

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 9 日現在

機関番号：10101
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23792069
 研究課題名（和文） 全身性炎症反応症候群 SIRS における制御性 T 細胞 Treg の検討
 研究課題名（英文） An investigation of regulatory T cell (Treg) in systemic inflammatory response syndrome
 研究代表者
 久保田 信彦（KUBOTA NOBUHIKO）
 北海道大学・北海道大学病院・助教
 研究者番号：00399875

研究成果の概要（和文）：

※全身性炎症反応症候群 systemic inflammatory response syndrome (SIRS) は、1992 年米国集中治療学会主導のもとに提唱された概念であり、外傷、敗血症、熱傷等の重症疾患によって惹起される急性炎症反応である。体温の上昇、心拍数増加、呼吸数増加、白血球上昇を診断項目とする。

その本質は免疫細胞から発せられる大量の炎症性サイトカインによって生じるとされる。今回我々はその炎症反応または免疫反応を抑えるとされる制御性 T 細胞 Treg について検討した。

結果、集中治療室に入る重症患者においては、この Treg が上昇していた、つまり免疫抑制されているとされる患者では感染症の発症リスクが高いことがわかった。

以上からこの Treg を評価または制御することで感染症治療に大きな福音がもたらされるかもしれないことがわかった。

研究成果の概要（英文）：

※The idea of systemic inflammatory response syndrome (SIRS) is proposed by the society of critical care medicine in 1992. SIRS is an acute inflammatory response caused by serious disease like trauma, sepsis and burn. Hyperthermia, tachycardia, tachypnea and increased leucocyte are observed in SIRS.

It is known that massive quantity cytokine induced from immune cell causes SIRS. We investigated the function of regulatory T cell (Treg) which suppresses immunological response.

We found that the number of Treg was increased in critically-ill patients which is especially sensitive to infection.

Therefore, it might be that the evaluation and regulation of Treg result in a key to a better treatment of sepsis and infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,100,000	630,000	2,730,000

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：細胞性免疫、制御性 T 細胞、多臓器不全

1. 研究開始当初の背景

北海道大学病院自主臨床研究(臨床研究番号:自 010-0184、課題名:全身性炎症反応症候群における制御性 T 細胞の検討)として前向き観察研究を施行している。

Foxp3+SD+CD25+ regulatory T 細胞 (Treg) は、自己免疫応答を抑制する T 細胞サブセットとして知られており、自己免疫疾患、悪性腫瘍、移植免疫そして感染症の制御において重要な役割を担っている。胸腺から誘導される Treg は Th1/2 応答を抑制する。Treg 上には Toll-like receptor (TLR) が発現しており、ウイルスや細菌の構成成分

pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) が Treg 上の TLR を刺激すると、その数のみならず、Treg の免疫抑制能をも制御、変化させることが既に明らかになっている。また一方、antigen presenting cell (APC) の一つである樹状細胞上の TLR を介しても Treg は制御されており、例えば TLR 刺激により Treg は増加し、その抑制能は低下する。本研究者は、合成 TLR3 アゴニストである PolyI:C を用いた実験により、TLR 刺激が Treg を増加させ、かつその作用は樹状細胞から産生される IL-6 により正に制御され、逆に IFN- α により負に制御されることを明らかにしている。しかし、現在のところ、上のように TLR 刺激が Treg を制御することについては、生体、特にヒトにおいてどういう意義をもっているかは明らかになっていない。一方、敗血症は、感染症に起因する全身性炎症反応症候群 SIRS: Systemic Inflammatory Response Syndrome であるが、その死亡率は依然高い。2004 年ならびに 2008 年に相次いで敗血症治療のガイドラインが米国集中治療学会から提出された。しかし、その中で推奨される治療としては、適切な抗菌薬治療投与、輸血昇圧薬投与、血糖コントロールといった supportive care に終始している。主たる感染症、敗血症では、グラム陰性桿菌、グラム陽性球菌が起因菌となることが多く、それぞれ TLR4、TLR2 を強く刺激することで、IL-6 や TNF- α といった炎症性サイトカインが放出され、全身性炎症半央症候群 SIRS の病態を形成している。したがって、生体内では drastic な免疫応答が生じているはずであるが、その推移を病態と共に評価したり、予後との関連を前向きに検討している研究は数少ない。感染症や敗血症において TLR が強

く刺激されるのは上記の通りであるが、虚血再灌流障害(心肺停止等)や外傷症例においても TLR が刺激されるであろうことは既に指摘されているところである。例えば、high-mobility group protein B1 (HMGB-1) は外傷による組織損傷や虚血再灌流の再血中に遊離される致死的蛋白質であるが、その受容体は TLR4 である。

そこで、すでに我々が確立しているマウス実験系を用い、TRL 刺激が Treg をどのように増加するかをマウスリンパ節中のリンパ球をフローサイメトリーによって CD4+CD25+/CD4+ 比較を測定する。さらに CD4+CD25+MACS システムにより Treg をソーティングし、effect T cell に対する抑制能を 3H を用いた Proliferation assay により評価する。Treg の動向を把握することが出来た後、ソーティングした Treg をマウス SIRS モデルに extrinsic に投与することにより SIRS の病態が改善するのかどうかを検索する。SIRS 患者において Treg が増加しているのか、減少しているのかを、患者末梢血中の CD4+CD25+細胞をフローサイメトリーによって評価する。それを死亡患者群/非死亡患者群間で有意差があるかを統計学的に検討する。また、集中治療室退出日数、SOFA(患者重症度)との回帰分析を行う。

マウス実験系によりある程度の知見を得られた後、ヒトにおける実験系へと移行する。

平成 22 年 11 月 25 日~平成 25 年 3 月 31 日を実施期間とした。

2. 研究の目的

敗血症や外傷、心肺停止症例といった全身性炎症反応症候群 SIRS における Treg の動向を検討し、SIRS の治療に免疫制御療法を導入することへの可能性を探る。

(1) Foxp3+SD+CD25+ regulatory T 細胞 (Treg) が、敗血症や外傷のような全身性炎症反応症候群 SIRS: Systemic Inflammatory Response Syndrome の病態において、どのような役割を果たしているかは明らかになっていない。

(2) 同疾患群における Treg の増減と機能を、in vitro ならびに in vivo の両面から検索する。

(3) Treg を制御することについては細胞性免疫を制御することが、新しい SIRS 治療戦略になりうる。

3. 研究の方法

【対象患者および適格性の基準】

北海道大学病院先進急性期医療センターまたは救急科に入院中の敗血症、外傷、心肺停止患者を対象とする。

- (1) 同意取得時において年齢が20歳以上の患者
- (2) 全身性炎症反応症候群 SIRS 基準(基準については略)を満たす患者
- (3) 本研究の参加にあたり十分な説明を受けた後、十分な理解の上、患者本人または代諾者の自由意思による文書同意が得られた患者

【評価項目(エンドポイント)】

主要評価項目は CD4+CD25+細胞数とする。副次的評価項目として免疫活性度検査 (ImmuKnow 試薬による)、28日後死亡率、28日後集中治療室退室率、患者重症度(SOFAスコア、APACHE-IIスコア)。

4. 研究成果

Immune Cell Function Assay は、PHA で刺激した際に放出される ATP を測定することで、CD4+ T cell-細胞性免疫を評価できる。我々は、重症患者に対して同 Assay を行い、MODS, DIC, 感染症との関連を検討した。当院集中治療室に入室した重症患者 18 症例に対し 27 回の Immune Cell Function Assay (ImmuKnow[®])を行った。4 症例に対しては複数回 Assay を施行した。14 回の Assay は入室 5 日以内に施行した。Treg についても検討した。平均年齢は 63.3±17.1 才、APACHEII スコアは 22.6±9.4、測定時の SIRS スコアは 2.5±1.1 であった。長期入院した 1 症例で細胞性免疫の低下に随伴して感染症を繰り返した。細胞性免疫能と APACHEII スコア、CRP, SIRS スコアに関連はなかった。MODS, DIC では細胞性免疫能が強かった。1 週間以内に新たに感染症を発症した症例では細胞性免疫能が低下していた。

以上から、Immune Cell Function Assay により感染症を前向きに予測できるであろうことがわかった。また、MODS, DIC は細胞性免疫能亢進と関連しているかもしれないことも明らかになった。

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 2 件)

1. Hayakawa M, Asahara T, Henzan N, Murakami H, Yamamoto H, Mukai N, Minami Y, Sugano, M, Kubota N, Uegaki S, Kamoshida H, Sawamura A, Nomoto K, Gando S, Dramatic changes of the gut flora immediately after severe and sudden insults.
査読有
Digestive Diseases and Sciences
2012 56 巻 最初と最後の頁 2361-2365
10.1007/s10620-011-1649-3.
2. Murakami H, Gando S, Hayakawa M, Sawamura A, Sugano M, Kubota N, Uegaki S, Jesmin S. Disseminated intravascular coagulation (DIC) at an early phase of trauma continuously proceeds to DIC at a late phase of trauma.
査読有
Clinical and Applied Thrombosis / Hemostasis
2012 18 巻 最初と最後の頁 364-369
10.1177/1076029611426138.

[学会発表] (計 4 件)

1. 久保田 信彦、本間 慶憲、山本 浩、本間 多恵子、柳田 雄一郎、上垣 慎二、早川 峰司、澤村 淳、丸藤 哲
重症患者における生体反応としての細胞性免疫能
第 40 回日本救急医学会総会・学術集会
2012 年 11 月 13 日～2012 年 11 月 15 日、
国立京都国際会館 (京都)
2. Wada T, Gando S, Yanagida Y, Uegaki S, Kubota N, Hayakawa M, Sawamura A, Jesmin S.
Elastase-mediated fibrinolysis in disseminated intravascular coagulation (DIC) associated with sepsis.
22nd International Congress on Thrombosis, October 09, 2012 - October 06, 2012, Nice Congress Center (France)
3. 久保田 信彦、東山 明日美、本間 慶憲、山本 浩、向井 信貴、本間 多恵子、菅野 正寛、上垣 慎二、早川 峰司、澤村 淳、丸藤 哲：肝損傷後肝不全から免疫不全をきたした 1 症例—Treg 測定と Immune

Cell Function Assay による免疫活性評価—
第 39 回日本集中治療医学会
2012 年 2 月 28 日～2012 年 3 月 1 日、幕
張メッセ（千葉県）

4. 東山 明日美
肝損傷後生じた肝不全による免疫不全
の 1 例[~]
日本集中治療医学会第 20 回北海道地方
会
2011 年 10 月 8 日、北海道大学（札幌）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保田 信彦 (KUBOTA NOBUHIKO)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：00399875

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし