

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861522

研究課題名(和文) 自然免疫・獲得免疫バランスからみた外傷患者における免疫応答制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of immune response to trauma - from the view of the balance between innate and adoptive immune system -

研究代表者

大須賀 章倫 (Osuka, Akinori)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任研究員

研究者番号：60552081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：広範囲熱傷受傷後にはパターン認識受容体の一つであるインフラマソームが活性化し、炎症を起こすと同時に、制御性T細胞の活性化が起こり免疫の抑制を開始する。これらは炎症性のサイトカインであるIL-6および抗炎症性のサイトカインであるIL-10が放出されことから支持された。インフラマソームの活性化および制御性T細胞の活性化の機序には自らの細胞が崩壊したときに出る物質であるHMGB-1など増加が関与している可能性がありそうである。現在のところこれらの活性化が生命予後並びに臓器不全に与える影響に関して有意な結果を得るには至っていない。

研究成果の概要(英文)：Inflammasome, one of the pattern recognition receptors which activate inflammatory cascade, and regulatory T cells which activate anti-inflammatory cascade, were activated following severe burn injury. The cytokine profiling was also supported their activations. Damage associated molecular pattern molecules might be associated with the activation of the inflammasome and regulatory T cells. So far, we could not conclude that the activation of inflammasome or regulatory T cells cause death or organ failure.

研究分野：外傷 免疫

キーワード：外傷 免疫 熱傷 インフラマソーム 制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

外傷は、わが国における 5 歳から 39 歳までの死亡原因の 1 位に挙げられる。急性期を乗り越えた患者の死亡原因のほとんどは、感染性合併症からの多臓器不全である。重症外傷患者では、複雑な生体反応が引き起こされ、免疫系の恒常性が破綻し、これらの合併症を引き起こす。一連の免疫反応は、内因性のシグナルである alarmin と外因性のシグナルである PAMPs の両者から構成される、DAMPs がトリガーとなっていると考えられている。近年我々は、外傷によりパターン認識受容体の一つとして重要視されているインフラマソームが全身のほぼすべての免疫細胞において活性化することを、マウスモデルを用いて世界で初めて報告した(Osuka A, et al. Shock. 2012; 37(1): 47-55)。インフラマソームは尿酸により活性化し痛風を起こすことが知られていたが、近年研究が進み、高血糖、UV-B、ATP などにより活性化することが解明され、主に慢性炎症疾患の治療ターゲットとして着目されている。しかし我々は、インフラマソームの活性を抑制することで外傷後の死亡率が著明に増加することも示し、インフラマソームの活性化による自然免疫能が生体防御的役割を担うことを見出した。インフラマソームは pro-IL-1 β を IL-1 β に変換するカスパーゼ-1 を遊離することから、外傷後に熱発しない患者の予後が悪いこととも関連性が示唆される。また、外傷後には自然免疫系により増強された炎症反応が抗菌能力を増強させるとともに、有害な”two-hit response”を形成し、同時に制御性 T 細胞を活性化することで、過剰に起きた炎症反応をコントロールしていることが動物モデルにおいて示されてきている。熱傷モデルマウスの腹腔内に生きた大腸菌を投与した

ところ、熱傷を受傷していないコントロール群に比して明らかに生存率は高かった。この結果は他の研究グループによっても大腿骨骨折モデル、出血性ショックモデルなどで追試されてきており、外傷は自然免疫系の反応性を増強させることにより、基本的には生体の免疫能を増強させていると考えられる。しかしながら TLR 4 を刺激する lipopolysaccharide (LPS)を投与したところ死亡率は著明に増加した。これが”two-hit response”である。CD4 T 細胞、CD8 T 細胞をもたないマウス、および CD4 T 細胞を持たないマウスでは LPS の刺激により ”two-hit response”を引き起こしたが、CD8 T 細胞のみを持たないマウスでこの現象は見られなかった。この結果から、CD4 T 細胞が”two-hit response”を制御している可能性が示唆され、さらに CD4 T 細胞の中でも免疫寛容の中心をなす制御性 T 細胞のみを除去したマウスを用いた実験により制御性 T 細胞が”two-hit response”を制御していることが示された。さらに制御性 T 細胞の活性化は外傷後受傷後 1 時間以内に細胞内において開始されていることを報告した。これらの研究から、外傷そのものがインフラマソーム、TLRs、制御性 T 細胞を受傷直後より活性化させ、炎症性の免疫反応である自然免疫系のインフラマソームや TLRs の活性化によって免疫能を強化するとともに、抗炎症性の免疫反応である獲得免疫系の制御性 T 細胞が活性化し、この炎症反応をコントロールしているという考えに至った。しかしながら外傷によるインフラマソームや制御性 T 細胞の活性がどの alarmin によって惹起されているのかは解明されておらず、制御性 T 細胞の活性による抗炎症性の反応が易感染性と関与しているかどうか未解決である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、重症外傷患者の免疫応答を自然免疫・獲得免疫バランスの観点から解明し、新しい治療戦略の可能性を見出すことである。そのために以下の2点に焦点を絞り、臨床研究を進めた。重症外傷患者において、自然免疫系の指標としてインフラマソーム活性、獲得免疫系の指標として制御性T細胞活性を経時的に評価し、両者のバランスと重症化との関連を明らかにする。血中alarmins(遊離DNA, RNA, ミトコンドリアDNA, HMGB-1, HSP等)を経時的に評価し、インフラマソームおよび制御性T細胞の活性バランスとの関連性を明らかにすることである。

3. 研究の方法

社会保険中京病院に搬入された熱傷面積20%以上の症例を対象とし、受傷日、受傷後1日目、3-5日目、5-10日目、7日目、14日目頃、30日目頃を測定日とした。実際の患者では集中治療や手術が行われるため、抗菌薬の投与、全身状態指標としてのバイタルサイン、手術の時期、各種血液検査(Hg, WBC, Plt, BUN/Cr, AST/ALT, PT%, Lactate)を記録する。また一般採血において検査可能である尿酸と血糖はそれぞれがalarminとして機能することが知られているため、同時に測定を行う。主治医の判断に基づいて血液培養、創培養を行い、その結果を記録する。残存検体を大阪大学に郵送する。インフラマソームの活性は検体を放置すると経時的に変化するため、中京病院内において固定までを済ませておく。-20℃で保管、大阪大学に郵送して蛍光抗体を用い測定を行った。同時に制御性T細胞の活性化は制御性T細胞数とCD4T細胞との割合

をFoxP3フローサイトメトリで測定した。また血清を用いてエンドトキシン、HMGB-1、HistoneH3、各種サイトカインの測定も行った。

4. 研究成果

現在までに26例が登録されている。死亡例は4例であった(表1)。

表1 患者背景

	n = 26
年齢 (歳)	47 [29.5 - 71]
性別, n, (男/女)	19/7
熱傷面積 (%)	34 [30 - 60]
熱傷指数 (Burn Index)	27.5 [18 - 42.6]
Prognostic Burn Index	77.3 [61.9 - 108.8]
APACH II score	11.5 [7.8 - 17]
SOFA score (入院時)	3 [0 - 5]
SOFA (最高値)	5 [1 - 8]
予後, n, (生/死)	22/4

インフラマソーム・制御性T細胞活性と各種免疫担当細胞の推移

図1に示すように受傷後CD8+ T細胞の比率は著明に低下していたが、CD4+ T細胞の比率は増加傾向にあった。インフラマソームは受傷後1か月を通じて活性化状態にあったが特に2週間目までの増加が顕著であった。制御性T細胞は受傷後1週間あたりまで増加傾向にあった。

サイトカインプロファイリング

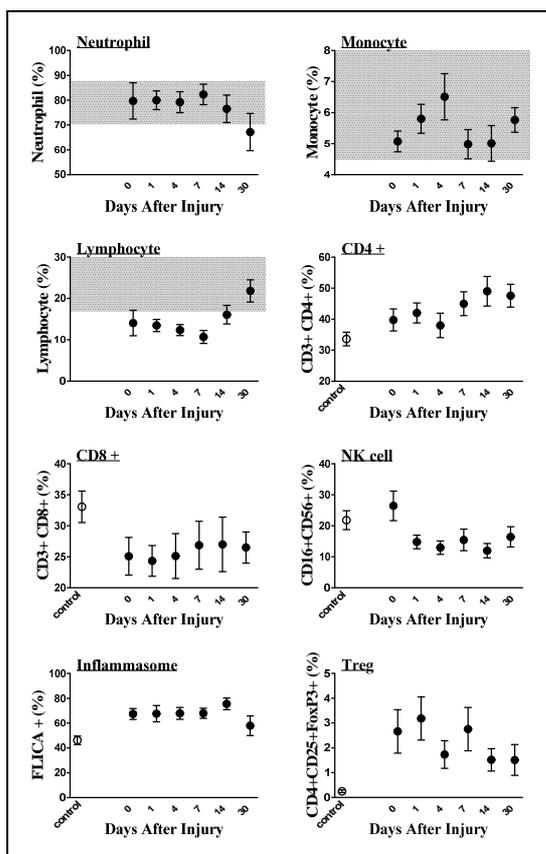
図2に受傷後の各種サイトカインの推移を示す。受傷直後よりIL-6、IL-10の著明な増加を認めた。

血清 DAMPs の推移

図3に血清中のDAMPsであるHMGB-1お

よび Histone H3 の経時的変化を示す。Histone H3 は熱傷病態においてはあまり増加を認めないが、HMGB-1 は受傷直後より著明に増加することが分かった。

図 1. インフラマソーム・制御性 T 細胞活性と各種免疫担当細胞の推移



SOFA スコアの推移

SOFA スコアの推移を図 4 に示す。臓器不全の指標である SOFA スコアは受傷後から増加し 3-5 日目にピークとなりその後漸減した。

以上をまとめると、広範囲熱傷受傷後にはインフラマソームおよび制御性 T 細胞の活性化が起こり、IL-6・IL-10 が放出される。これらの機序には血清 DAMPs である HMGB-1 の増加が関与している可能性があるといえるが、

現在のところインフラマソームおよび制御性 T 細胞の活性化が生命予後並びに臓器不全に与える影響に関して統計学的に有意な結果

は得られていなかった。今後症例数を蓄積し更なる検討をしていきたい。

図 2. サイトカインプロファイリング

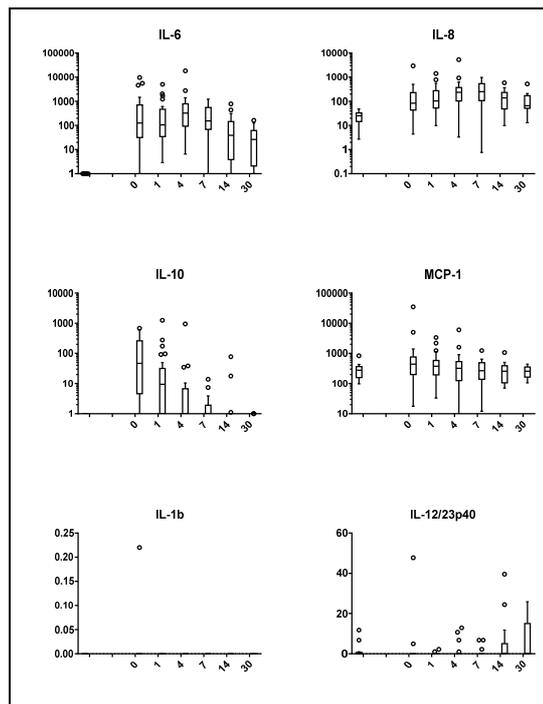


図 3. DAMPs の推移

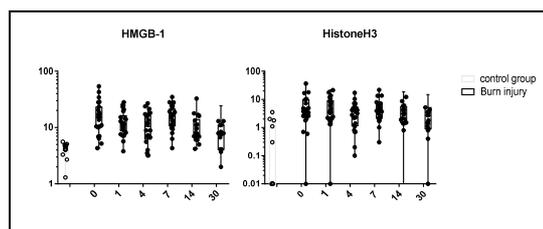
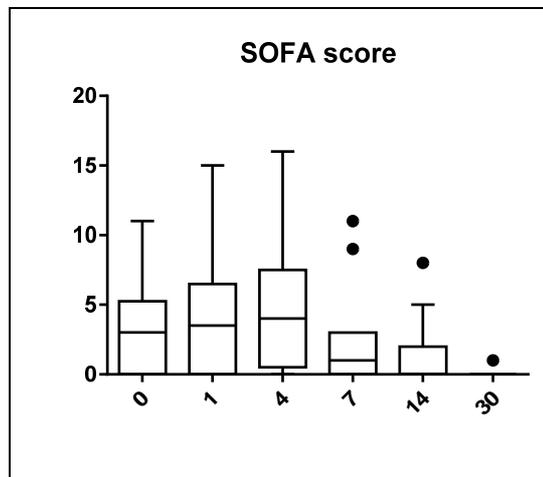


図 4. SOFA スコアの推移



5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大須賀 章倫 (OSUKA, Akinori)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号：60552081