

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09295

研究課題名(和文)ATP蛍光イメージングによる敗血症の病態解明に関する研究

研究課題名(英文)Study on the pathophysiology of sepsis by ATP fluorescence imaging.

研究代表者

末吉 孝一郎 (SUEYOSHI, Koichiro)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：90648297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症患者16名のPBMC(末梢血単核細胞)を分離し単球、CD4+T細胞およびCD8+T細胞の細胞膜表面ATPをPMAP-1(細胞膜表面ATP特異的蛍光プローブ)を用いて染色しフローサイトメトリーにて蛍光強度を測定した。敗血症患者では健康人に比較し細胞膜表面ATPは単球、CD4+T細胞およびCD8+T細胞のいずれにおいても有意に上昇していた。単球上のHLA-DRおよびPD-L1の発現は有意に低下しており単球の抗原提示能が低下し、免疫抑制が起こっていることが示唆された。CD4+T細胞のIL-2産生能が有意に低下しており免疫抑制状態にあることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症は予後不良な病態であり、いまだその病態は明らかでないが、免疫細胞の機能低下により引き起こされる免疫抑制が主病態であると考えられている。研究代表者らは本研究に先立ち、LPSを用いた基礎実験を通して単球が細胞外に放出するATPがCD4+ T細胞の細胞膜表面のP2Y11受容体に作用し、その機能低下を惹起するというを示した。本研究では敗血症患者の血液を用いて、先行研究の結果が妥当であることを示すことができた。in vitroの結果をin vivoで証明することにより単球が放出する細胞外ATPが免疫抑制の原因であることが示唆されたため、敗血症の治療戦略のターゲットとなり得る。

研究成果の概要(英文)：PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) from 16 sepsis patients were isolated. ATP on the cell surface of monocytes, CD4+ T cells, and CD8+ T cells is stained using PMAP-1 (fluorescent chemosensor specific for ATP on the cell surface), and the fluorescence intensity was measured by flow cytometry. In sepsis patients, ATP on the plasma membrane was significantly elevated in monocytes, CD4+ T cells, and CD8+ T cells compared to healthy controls. The expression of HLA-DR and PD-L1 on monocytes was significantly decreased, suggesting that the antigen-presenting ability of monocytes was reduced and immunosuppression occurred in sepsis patients. IL-2 production by CD4+ T cells had significantly decreased, suggesting immunosuppression in sepsis patients.

研究分野：救急医学

キーワード：敗血症 アデノシン三リン酸 免疫抑制 単球 CD4陽性T細胞

1. 研究開始当初の背景

敗血症とは、感染によって惹起される全身の炎症であり、炎症性メディエーターが血中へ流れ、多臓器不全をひきおこす重篤な病態である。ワクチン、抗生剤や集中治療の進歩にも関わらず、年間約 1800 万人が発症している。また高齢化社会を反映し、この 10 年間でその入院患者は 2 倍以上になり、3 人に 1 人が命を落としている。2010 年、The global sepsis alliance は、敗血症治療が medical emergency であると警鐘をならした。我が国の第一死因である悪性新生物、昨年第三位となった肺炎も、敗血症を併発し致命的になる代表疾患である。

従来、敗血症では好中球の活性化に代表される過剰な免疫反応により臓器障害が惹起されると考えられてきた。しかしながら過剰免疫を抑制する抗炎症薬 (TNF 阻害薬など) による敗血症治療は予後を悪化させるという報告が相次ぎ、敗血症では免疫過剰と免疫抑制の両両者が混在するという概念が提唱された。

報告者らは、細胞内小器官特異的 ATP 蛍光プローブを用いた独自のイメージング法により敗血症患者の好中球 ATP の可視化に世界で初めて成功し、好中球細胞膜表面の ATP は好中球活性化のバイオマーカーとなり得ることを示した (報告者ら, *Annals of Intensive Care*, 2016)。また、単球を同プローブで染色し LPS (lipopolysaccharides) 刺激により単球から細胞外へ ATP が放出されること (報告者ら, *Crit Care Med*, 2018, *J. Biol. Chem.*, 2019) CD4 陽性 T 細胞が stromal-derived factor-1 (SDF-1) 刺激により細胞膜表面へ ATP が放出されることを示した (報告者ら, *J Clin Invest*, 2018)。加えて、単球が放出する ATP が CD4+T 細胞の P2Y11 受容体に作用し CD4+T 細胞の機能を抑制することを *in vitro* の実験で示した。報告者らはこの単球が放出する ATP が CD4+T 細胞の機能を抑制することが敗血症患者でも起こっているという仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では報告者らが確立した ATP 蛍光プローブによるイメージング法により敗血症患者の免疫状態を評価し、単球が放出する ATP が CD4+T 細胞の機能を抑制することを敗血症患者の血液を用いて評価し、敗血症における多臓器不全のメカニズムを解明することを目的とする。ひいては免疫状態をコントロールすることで多臓器不全を予防し、敗血症の治療へ繋げる。

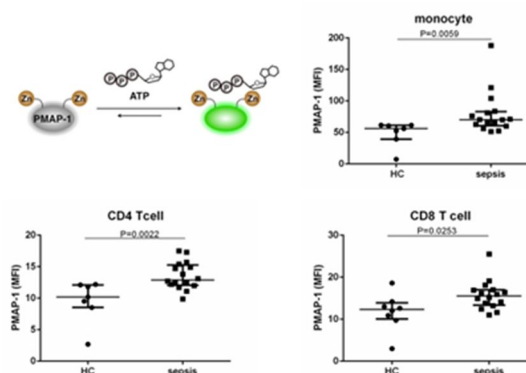
3. 研究の方法

- (1) 救命センターに入院する敗血症患者の血液を採取する。FicoII を使用し PBMC (末梢血単核細胞) を分離する。
- (2) 単球、CD4+T 細胞および CD8+T 細胞の細胞膜表面の ATP 濃度をフローサイトメトリーで測定した。
- (3) 単球、CD4+T 細胞および CD8+T 細胞のミトコンドリア機能測定のため DHR123 および TMRE を使用し、フローサイトメトリーで測定した。
- (4) 単球機能測定目的に単球上の HLA-DR 発現量をフローサイトメトリーにて測定した。
- (5) CD4+T 細胞の機能評価として培養液中の IL-2 産生量 ELISA 法で測定した。
- (6) 免疫抑制のマーカーとして単球上の PD-L1 の発現量を測定した。

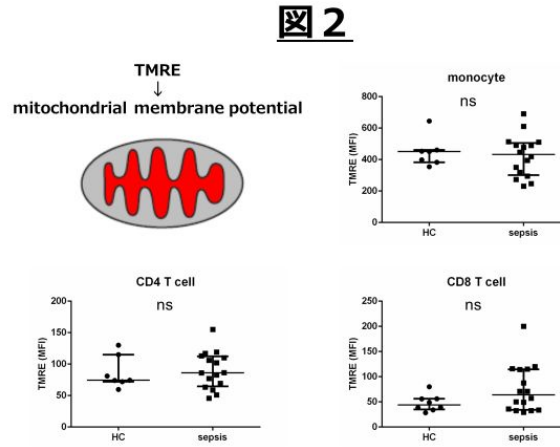
4. 研究成果

(1) 単球、CD4+T 細胞および CD8+T 細胞の細胞膜表面の ATP 濃度は敗血症患者では健康人に比較し有意に上昇していた。これは報告者らがこれまでに報告してきた単球が ATP を細胞外に放出し、それが CD4+T 細胞の機能を抑制するという *in vitro* の結果を支持する (図 1)

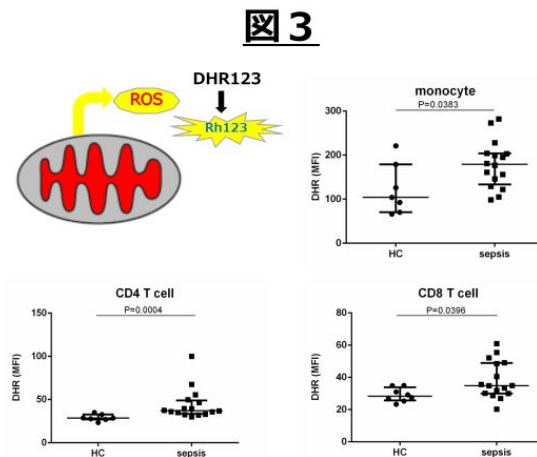
図 1



(2) ミトコンドリア機能を反映するミトコンドリア膜電位は単球、CD4+T細胞および CD8+T細胞のいずれにおいても健常人と比較し有意差を認めなかった(図2)。



(3) ミトコンドリア機能として ROS 産生能がある。DHR123 は ROS と反応し Rh123 へと変化し蛍光を発する。この蛍光強度をフローサイトメトリーで測定した。健常人と比較し敗血症患者では単球、CD4+T細胞および CD8+T細胞のいずれにおいても蛍光強度が有意に上昇していた。ミトコンドリア機能が上昇し ATP 産生が活性化し図 1 で示した細胞膜表面 ATP の上昇につながると考えられた(図3)。



(4) 敗血症における免疫抑制のマーカーとして単球上の HLA-DR の発現量(抗原提示能)を測定した。HLA-DR の発現量は健常人と比較し敗血症患者では有意に低下していることが明らかとなり、敗血症患者では抗原提示能が低下し免疫抑制状態にあることが示唆された。また単球上の PD-L1 発現量は敗血症患者において有意に上昇していた。PD-L1 は免疫抑制のマーカーであることが知られており、この結果からも敗血症患者は免疫抑制状態にあることが明らかとなった(図4)。

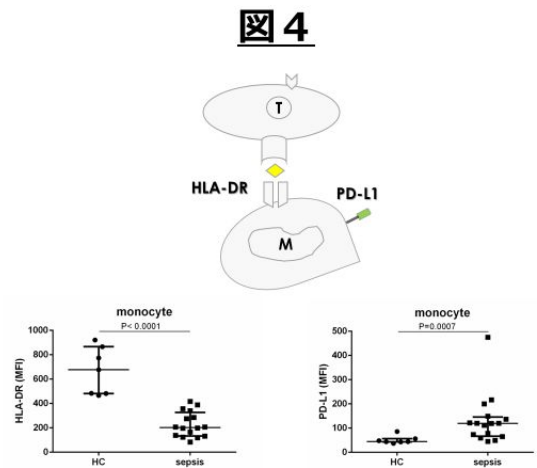
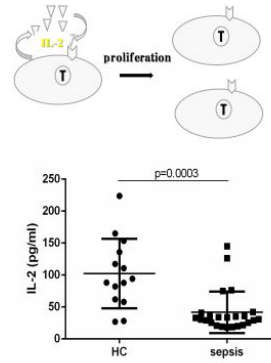


図 5

(5) CD4+T 細胞は IL-2 を産生することで分化を促進し増殖することが知られている。敗血症患者では健常人と比較し IL-2 産生能が有意に低下していることが明らかとなった。これは敗血症患者で起こる免疫抑制が CD4+T 細胞の機能が抑制されることに起因することを示唆している (図 5)。



上記より敗血症患者では単球が産生する ATP が CD4+T 細胞の機能を抑制することで免疫抑制を惹起し、病態の悪化を招き多臓器不全へと繋がる可能性が示唆された。単球が産生する ATP を抑制することで敗血症の病態を改善させる可能性示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 末吉孝一郎, 石原 唯史, 滝沢 聡, 平野 洋平, 近藤 豊, 岡本 健, 田中 裕 |
| 2. 発表標題 細胞膜表面AT Pからみた敗血症における免疫抑制のメカニズム |
| 3. 学会等名 第49回日本救急医学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Koichiro Sueyoshi, Yuki Nakamura, Yohei Hirano, Satoshi Takizawa, Yutaka Kondo, Ken Okamoto, Hiroshi Tanaka |
| 2. 発表標題 ATP RELEASE BY MONOCYTES COULD CAUSE IMMUNOSUPPRESSION IN SEPSIS PATIENTS |
| 3. 学会等名 45th Annual Conference on Shock (国際学会) |
| 4. 発表年 2022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 |
|-------|--|--------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 田中 裕 (Tanaka Hiroshi) (90252676) | 順天堂大学・大学院医学研究科・教授 (32620) | |
| 研究分担者 | 岡本 健 (Okamoto Ken) (40347076) | 順天堂大学・医学部・教授 (32620) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 | 近藤 豊 (Yutaka Kondo) (90642091) | 順天堂大学・大学院医学研究科・准教授 (32620) | |
| 研究分担者 | 平野 洋平 (Hirano Yohei) (70621895) | 順天堂大学・医学部・准教授 (32620) | |

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 |
|---------|---------|
| | |