

## 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 15 日現在

機関番号：32612  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23792085  
 研究課題名(和文) 外科的侵襲後の敗血症性急性肺損傷モデルにおける HMGB1 の動態と治療法の開発  
 研究課題名(英文) Detection of the role of High Mobility Group Box-1 and development the treatment on septic lung injury mice after surgical invasion.  
 研究代表者  
 安倍 晋也 (ABE SHINYA)  
 慶應義塾大学・医学部・助教  
 研究者番号：20383896

## 研究成果の概要(和文)：

体表面積の 15% にⅢ度熱傷を加えた熱傷マウスに熱傷後 11 日目に CD3 刺激ないしは LPS 刺激を加える two hit model 法において、CD3 刺激を加えた腸管内のリンパ球系細胞に関する解析結果では、熱傷後 11 日目のマウスの腸管で Th17 細胞の占める割合が増加していた。特に LPS 刺激を行ったマウスでは有意に増加していた。しかし腸管内における HMGB-1 と Th17 細胞との関連性を明らかにし、治療法を開発するまでには至らなかった。

## 研究成果の概要(英文)：

In two hit model: 15% body surface area 3rd degree burn injured mice and added CD3 stimulation or LPS stimulation 11days after burn injury, Th17 cell increased in mice intestine on 11days after burn injury, by the analysis about intestinal lymphoid cell after CD3 stimulation. Especially in mice after LPS stimulation Th17 cell increased strongly. But we could not achieve to detect relationship between HMGB-1 and Th17 cell and develop treatment in mice intestine.

## 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	3,100,000	930,000	4,030,000

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：①HMGB-1 ②two hit model ③サイトカイン ④敗血症性ショック  
 ⑤burn injury

1. 研究開始当初の背景  
 敗血症・敗血症性ショックや急性肺損傷などに二次的に移行しやすい重症熱傷・多発外傷・出血性ショックは致命的病態であり今日もなお治療に苦慮することが多い

これらの傷病者は、感染症を契機として、急性肺損傷 (acute lung injury: ALI) から

多臓器不全を合併しやすい。このような重度侵襲下に発症する臓器不全のメカニズムを解明するために、当教室では熱傷の一次侵襲後に、エンドトキシンによる感染性二次刺激を負荷する 2 段階刺激 (two-hit) 動物モデルを開発し、その病態解析を行ってきた。この two-hit モデルの解析によれば、熱傷侵襲

後のマウスに lipopolysaccharide (LPS) を投与すると、肺内の過剰な炎症性サイトカイン産生による致死性 ALI と多臓器不全が惹起される。この外科的侵襲後の ALI 発症には、LPS に対する熱傷マウスの過剰反応性が関与しており、LPS による炎症性サイトカインの産生亢進がその原因と考えられる。一方で、熱傷や外傷の生体侵襲が、サイトカイン産生を司る免疫細胞、特に T リンパ球への変化をもたらすことが多数報告されており、IL-18 をはじめとした Th1 型サイトカインの産生低下や、それに伴う Th2 型反応の相対的亢進が、熱傷・外傷後の易感染性に関連すると考えられている。

近年 T リンパ球に IL-17A を産生する Th17 細胞という新たなサブタイプが同定された。この Th17 細胞は、炎症、アレルギー反応に深く関わっており、感染に対する生体防御にも重要な役割を果たしていることが示されている。特に炎症性腸疾患や自己免疫疾患においては、臨床的にもサイトカイン阻害剤による治療とともに、Th1/Th2./Th17 細胞の関与と役割の解明が進んでいる分野である。重度侵襲下の臓器不全発症においても、熱傷や外傷などの一次侵襲に続く腸管虚血が重要な役割を果たすことが報告されたが、腸管における免疫応答は未だ不明な点が多数残されており、高サイトカイン血症や臓器不全の進展と密接に関与する LPS に対する熱傷マウスの過剰反応性が、どのようなメカニズムで生じるのか、また腸管がどのような役割を果たしているのかは、未だ十分に解明されていない。

## 2. 研究の目的

敗血症・敗血症性ショックや急性肺損傷などに二次的に移行しやすい重症熱傷・多発外傷・出血性ショックといった致死性状況にある患者の治療に役立つため、我々の開発した

熱傷とエンドトキシンの2段階刺激モデルを用いて HMGB-1 が熱傷後の腸管で過剰に発現し、本モデルにおいて致死性病態に対し重要な役割を持つことに続いて、本課題では腸管内における HMGB-1 と Th17 細胞との関連性を明らかにすることを目的としている

## 3. 研究の方法

### 熱傷モデルの作成

熱傷モデルの作成はこれまでに当教室で確立した方法に従った。略説すると、熱傷作成の背部から除毛した 7 週齢の雄性 Balb/c マウスに対して、エーテル麻酔下に背部への 5 秒間の蒸気暴露を行い、体表面積の 15% にⅢ度熱傷を作成した。熱傷作成後は速やかに生食 4mL を腹腔内に投与し、飼育舎で経過観察とした。シャムマウスには、熱傷作成以外の処置をすべて行った。

### 腸管内サイトカインの解析

熱傷マウスおよびシャムマウスに対して、熱傷作成 11 日後に 3mg/kg LPS を尾静脈から静脈内投与し、12 時間後に全小腸を摘出した。摘出した腸管は速やかに  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存とした。後日、回腸を 5000 倍量の PBS ( $\mu\text{L}$ ) で組織液とし、上清を遠心分離により抽出し、サイトカイン測定まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存とした。

### マウス回腸からの腸管粘膜固有層単核球の単離とサイトカイン産生能の解析

熱傷マウスおよびシャムマウスから熱傷作成 11 日後に全回腸を摘出し、腸管から酵素法により粘膜固有層単核球を単離した。単離された単核球は 1% FBS 含有 RPMI で浮遊液とし、試験管内で  $1 \times 10^6$  細胞/mL に調整後、LPS  $1 \mu\text{g/mL}$  または CD3 抗体  $1 \mu\text{g/mL}$  とともに  $37^{\circ}\text{C}$ 、10%  $\text{CO}_2$  下にインキュベートした。24

時間後に浮遊液を回収し、上清を遠心分離により抽出し、サイトカイン測定まで $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存とした。

#### サイトカイン定量

組織液および細胞浮遊液上清中のサイトカイン定量には Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD biosciences, Tokyo, Japan)を用い、IL-2, IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17A, IL-10 の7種類のサイトカインを測定した。

#### 4. 研究成果

回腸におけるサイトカイン値の変化を見ると、シャムマウスと比較して熱傷マウスではLPS投与後に抗炎症性サイトカインであるIL-10値の増加が見られず、Th1型サイトカインであるIFN- $\gamma$ 値の増加が抑制されなかった。つまり、熱傷マウスの回腸では、LPS投与によるTh1型優位の反応が認められたことになる。これまでの熱傷研究では、末梢血単核球や脾細胞からのTh1型サイトカイン産生は熱傷後に著明に抑制され、むしろTh2型反応が相対的に優位になると報告されている。我々の報告でも、熱傷によって脾細胞におけるリンパ球系のサイトカイン産生能は全般的に著明に抑制されていた。ところが驚くべきことに、本研究における熱傷マウスの回腸内サイトカイン動態からは反対の事象が観察された。以上から、本研究で認められた熱傷マウスの回腸におけるTh1型優位の生体反応は、LPSに対する過剰反応や高サイトカイン血症の原因の一つである可能性が示唆された。さらに回腸内におけるサイトカイン産生能を評価するために、回腸から粘膜固有層単核球を抽出し、CD3またはLPS刺激によるサイトカインの産生量を解析した。予想に反して、粘膜固有層単核球におけるLPS刺

激によるTh1型あるいは炎症性サイトカインの産生は、熱傷の前負荷による増加は認められなかった。しかしながら、CD3によるTリンパ球刺激で生じたサイトカイン産生量を見ると、熱傷を前負荷によってIL-17AやIL-10の産生は亢進することが見出された。近年、IL-17Aを産生する主なリンパ球として、Th17細胞が同定されており、熱傷によってTh17細胞か、またはTh17細胞以外のIL-17A産生細胞(CD8 T細胞、gd T細胞など)が回腸粘膜内に分化・誘導されることが示唆された。また同時に、熱傷によりIL-10産生の有意な増加が認められることから、熱傷後の回腸粘膜内ではTh2型Tリンパ球の反応性が高まっていることが示された。本研究結果からは、熱傷マウスの回腸におけるTh1型優位の生体反応を説明することはできないが、粘膜固有層リンパ球の機能的変化がそのメカニズムに関与していると考えられる。本研究結果により、熱傷マウスにおけるLPSへの過剰反応性や高サイトカイン血症の原因の一つとして、腸管における免疫反応の特異性が示された。

CD3刺激によるサイトカイン量は主にリンパ球系のサイトカイン産生能を、LPS刺激は主に単核球系のサイトカイン産生能を反映すると考えられる。CD3刺激によるTNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-17産生能を亢進させた腸管内のリンパ球系細胞に関する解析結果では、熱傷後11日目のマウスの腸管で、IL-17陽性細胞中のTh17細胞

(IL-17陽性、CD4陽性細胞)の占める割合が増加していた。特に、LPS刺激を行ったマウスでは有意に増加していた。前課題でHMGB-1が熱傷後の腸管で過剰に発現し、本モデルにおけるHMGB1の重要性を示したが、今回は腸管内におけるHMGB-1とTh17細胞との関連性を明らかにし、そのメカニズムに基づき治療的介入を行い、その効果を確認、メカニズムを解明

するまでには至らなかった。

さらなる研究の追加によりそれらを解明し、敗血症・敗血症性ショックや急性肺損傷などに2次的に移行しやすい重症熱傷・多発外傷・出血性ショックといった致命的病態の治療に役立てたい。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

安倍 晋也 (ABE SHINYA)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20383896