

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591728

研究課題名（和文）敗血症によって惹起される細胞性免疫能の抑制状態の解析と治療

研究課題名（英文）The analysis and treatment of immuno-suppressive state in cellular immunity induced by sepsis

研究代表者

大田 典之 (OHTA NORIYUKI)

大阪大学 医学部附属病院 助教

研究者番号：60379162

研究成果の概要（和文）：敗血症からの回復期に粘膜免疫系で生じる免疫能の低下の病態解析を行った。マウスに実験的敗血症を誘導し回復したマウスの粘膜免疫法によって免疫を行い抗原特異的な免疫応答を解析するという手法を基本とした。敗血症を経たマウスでは粘膜免疫法に対する抗原特異的な免疫応答が細胞性免疫能の誘導の点で低下していることが組織適合抗原複合体四量体を用いた解析によって見出された。さらに PD-1, PD-L1 経路に介入して粘膜免疫能の低下の改善を試みた

研究成果の概要（英文）：We analyzed the immunosuppressive state after recovery from sepsis induced by peritonitis in mice. We mainly used experimental system analyzing antigen-specific immune-response induced by mucosal immunization method. In mice recovered from sepsis, antigen-specific immune-response was depressed in terms of cellular immunity. Furthermore, we tried the improvement of depressed immune-response by intervention into PD-1 and PD-L1 signalling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：麻酔学

科研費の分科・細目：周術期管理医学

キーワード：敗血症、免疫応答、細胞傷害性リンパ球、粘膜免疫、サイトカイン、PD-L1、コレラ毒素

1. 研究開始当初の背景

従来は敗血症における病態生理の中心は免疫の過剰な刺激状態にあると考えられてきた。その帰結として様々な炎症性メディエーターの中和療法が試みられてきた。しかしながら現在までに試みられたメディエーターの中和療法で有効であったものは見いだされなかった。このことから近年敗血症の病態

の本体は免疫刺激状態よりは、むしろ敗血症時には原因となった感染症を根治できない免疫抑制状態といった状態が重要であると考えられるようになりつつ有る。

また一方で感染症と免疫系の関係を考える時、病原体が体内に侵入して感染症を成立させるには、上気道、肺、尿路、消化管といった粘膜が最初の門戸となる。現在まで敗血

症の下での免疫抑制状態を議論する時、粘膜面での免疫系の機能に注目して解析した研究は皆無であった。

2. 研究の目的

上述した敗血症の分野での知見に鑑みて、本研究では敗血症の免疫系の抑制状態の解析を粘膜免疫系での解析を中心に据えて行うのを第一の目的とした。また免疫系の機能を論ずる時に敗血症の研究では専ら炎症性サイトカインの産生と多寡が論じられることが多かった。本研究では免疫系の最も基本的な性質の一つである、外来抗原に対して免疫を成立させる機能に注目して、敗血症における免疫機能について解析をおこなった。

3. 研究の方法

(1) マウスを対象として用いた。粘膜免疫応答を解析する基本的な実験系として、経鼻粘膜的に粘膜アジュバントであるコレラ毒素（以下 CT と略）とともにモデル抗原である鶏卵白アルブミン（以下 OVA と略）を経鼻粘膜的に投与して免疫し、成立してくる免疫応答を検出し比較するという実験系を基本の実験系とした。

(2) マウスに誘導する実験的敗血症としては敗血症の実験モデルとして最も人の敗血症のモデルとして適当であるとされる cecal ligation and puncture（以下 CLP と略する：腹膜炎によって誘導される敗血症モデル）を用いる。ここでは敗血症によって生じる免疫異常を解析することが目的であるため軽症の CLP を誘導した後、1 週間の時点で生存してきたマウスを敗血症誘導群 (CLP 群) とし、開腹のみ行い CLP を誘導しない群 (sham 群) を作成する。軽症の敗血症の誘導には CLP の誘導の際に 29G の針で虫垂を穿孔させることによって、最終的な CLP による死亡率を 30% 程度になるように設定した。

(3) 免疫応答としては液性免疫能については血清と粘膜面の分泌液中（ここでは唾液中）の免疫グロブリン (IgG, IgA) の総量と OVA に特異的な IgG, IgA を ELISA 法によって測定した。さらに細胞製免疫能の指標としては脾臓に誘導されてくる OVA に特異的に反応する細胞傷害性リンパ球を解析した。この測定のためには OVA に対する組織適合抗原複合体四量体 (テトラマー) を用いた解析法を導入した。テトラマーはその組織適合抗原複合体 (MHC) に対応する T 細胞受容体をもった T 細胞を特異的にかつ高感度に検出することを可能ならしめることが知られている。ここでは脾臓細胞中に含まれる OVA 特異的な CD8 型 T 細胞を OVA-MHC class I のテトラマーを用いることによりフローサイトメトリーによって高感度、高特異性に検出した。

(4) 個体レベルでの免疫応答を評価するために OVA を腫瘍抗原として発現する腫瘍細胞である E. G7 細胞の接種に対する防御アッセイを応用した。EG7 腫瘍細胞は元の細胞は EL4 というリンパ腫由来の腫瘍細胞であるがこの細胞に OVA を発現するように遺伝子操作を加えた細胞であり、OVA は腫瘍上すなわち OVA に対する特異的な免疫応答が免疫法によって成立していれば EG7 腫瘍細胞を接種しても腫瘍細胞は排除されマウスは生存する。

(5) EG7 腫瘍細胞に対する細胞傷害性 T 細胞の誘導が起こっているかを検出比較した。この目的でマウスから脾細胞を調整し OVA の存在下で培養し刺激し細胞傷害性 T 細胞活性を誘導する。OVA 特異的な細胞傷害性 T 細胞を誘導しておいた脾細胞を EG7 腫瘍細胞と培養し EG7 腫瘍細胞に対する傷害性を測定して比較した。細胞傷害性は EG7 が傷害され破壊されることで EG7 腫瘍細胞から放出される乳酸脱水素酵素 (LDH) の活性の定量によって解析した。

(6) リンパ球上の PD-1 と抗原提示細胞側の PD-L1 の相互作用によってリンパ球の機能が抑制されると考えられている。敗血症の時の免疫系の免疫抑制状態の発生にリンパ球の抑制機能が亢進するという報告がある。その一つが敗血症の時にリンパ球と抗原提示細胞の間の PD-1 と PD-L1 を介した相互作用が促進していることを示唆する報告である。そこで本研究の最後に、敗血症時に PD-1 と PD-L1 のシグナルに介入して、敗血症時の粘膜免疫応答を改善する試みを行う。この目的で PD-L1 に対する中和抗体を投与することで低下しているリンパ球機能を回復させる試みをおこなう。敗血症を導入するマウスにコントロール抗体か PD-L1 に対する中和抗体を投与する。これら 2 群のマウスに対して、今までの実験と同様に OVA と CT を用いた経粘膜免疫法を施行し成立してくる OVA 特異的な T 細胞の頻度を MHC のテトラマーを用いた解析によって比較する。また上述と同様に EG7 腫瘍細胞の接種アッセイによって生体防御への影響を回復できるのかを解析評価する

4. 研究成果

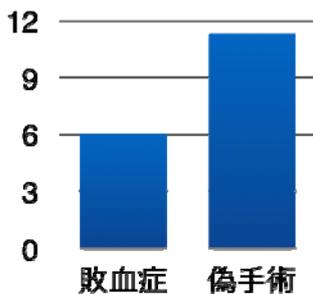
(1) マウスにコレラ毒素とモデル抗原である OVA を経鼻粘膜的に 2 回投与する免疫法によってマウスには免疫が成立することを確認した。2 回免疫した後 1 週間後に血清中に OVA 特異的な免疫グロブリンの上昇が検出できた。また脾臓に OVA-MHC テトラマーに反応する OVA 特異的な T 細胞の誘導を確認することができた。

(2)CLP の誘導の際に虫垂を穿孔し作成する穴の大きさによってCLPの重症度をコントロールすることができることが知られている。本研究では29G針をもちいて穿孔させることにより、最終的な敗血症の死亡率を設定することができた。またこの軽症のCLPモデルはCLP導入後に最終的には70%のマウスが死亡せず敗血症から回復してくる。敗血症を誘導した後10日後の敗血症からの回復したマウスを敗血症を経た群として実験に用いることとする。対照群としては開腹のみを行いすぐに閉腹した偽手術群を対照群として設定した。

(3)液性免疫能に対する影響。敗血症をへたマウスでは血清中、粘膜分泌液中に含まれる総イムノグロブリン量 IgA, IgG の上昇を認めた。また一方で経粘膜免疫法によって誘導される抗原特異的なイムノグロブリンであるOVAに特異的なIgG, IgAも敗血症を経たマウスでも変化が無かった。

(4)細胞性免疫能に対する影響。敗血症を経たマウスでは経粘膜的免疫法によってリンパ組織に誘導されてくるOVAに対する組織適合抗原複合体四量体によって検出されるOVA特異的なT細胞は減少した。

(図1) 敗血症が抗原特異的T細胞の誘導に及ぼす影響
縦軸は 1×10^6 個/脾臓内。
敗血症群 vs 偽手術群 $p < 0.05$

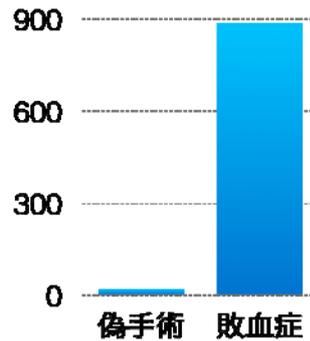


(5)以上の(3), (4)より敗血症を経たマウスでは粘膜免疫法に対する免疫応答が低下している、なかでも細胞性免疫能の低下が起きていることが見出された(図1)

(6)OVAを腫瘍抗原として発現する腫瘍細胞であるEG7を用いた腫瘍の防御実験をおこなった。まず偽手術群でOVAによる経鼻粘膜的免疫法を施行したマウス群ではEG7腫瘍細胞を接種しても、腫瘍細胞は増大すること無く腫瘍細胞は排除された。マウスの最終的な

死亡率は25%であった。一方で敗血症をへたマウス群ではマウスに接種された腫瘍細胞は時間経過と共に増大した。EG7を接種して1週間後の腫瘍細胞の大きさでは偽手術群に対して敗血症を経た群では有意な増大が認められた。マウスの死亡率も敗血症を経た群では偽手術群と比較して死亡率は有意に上昇した。(図2)

(図2) 敗血症がEG7腫瘍細胞の接種アッセイに対して与える影響。縦軸は腫瘍体積(mm³)
敗血症群 vs 偽手術群 $p < 0.05$



(7)脾臓に検出されるEG7細胞に対する細胞傷害性リンパ球の量の比較を行った。敗血症を経たマウスでは、偽手術群に比較して敗血症を経た群では、OVAを腫瘍抗原として発現するEG7に対する細胞傷害性リンパ球の頻度は低下していた。

(8) (6), (7)から敗血症によって低下している、免疫法に対する抗原特異的な免疫応答の成立が、生体防御を悪化させることを動物のモデルによって示すことが出来た。ここではモデル抗原としてOVAを用いたがこれが実際の臨床現場の場合で細菌毒素や病原体の病原因子をモデル抗原と置き換えて考えた場合、敗血症のもとではこれら毒素や病原因子に対する免疫が低下し感染防御能が低下するという状況がありうると理解できる

(9) 敗血症を経たマウスにPD-1, PD-L1を介するシグナルを阻害することによる免疫抑制状態を改善する試み。PD-L1に対する抗体(クローン番号9G2)に対する中和抗体を投与し敗血症を導入した群と、アイソタイプコントロールを投与し敗血症を導入した群との間で、実験に最適な死亡率の設定を行っているところである。

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 4 件)

1. Yoshida T, Uchiyama A, Matsuura N, Mashimo T, Fujino Y.

The comparison of spontaneous breathing and muscle paralysis in two different severities of experimental lung injury. Crit Care Med. 査読有り 2013 Feb;41(2):536-45.

2. Yoshida T, Uchiyama A, Matsuura N, Mashimo T, Fujino Y.

Spontaneous breathing during lung-protective ventilation in an experimental acute lung injury model: high transpulmonary pressure associated with strong spontaneous breathing effort may worsen lung injury. Crit Care Med. 査読有り 2012 May;40(5):1578-85.

3. Ohta N, Ohashi Y, Takayama C, Mashimo T, Fujino Y.

Midazolam suppresses maturation of murine dendritic cells and priming of lipopolysaccharide-induced t helper 1-type immune response. Anesthesiology. 査読有り 2011 Feb;114(2):355-62.

4. Yoshida T, Uchiyama A, Mashimo T, Fujino Y.

The effect of ventilator performance on airway pressure release ventilation: a model lung study. Anesth Analg. 査読有り 2011 Sep;113(3):529-33

[学会発表] (計 6 件)

1. 大田典之
ミダゾラムは自己非自己の認識能を低下させる
第 60 回日本麻酔科学会学術集会
201, 5, 23 札幌

2. 大田典之
ミダゾラムは樹状細胞による抗原特異的な免疫応答を抑制する
第 40 回日本集中治療医学会総会
2013, 3, 2 松本

3. 大田典之
プロポフォールは樹状細胞によって誘導される Th1 型免疫応答を促進する
第 59 回日本麻酔科学会学術集会
2012, 6, 8 神戸

4. 大田典之
敗血症は粘膜免疫応答を低下させる
第 39 回日本集中治療医学会総会
2012, 3, 1, 千葉

5. 大田典之
樹状細胞の機能に対する鎮静薬の機能の多様性
第 38 回日本集中治療医学会総会
2011, 2, 26, 横浜

6. 大田典之
ミダゾラムは樹状細胞によって惹起される Th1 型の免疫応答を抑制する
第 57 回日本麻酔科学会学術集会
2010, 6, 3, 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大田 典之 (OHTA NORIYUKI)

大阪大学 医学部附属病院 助教

研究者番号: 20276710

(2) 研究分担者

藤野 裕士 (FUJINO YUJI)

大阪大学大学院 医学系研究科

教授

研究者番号: 50252672

後藤 幸子 (GOTO YUKIKO)

大阪大学大学院 医学系研究科

助教

研究者番号: 20276710