免疫の first line である好中球の枯渇を意味し、非特異的免疫能低下の重要な要因と考えられる。よって、その責任メディエーターとシグナルを明らかにすることは、大侵襲後の免疫抑制に基づく重症感染症や引き続く臓器不全発症の予防および治療策の確立に多いに貢献する。また、グラム陽性菌または陰性菌の菌体成分であるペプチドグリカンやエンドトキシンのレセプターである TLRs の侵襲下における役割を明らかにすることにより、敗血症の病態を解明できると考えている。

2. 研究の目的

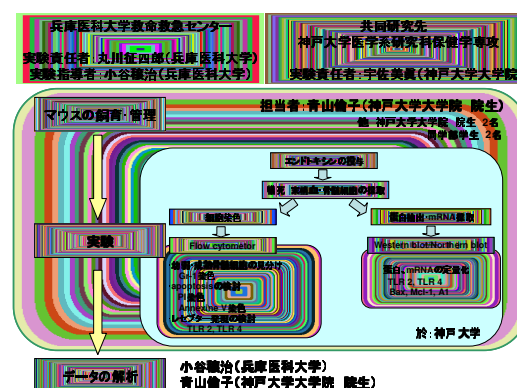
本研究では、エンドトキシン血症モデルで、骨髄細胞の apoptosis 誘導および apoptosis 関連蛋白発現における TLRs などの PRRs や IL-18 の関与を、骨髄細胞の好中球への成熟度に応じたそれらの変化を検討するものである。

3. 研究の方法

IL-18KO マウスと Wild type (WT) マウス (C57/BL6J) を用いたエンドトキシン血症モデル（具体的にはマウス腹腔内に LPS 40 mg/kg を投与する）を作成し、投与後 24 時間

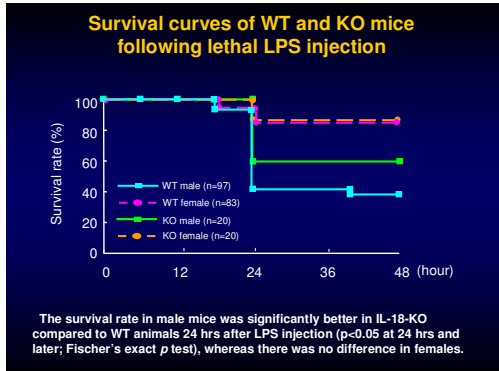


までで犠牲せしめ、骨髄細胞、末梢血、腹腔内浸潤細胞を採取する。フローサイトメーター、リアルタイム PCR、Western blot などを用いて、好中球の apoptosis と関連するシグナル伝達経路を WT と KO で比較検討する。マウスの管理・飼育実験は神戸大学医学系研究科保健学専攻でおこなう。この実験施設ではマウスの飼育・管理及び実験のいずれにおいても方法が確立しており、本実験について、神戸大学の動物実験委員会、遺伝子実験委員会の承認も得られている。以下に具体的な研究体制を図で示す。

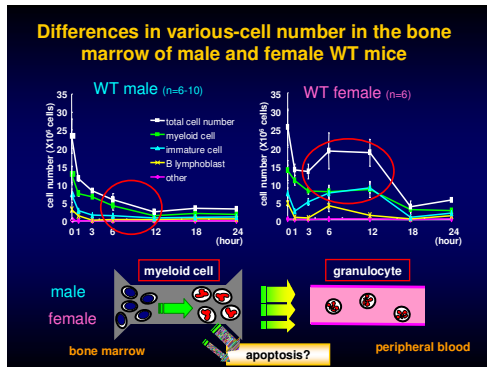


4. 研究成果

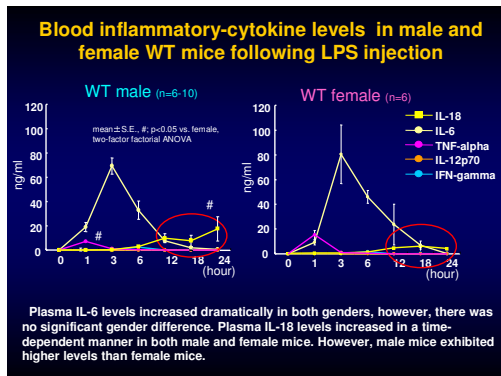
<24 時間後の生存率>雄 WT マウス 41%、雌 WT マウス 84%、雄 KO マウス 60%、雌 KO マウス 82%であった。雄は雌に比べ生存率が低く、かつ雄では KO マウスで生存率が改善したが、雌では変化は見られなかった。



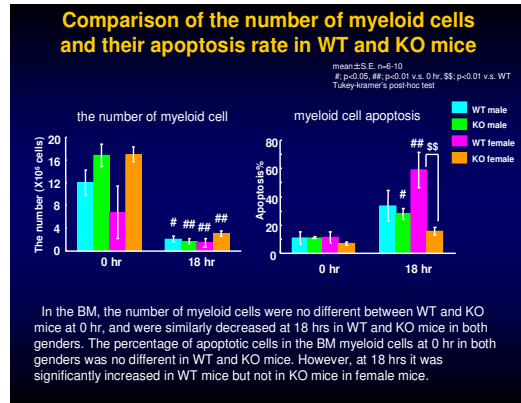
<細胞数>WT マウス雄では経時的に骨髄球系細胞数が減少し、雌では LPS 投与後 18 時間目で減少がみられた。腹腔内顆粒球細胞数は雄では経時的に増加し、雌では低い値を保っていた。アポトーシス骨髄、末梢血、腹腔内での顆粒球系細胞のアポトーシスを WT マウスの雌雄で比較したところ、骨髄、末梢血では有意な差は見られなかったが、腹腔内顆粒球アポトーシスは雌に比べて雄で有意に抑制した。



<血漿中サイトカイン濃度> IL-6、IFN-gamma、IL-12p70 に雌雄差はなかった。しかし TNF-alpha は雄で有意に低く、IL-18 は雄で有意に高かった。かつ L-18 は経時的に増加し続け、24 時間後が最高値であった。



<KO との比較>LPS 投与後 18 時間の骨髄球系アポトーシスは雌で WT よりも KO で有意に低かったが、雄では有意差はなかった。腹腔内の顆粒球アポトーシスは WT と KO で有意差はなかった。



<考察>雄は LPS の刺激に対して骨髄から顆粒球系の細胞を末梢へとより多く放出し、かつ腹腔内まで浸潤していくこと、一方で雌は雄に比べて反応は緩やかであることが示唆された。また、腹腔内まで浸潤した顆粒球について、雄ではアポトーシスが遅延して活性化した顆粒球が多く存在する可能性が考えられた。また、エンドトキシン血症下で IL-18 は経時的に増加し、雌雄差が存在することが明らかとなり、過剰な IL-18 の存在は生存率に関与する可能性が示唆された。また、IL-18 はエンドトキシン血症下の骨髄球系のアポトーシスを雌でのみ促進している可能性が示唆された。以上より、顆粒球の細胞動態とアポトーシスには性差が存在し、IL-18 は性別により血中濃度や顆粒球系細胞に対する作用が異なることが明らかとなった。現在、抗 IL-18 抗体による炎症治療の可能性が検討されているが、性別を重視して検討を重ねる必要があると考えられた。

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)

Aoyama M, Kotani J, Usami M

Gender difference in granulocyte dynamics and apoptosis and the role of

IL-18 during endotoxin-induced systemic inflammation

Shock, in press.

査読有り

〔学会発表〕(計 2件)

1. 青山倫子、小谷穰治、宇佐美眞、丸川征四郎 エンドトキシン血症下の骨髄細胞のアポトーシスにおけるIL-18の役割の雌雄差
第15回外科侵襲とサイトカイン研究会、2008年12月13日、岩手県
2. Aoyama M, Kotani J, Usami M, Marukawa S. The role of IL-18 in apoptosis induction of bone marrow granulocytes during systemic inflammation in mice.

第31回アメリカショック学会、第6回国際ショック学会(共同開催)、2008年7月1日、ドイツ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小谷穰治 (Kotani Joji)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号 80360270

(2) 研究分担者

寺嶋真理子 (Terashima Mariko)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号 00412015

大家宗彦 (Munehiko Oya)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号 40309480

切田学 (Kirita Manabu)
兵庫医科大学 医学部 非常勤講師
研究者番号 40289062

丸川征四郎 (Marukawa Seishirou)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号 00030883

宇佐美眞 (Usami Makoto)
神戸大学・医学部・教授
研究者番号 00193855

(3) 連携研究者