

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K18327

研究課題名（和文）敗血症における免疫不全の原因は制御性B細胞か？：PD-L1発現との関連

研究課題名（英文）Is regulatory B cell the cause of immunodeficiency in sepsis?: The relationship with PD-L1 expression

研究代表者

松本 紘典 (Matsumoto, Hironori)

愛媛大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70772531

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：近年、敗血症の病態の一つの免疫抑制状態が注目されているが、敗血症における免疫反応は詳細には把握されていない。我々は動物実験により敗血症に伴う免疫担当細胞の動態解析を行い、超急性期にB細胞が激減する一方、IL-10産生性制御性B細胞のみは残存して、PD-L1を発現することを見出した。今回、敗血症病態においてIL-5が生存率や凝固障害、腹腔内の細菌処理能と関連し、腹腔内でのTh2やILC-2でIL-5産生が確認できたが、IL-5とPD-1、PD-L1の発現との関連は見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、PD-1/PD-L1の相互作用を抑制し、T細胞の活性化抑制を阻止することによる免疫賦活療法が、癌治療で劇的な効果を上げ注目を浴びている。今回、敗血症におけるPD-1抗体の敗血症への応用を目的として、PD-1、PD-L1の発現との関連を中心とした、敗血症に特徴的な免疫応答を明らかとすることである。

研究成果の概要（英文）：In recent years, the immunosuppressive state, one of the pathologies of sepsis, has been attracting attention, but the immune response in sepsis is not well understood in detail. Through animal experiments, we analyzed the dynamics of immune cells associated with sepsis and found that while B cells drastically decrease in the acute phase, only IL-10 producing regulatory B cells remain and express PD-L1. In the current study, IL-5 was found to be associated with survival rate, coagulation disorders, and bacterial clearance in the peritoneal cavity during the septic state. IL-5 production by Th2 and ILC-2 cells was confirmed in the peritoneal cavity; however, no correlation was observed between IL-5 and the expression of PD-1 and PD-L1.

研究分野：敗血症

キーワード：敗血症

### 1. 研究開始当初の背景

敗血症は集中治療領域での死亡原因のトップを占める病態であり、その病態解明や治療法開発が急ぎ進められているが、詳細な病態の把握や死亡率改善に至らない現状にある。近年、敗血症の病態の一つの免疫抑制状態が注目されるようになり、PD-1/PD-L1 相互作用を抑制する抗体投与による T リンパ球の免疫賦活の有効性も報告された。しかし、敗血症における免疫反応もまた詳細には把握されていない。我々は盲腸結紮穿孔 CLP によるマウス敗血症モデルを用いて、敗血症に伴う免疫担当細胞の動態解析を行ってきた。これまでに我々は、敗血症モデルマウスにおいて、超急性期に B 細胞が激減する一方、IL-10 産生制御性 B 細胞のみは残存して、PD-L1 を発現することを見出した。PD-L1/PD-1 相互作用による T 細胞反応の抑制が、敗血症の予後悪化に結びつく免疫抑制状態の本態と見て、その病態解明に挑むとともに、抗 PD-1 抗体 (オブジーボ) を用いた治療の最適投与時期を見出したいと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、敗血症病態における免疫反応の動態の解明、特に未だ詳細な病態が把握されていない免疫抑制機構の把握である。

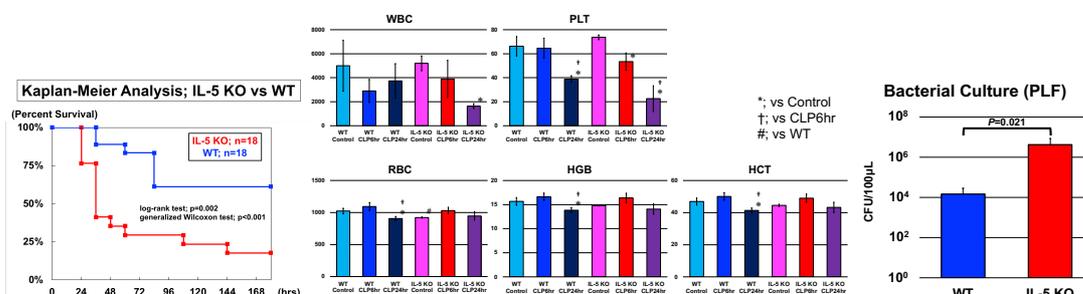
### 3. 研究の方法

C57BL/6J (ワイルドタイプマウス) や我々が保有する IL-5Venus マウス (C. 129S4 (B6)-*I15<sup>tm1Ktk</sup>* (*I15<sup>Venus</sup>*)) を用いた。CLP は施術前にイソフルラン吸入麻酔 (導入 4-5%, 維持 2-3%) し、開腹、末端から 1.5cm の部位 (重症度に応じ近位側のこともあり) で結紮し、23G 針で同部を刺通 (重症度に応じ 1 もしくは 2 ヶ所)、閉腹した。施術後、目的に応じて保温、抗生剤投与、補液を行った。CLP 後の経過時間毎に犠牲死させ、血液、血清および脾等の臓器を採取した。生存解析や、細菌処理能評価、血算の血液検査評価やフローサイトメトリーでの CLP 後の経過時間による血流中免疫担当細胞の動態のポピュレーション解析や PD-L1 発現状況の評価を行った。

### 4. 研究成果

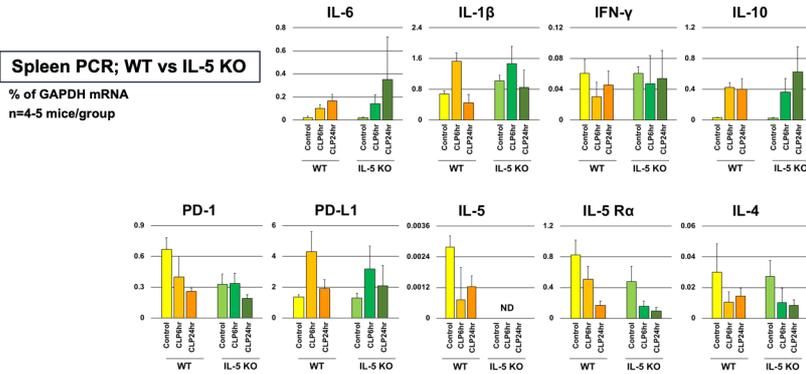
#### (1) 敗血症における IL-5 の病態への影響

IL-5KO マウスは WT マウスに比べ、CLP 後の生存率が低かった。IL-5KO マウスでは CLP 後の血小板数低下が強く、腹腔内での細菌数が有意に多かった。このことから、IL-5 は敗血症病態での凝固能や腹腔内細菌処理能に関与し、生存に寄与している可能性が考えられた。



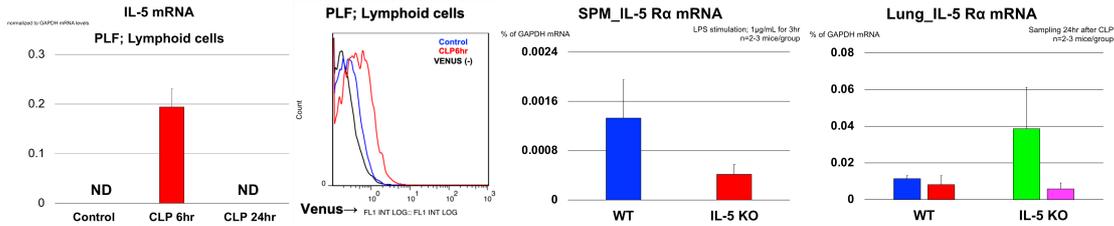
#### (2) 敗血症における IL-5KO マウスのサイトカイン産生状況

IL-5 の有無による敗血症病態でのサイトカイン産生状況に明らかな差は見出せなかった。



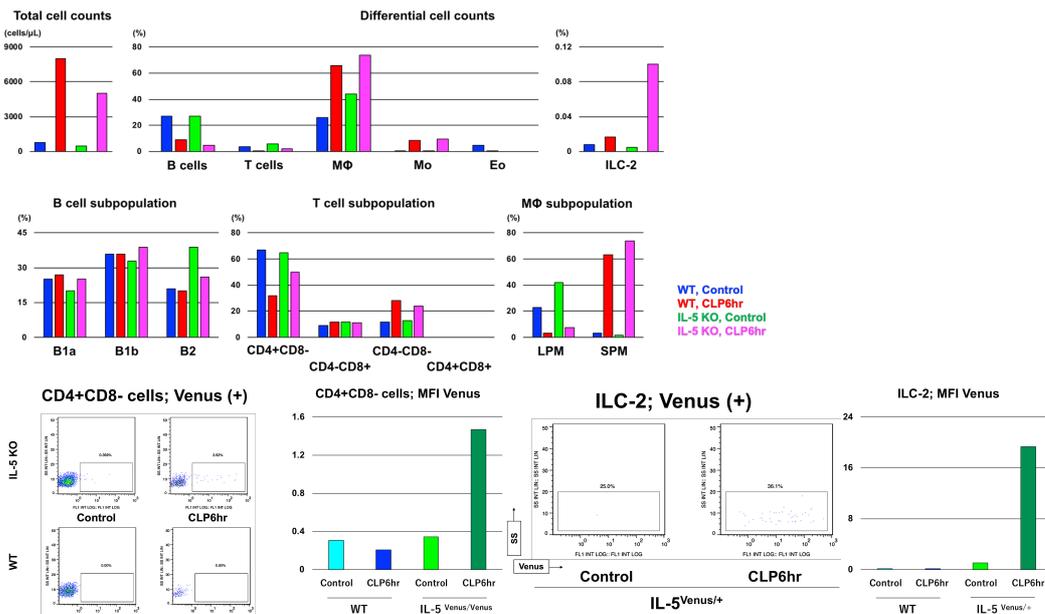
### (3) 敗血症での IL-5 反応臓器検索

敗血症病態において IL-5 が関与している臓器の検索を行った所、腹腔内で CLP 後の IL-5 産生が確認できた。IL-5R $\alpha$  の発現は SPM や肺で見られた。



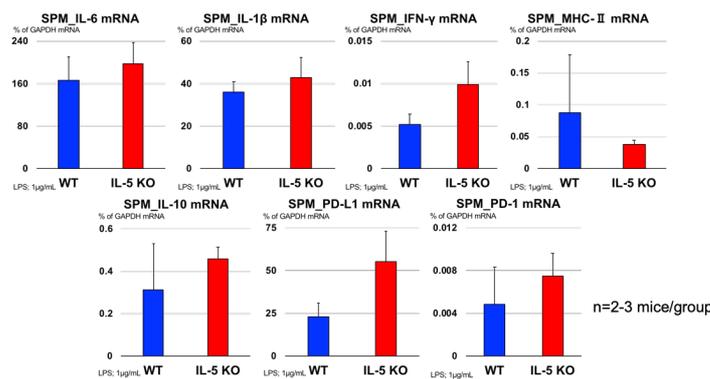
### (4) 敗血症での腹腔内の免疫担当細胞ポピュレーション解析

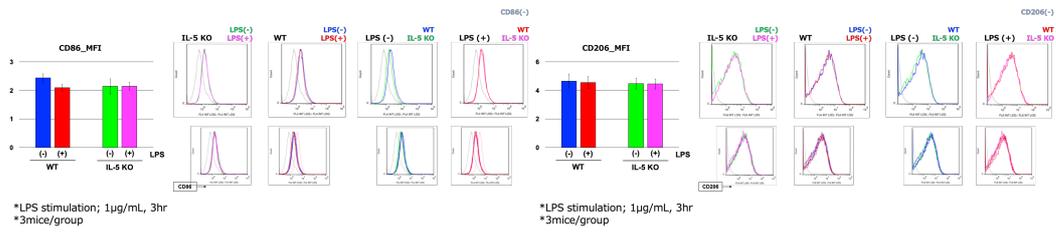
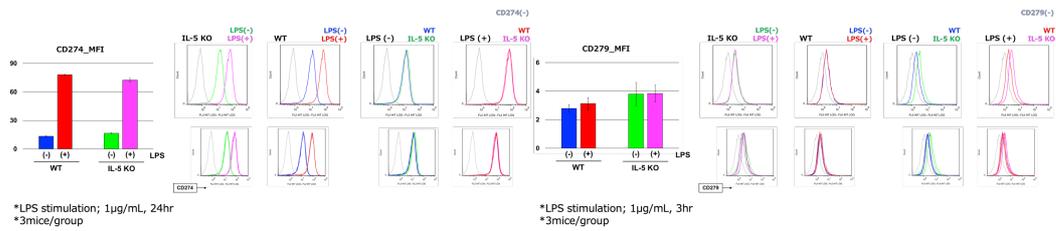
CLP により腹腔内の細胞数は増加した。分画としては、B cell・T cell・LPM・Eo は減少し、SPM・Mo・ILC-2 が増加した。IL-5 KO では Eo が存在せず、WT に比し M $\phi$ ・ILC-2 が多かった。IL-5 は Th cell と ILC-2 から CLP により産生が確認された。



### (5) 腹腔 M $\phi$ の敗血症病態での免疫反応

IL-5 の影響が見られる腹腔内に主眼を置き、腹腔 M $\phi$  の SPM と LPM を抽出、解析した。WT と IL-5KO でサイトカイン産生や PD-1、PD-L1、MHC-II、CD86、CD206 発現状況などに差は見られなかった。





## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 松本紘典	4. 巻 29
2. 論文標題 急性病態における血液凝固線溶動態の解明と治療戦略の構築	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 炎症と免疫	6. 最初と最後の頁 82 - 86
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsumoto H, Takeba J, Umakoshi K, Kikuchi S, Ohshita M, Annen S, Moriyama N, Nakabayashi Y, Sato N, Aibiki M	4. 巻 19
2. 論文標題 ADAMTS13 activity decreases in the early phase of trauma associated with coagulopathy and systemic inflammation: a prospective observational study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Thrombosis Journal	6. 最初と最後の頁 17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12959-021-00270-1	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 -
1. 著者名 Matsumoto H, Ishimaru K, Kikuchi S, Akita S, Yamamoto Y, Yoshida M, Koga S, Egi H, Watanabe Y	4. 巻 -
2. 論文標題 Perioperative coagulofibrinolytic responses in colorectal surgery patients without chemical thromboprophylaxis: a retrospective observational study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00595-021-02393-4	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 -
1. 著者名 Hironori Matsumoto, Jun Takeba, Kensuke Umakoshi, Satoshi Kikuchi, Muneaki Ohshita, Suguru Annen, Naoki Moriyama, Yuki Nakabayashi, Norio Sato and Mayuki Aibiki	4. 巻 19
2. 論文標題 ADAMTS13 activity decreases in the early phase of trauma associated with coagulopathy and systemic inflammation: a prospective observational study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Thrombosis Journal	6. 最初と最後の頁 17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12959-021-00270-1	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 -

1. 著者名 松本紘典	4. 巻 29
2. 論文標題 急性病態における血液凝固線溶動態の解明と治療戦略の構築	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 炎症と免疫	6. 最初と最後の頁 82-86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Umakoshi K, Choudhury ME, Nishioka R, Matsumoto H, Abe N, Nishikawa Y, Kikuchi S, Takeba J, Yano H, Yorozuya T, Sato N, Aibiki M, Tanaka J.	4. 巻 523
2. 論文標題 B lymphocytopenia and Bregs in a not-to-die murine sepsis model.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 202-207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.12.041.	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松本紘典
2. 発表標題 急性病態の凝固線溶動態とDIC
3. 学会等名 DIC治療 Webセミナー (JB 日本血液製剤機構)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本紘典
2. 発表標題 DICを説明できるようになるう
3. 学会等名 ER ICU ASSISTセミナー (2) (旭化成ファーマ)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本紘典
2. 発表標題 重症COVID-19症例のFDP上昇時の凝固線溶活性の検討
3. 学会等名 第49回日本救急医学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本紘典
2. 発表標題 侵襲に対する急性期の病的凝固線溶反応指標としてのFDP
3. 学会等名 日本救急医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松本紘典
2. 発表標題 急性病態の凝固線溶動態とDIC
3. 学会等名 DIC治療Webセミナー
4. 発表年 2021年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------