

平成 23 年 5 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390111

研究課題名 (和文) 敗血症時の自然免疫発動における T 細胞介入機構の解明

研究課題名 (英文) Role of T cells in the innate immune response during sepsis

研究代表者

松川 昭博 (MATSUKAWA AKIHIRO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：90264283

研究成果の概要 (和文) : マウス腹腔内には未処置でも多くの T 細胞が存在し、感染とともにその数は増加した。RAG-2 欠損マウスは感染性腹膜炎に高感受性を示し、T 細胞移入により抵抗性を示した。T 細胞特異的に SOCS5 を過剰に発現したマウスでは感染局所の Th1 反応が増強され、SOCS3 の過剰発現では全身性炎症反応は軽減して、いずれも敗血症抵抗性を示した。以上より、T 細胞は自然免疫賦活に働き、SOCS 因子発現で調整される。他にも、複数の炎症モデルで炎症発動時の T 細胞の役割を明らかにした。

研究成果の概要 (英文) : T cells exist in the peritoneum under healthy conditions. Rag2Ko mice (T and B cell deficient) showed increased mortality rate during sepsis, which was recovered after adoptive transfer of T cells, but not B cells. Mice with overexpression of SOCS5 in T cells (SOCS5-cTg) demonstrated increased Th1 response in the peritoneum whereas SOCS3-cTg mice exhibited decreased systemic inflammatory response during septic peritonitis, leading to the increased survival rate during sepsis. Thus, T cells appear to be important in innate immunity, which can be controlled by SOCS3/5 in T cells. We also elucidated the crucial roles of T cells in different types of inflammation models, such as T cell-dependent hepatitis and arthritis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2009 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	9,200,000	2,760,000	11,960,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、実験病理学

キーワード：敗血症、自然免疫、サイトカイン、シグナル伝達

### 1. 研究開始当初の背景

敗血症は、感染細菌成分やその毒素（LPS）によって惹起される全身性炎症反応症候群（SIRS）で、ショック、DIC、多臓器不全を起こす。SIRSは、pro-inflammatory cytokine TNF $\alpha$ ・IL-1を始めとする炎症性サイトカインの多量放出が原因とされる。しかし一方で、TNF $\alpha$ ・IL-1の抑制は易感染性を誘発する。申請者は、敗血症性腹膜炎モデルを用いた研究から、Th1 サイトカインやケモカインは感染局所の細菌排除を促進し、Th2 サイトカインは全身性に炎症反応を抑制して、いずれも生体防御に働くことを示してきた。このように、サイトカインは本来生体防御に働くが、その産生が過剰あるいは長期に及ぶと生体侵襲に転じる。サイトカインは「しかるべき時にしかるべき場所で適量の産生のもと」に、その機能が発揮されることが肝要といえる。

現在のSIRSメディエーター研究は、(1) TLR細胞内情報伝達系、(2) サイトカイン情報伝達系(Jak-STAT等)、(3) 新規メディエーターに大別される。申請者は、(2)の分野で研究を展開し、敗血症時の自然免疫はSTAT4/6で調節されること、局所及び全身のサイトカイン産生は、食細胞STAT3に依存することを初めて明らかにした。また、Th2細胞に発現するCCR8による自然免疫抑制機構を証明した。最近、Jak-STAT経路制御因子(SOCS)の研究が進み、SOCS因子によるTh1/Th2/Th17反応制御が示されつつある。申請者は、T細胞特異的なSOCS5の過剰発現により、敗血症時の自然免疫は賦活化されることを報告した。この事実はT細胞による自然免疫への直接介入を示唆する。

細菌感染時の生体防御は食細胞に依存する。しかし、健常人末梢白血球の20-30%はT細胞で、好中球(40-60%)について多い。T細胞は腹腔にも常在する(10-20%)。TLRを発現するT細胞は感染初期にも微生物に出会うは

ずで、本来の獲得免疫司令塔としての役割だけでなく細菌感染初期の自然免疫にも直接働く可能性がある。以上から、T細胞による自然免疫直接介入機構を明らかにし、感染時の初動免疫における新しい免疫パラダイムを確立する、という着想に至った。免疫不全状態では、弱毒細菌への日和見感染のリスクが高く、マウス感染性腹膜炎での致死率はT細胞欠損マウスで有意に高い。この事実は、感染時の自然免疫発動にT細胞が関与することを示唆する。

### 2. 研究の目的

細菌感染初期に局所に浸潤し異物排除に働く細胞は食細胞であり、これまで細菌感染の初動免疫におけるリンパ球の役割は等閑にされてきた。本研究では、細菌感染初期におけるリンパ球の役割に焦点をあて、常在リンパ球による自然免疫への直接介入機構を以下のように明らかにし、新しい免疫パラダイムを構築する。

- (1) 腹膜炎誘発敗血症モデルの感染初期自然免疫発動におけるT細胞の役割
- (2) T細胞による食細胞賦活化機構
- (3) T細胞-食細胞の相互作用からみた細菌感染後免疫不全の分子基盤解明
- (4) T細胞によるLPSトレランス調節機構
- (5) T細胞サイトカインシグナル伝達を介した自然免疫調節・制御機構

以上より敗血症の分子基盤を解明し、EBMに基づく敗血症の新規治療法創出を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) T細胞による敗血症時の自然免疫への直接関与の解析：

- ① マウスに敗血症を誘導し、経時的に腹腔内・末梢血中のT細胞フェノタイプを解析する。T細胞が産生するサイトカイン

を同定し、サイトカイン情報伝達に関わる STAT3/4/6 因子の活性化、SOCS1/3/5 の発現を調べる。敗血症モデルはマウス盲腸を注射針で穿孔し、漏洩する腸内細菌群によりおこる感染性腹膜炎 (cecal ligation and puncture; CLP) を用いる。

- ② T&B 細胞欠損マウス (RAG-2 欠損マウス) に敗血症を誘導し、マウス死亡率の違いを野生型と比較する。敗血症誘導後の腹腔滲出細胞数、分画を調べ、マウス細菌保有量を定量する。腹腔滲出液、血清、各臓器抽出液中の各種サイトカインを測定する。
- ③ RAG-2 欠損マウスに野生型 T 細胞あるいは B 細胞を移植したのち敗血症を誘導し、生体変化を観察する。これにより、RAG-2 欠損マウスによる自然免疫不全が T/B いずれに依存するかを決定する。
- ④ T 細胞移植を受け敗血症を誘導された RAG-2 欠損マウスの腹腔から経時的に食細胞 (マクロファージ、好中球) を単離し、T 細胞が食細胞活性化に及ぼす影響を、サイトカイン産生、表面抗原、活性酸素、STAT 因子の活性化、SOCS 因子の発現を指標に検討する。
- ⑤ エンドトキシン敗血症モデルを野生型及び RAG-2 欠損マウスに誘導し、リンパ球の有無による生体変化、T 細胞移入による生体変化を合わせて観察する。

(2) T細胞解析とT細胞の食細胞活性化に及ぼす影響

- ① RAG-2 欠損マウスの腹腔内に移植した T 細胞の詳細なフェノタイプを解析する。敗血症誘導後の T 細胞の活性化や腹腔内挙動にも留意する。
- ② 食細胞を CD4+/CD8+/CD4+25+/ $\gamma$   $\delta$  T 細胞存在下に LPS で刺激し、食細胞活性化の状況を調べる。細胞間コンタクトが必要か否かを検証する。
- ③ *in vitro* で食細胞賦活に働く T 細胞フェノタイプを RAG-2 欠損マウスに移入し、自然免疫賦活に働く T 細胞フェノタイプを決定する。

(3) T細胞SOCS因子による自然免疫修飾機構の解明

- ① SOCS1/3/5 各遺伝子改変マウスの敗血症誘導前後の腹腔内、脾細胞、末梢血細胞を解析し、T 細胞のフェノタイプを明らかにする。
- ② 単離 CD4+T 細胞を培養し、その培養上清中の各種サイトカイン産生量を測定する。また、野生型食細胞を各種 T 細胞存在下で培養し、食細胞機能に及ぼす影響を探る。
- ③ SOCS 遺伝子改変 T 細胞での表面抗原やサイトカイン産生能について検討する。
- ④ 敗血症により胸腺細胞のアポトーシスが起こる。アポトーシスの制御は生存率改善をもたらす。STAT/SOCS 系はアポトーシスに深く関わるため胸腺 T 細胞アポトーシスを観察する。
- ⑤ T 細胞 SOCS 因子による自然免疫介入は、T 細胞由来サイトカインに依存する可能性が高い。当該サイトカインの中和抗体や RNAi による *in vivo* 消去により、候補因子を確定する。
- ⑥ エンドトキシン敗血症モデルを T 細胞 SOCS 因子改変マウスに誘導し、T 細胞 SOCS 因子の役割を調べる。エンドトキシントレランスの T 細胞 SOCS 因子による制御も合わせて検討する。

(4) 二次感染時の T 細胞の役割とシグナル伝達

- ① 野生型及び RAG-2 欠損マウスに非致死性の感染性腹膜炎を誘導し、その影響が消える 1-2 週間後に腹腔内に大腸菌を投与し再感染を起こす。この時、マウス生存率、腹腔内及び血中の細菌数、腹腔・末梢血・緒臓器中のサイトカイン産生量を測定し、リンパ球の有無による二次感染時の免疫変化を観察する。RAG-2 欠損マウスに CD4+T 細胞を移入した場合の変化を検証する。LPS トレランスモデルを用いた解析も合わせて行う。
- ② CD4+T 細胞での STAT/SOCS 因子の発現状況を探り、T 細胞特異的遺伝子改変マウスに同様の二次感染を起こし、その後の生体変化を同様に解析する。

4. 研究成果

(1) マウスに感染性腹膜炎を誘導し、経時的に腹腔内の T 細胞フェノタイプを解析した結果、腹腔内には未処置でも多くの T 細胞が存在し、一部は活性化していること、感染とともにその数は増加する事を見出した。RAG-2 欠損マウス (T/B 欠損マウス) は、感染性腹膜炎に高感受性を示し、T 細胞を RAG-2 欠損マウスに移植したのち敗血症を誘導すると、Th1 サイトカイン産生は増幅されマウスは感染抵抗性を示した。この現象は、SOCS3 や SOCS5 の T 細胞強制発現で増幅された。一方、B 細胞移入では変化なかったことから、自然免疫調節に関与するのは T 細胞であることが判明した。次に、T 細胞に発現するシグナル伝達抑制因子の関与を検討した。その結果、T 細胞特異的に SOCS5 を過剰に発現したマウスでは感染局所の Th1 反応が増強され、SOCS3 の T 細胞過剰発現では全身性炎症反応は軽減して、いずれも敗血症抵抗性を示した。以上より、T 細胞は自然免疫賦活に働くこと、これらは SOCS 因子で調整されることを明らかにした。

(2) Th 反応の主役である CD4T 細胞における SOCS3 の役割を知るために、CD4T 細胞特異的に SOCS3 が欠損したマウスを用いて感染性腹膜炎時の免疫反応を検証した。その結果、CD4T 細胞特異的 SOCS3 欠損マウスでは、コントロールマウスと比べ、腹腔内および末梢血中の細菌保有量やサイトカイン産生量に有意な差は見られず、敗血症誘導後のマウス致死率に差はなかった。この結果は、自然免疫における SOCS3 の役割は CD4 以外の T 細胞による可能性を示唆する。この結果を受け、CD8T 細胞に着目して研究を進める予定である。

(3) 敗血症時の CD4T 細胞における SOCS1 の役割についても解析予定であったが、マウスの交配・繁殖に時間を要したため、計画期間内には行えなかった。今後、検討していく。

(4) エンドトキシントレランスと T 細胞シグナル伝達抑制にも着目した。低濃度のエンドトキシンに暴露されたマウスは、高濃度のエンドトキシンに対して抵抗性を示す。T 細胞 SOCS3/SOCS5 過剰発現マウスにトレランスを誘導して野生型マウスと比較したところ、SOCS5 過剰マウスでトレランスの誘導は増幅

した。SOCS3 過剰発現マウスでは変化なかった。IL-10 の産生上昇とそれに伴うと考えられるマクロファージ上の TNF $\alpha$ -R 発現の低下がその原因との予備実験結果を得ており、現在、さらにメカニズムを解析中である。

(5) 敗血症以外の急性肝炎モデルにおいても解析した。劇症肝炎を用いた検討では、肝臓で STAT 因子の活性化、SOCS 因子の発現増加がおり、SOCS3 や SOCS5 の T 細胞過剰発現により、炎症反応は修飾されて肝傷害の程度は大きく変化した。関節炎モデルにおいては、SOCS5 の過剰発現により Th1 反応は増強し関節炎は重症化、遷延化した。

この研究課題は、獲得免疫担当細胞である T 細胞による初期自然免疫への直接介入を明らかにするという独創的な取組みで、これにより従来の免疫システムに変わる新しい免疫パラダイムを確立した。この研究課題により得られる知見は、敗血症を含めた難治性の炎症性疾患の新たな治療法の開発への道を開く意義を持つと期待できる。

## 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 11 件)

- ① Arikawa T, Saita N, Oomizu S, Ueno M, Matsukawa A, Katoh S, Kojima K, Nagahara K, Miyake M, Yamauchi A, Kohroggi H, Hirashima M. Galectin-9 expands immunosuppressive macrophages to ameliorate T cell-mediated lung inflammation. *Eur J Immunol*. 査読有 40:548-558, 2010
- ② Arikawa T, Watanabe K, Seki M, Matsukawa A, Oomizu S, Sakata K, Sakata A, Ueno M, Saita N, Niki T, Yamauchi A, Hirashima M. Galectin-9 ameliorates immune complex-induced arthritis by regulating Fc $\gamma$ R expression on macrophages. 査読有 *Clin. Immunol*. 133: 382-392, 2009
- ③ Fushimi S, Ogino T, Hara J, Takahata T, Wakabayashi H, Watanabe H, Arashima Y, Kubo M, Matsukawa A. Forced expression of suppressor of cytokine signaling 3 in

T cells protects the development of concanavalin A-induced hepatitis in mice. 査読有 Clin Immunol. 133: 437-446, 2009.

- ④ Arikawa T, Matsukawa A, Watanabe K, Sakata K, Seki M, Nagayama M, Takeshita K, Ito K, Niki T, Oomizu S, Shinonaga R, Saita N, Hirashima M. Galectin-9 accelerates Transforming Growth Factor 3-induced differentiation of human mesenchymal stem cells to chondrocytes. 査読有 Bone. 44:849-857, 2009
- ⑤ Okazaki Y, Matsukawa A. Pathophysiology of sepsis and recent patents on the diagnosis, treatment and prophylaxis for sepsis. 査読有 Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov. 3: 26-32, 2009.
- ⑥ Seki M, Oomizu S, Sakata K, Sakata A, Arikawa T, Watanabe K, Ito K, Takeshita K, Niki T, Saita N, Nishi N, Yamauchi A, Katoh S, Matsukawa A, Kuchroo V, Hirashima M. Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis. 査読有 Clin. Immunol. 127: 78-88, 2008.

[学会発表] (計64件)

- ① Sun C: Spred-2 protects mice from ConA-induced liver injury 14th International congress of Immunology, August, 23-28, 2010, Kobe, Japan
- ② Cao C: Spred-2 protects mice from ConA-induced liver injury 第7回日本病理学会カンファレンス 2010年8月6-7日 岡山
- ③ 松川昭博: 炎症とサイトカインシグナル伝達 第7回日本病理学会カンファレンス 2010年8月6-7日 岡山
- ④ Matsukawa A: Spred-2, a negative regulator of MAP kinase cascade, controls inflammatory responses. 18th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2010, May

20-21, Kumamoto, Japan

- ⑤ Takahata T: Forced expression of SOCS5, but not SOCS3, in T cells prolongs the severity of murine arthritis induced by anti-type II collagen antibody. ORS 56th Annual Meeting, March, 6-9, 2010, New Orleans, Louisiana, USA.
- ⑥ 有川智博: Galectin-9 ameliorates immune complex-induced arthritis by regulating FcR expression on macrophages 第39回日本免疫学会総会 2009年12月2-3日 大阪
- ⑦ 孫翠明: Overexpression of SOCS3 in T cells reduces Th17 response in ConA-induced fulminant hepatitis in mice 第39回日本免疫学会総会 2009年12月2-3日 大阪
- ⑧ Okazaki Y: Absence of Spred-2 enhances innate immunity during septic peritonitis. The 9th World Congress on Inflammation. 2009, July 6-10, Tokyo, Japan.
- ⑨ Takahata T: Forced expression of SOCS5 in T cells prolongs the severity of murine arthritis induced by anti-type II collagen antibody. The 9th World Congress on Inflammation. 2009, July 6-10, Tokyo, Japan.
- ⑩ Fushimi S: Forced expression of suppressor of cytokine signaling 3 in T cells protects mice from concanavalin A-induced hepatitis. AAI 2009. May 9-12, 2009. Seattle, USA
- ⑪ 松川昭博: T細胞SOCS3過剰発現による敗血症免疫制御 第98回日本病理学会 2009年5月1-3日 京都
- ⑫ 小島千晶: T細胞SOCSとエンドトキシン(LPS)トレランス 第98回日本病理学会 2009年5月1-3日 京都
- ⑬ 松川昭博: 炎症とサイトカインシグナル伝達 第20回リンパ系・免疫系懇話会 2009年3月27日、岡山
- ⑭ 伏見聡一郎: Overexpression of SOCS3 in T cells reduces T-cell mediated fulminant hepatitis 第38回日本免疫学会総会 2008年12月1-3日、京都

- ⑮ 松川昭博：感染とサイトカイン・シグナル伝達ネットワーク 第56回日本ウイルス学会学術集会 教育セミナー 2008年10月26-28日：岡山
- ⑯ 高畑智宏：マウス抗II型コラーゲン抗体関節炎におけるTh1/2反応とSOCS3・SOCS5による制御 第23回日本整形外科学会基礎学術集会 2008年10月23-24日、京都
- ⑰ Takahata T: Valproic acid promotes fracture repair in a murine model. The 11th Biennial Conference of the International Society for Fracture Repair. July 13-16, 2008. Lake Tahoe, USA
- ⑱ 松川昭博：ガレクチン9は敗血症抵抗性に働く 第29回日本炎症・再生医学会 2008年7月8-10日；東京
- ⑲ 伏見聡一郎：Tリンパ球依存性ConA肝炎におけるT細胞SOCS3の役割解明 第97回日本病理学会総会 2008年5月15-17日；金沢
- ⑳ 松川昭博：炎症制御とSOCS 第97回日本病理学会総会 2008年5月15-17日；金沢
- 21 Takahata T: The role of SOCS3 and SOCS5 in a murine model of arthritis induced by anti-type II collagen antibody. The 17th International Rheumatology Symposium. Sapporo, Japan. April 20-23, 2008.
- 22 Watanabe K: Galectin-9 ameliorates the severity of antibody-induced arthritis by inhibiting C5 cleavage. The 17th International Rheumatology Symposium. Sapporo, Japan. April 20-23, 2008.
- 23 高畑智博：マウス抗II型コラーゲン関節炎におけるTh1/Th2/17反応とSOCS3・SOCS5による制御 第52回日本リウマチ学会総会学術集会 2008年4月20-22日；札幌
- 24 若林宏：Spred-2はアセトアミノフェン誘発劇症肝障害において保護的に働く 岡山免疫懇話会 2008年3月5日 岡山

〔図書〕(計5件)

- ① 松川昭博、科学評論社、Th17細胞のSOCSによる制御、臨床免疫・アレルギー科、54(3)、

418-423, 2010

- ② 松川昭博、医歯薬出版、感染とサイトカイン・サイトカイン情報伝達、医学のあゆみ 229(12). 1157-11588. 2009
- ③ 松川昭博、朝倉出版、好中球「炎症・再生医学事典」(分担) pp2-5、2009
- ④ 松川昭博、医歯薬出版、炎症「明解病理学」(分担) pp32-60、2009
- ⑤ 松川昭博、中外医学社、炎症の分子機構「図説分子病態学4版」(分担) PP. 82-87、2008

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/byouri/pathology-1/HOME.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松川 昭博 (MATSUKAWA AKIHIRO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：90264283

### (2) 研究分担者

岡崎 泰昌 (OKAZAKI YASUMASA)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：30403489  
(H20)  
飛田 陽 (HIDA AKIRA)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：10435026  
(H20)

### (3) 連携研究者

久保 雅人 (KUBO MASATO)  
独立行政法人理化学研究所・チームリーダー  
研究者番号：40277281