

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02896

研究課題名(和文)重症感染、術後免疫抑制メカニズムの解析と治療

研究課題名(英文) Mechanism and therapy for immune suppression caused by severe infection and / or surgery.

研究代表者

内田 寛治 (UCHIDA, KANJI)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：60302709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの腹膜炎敗血症のモデルマウスを作成し、肺と腹腔の免疫担当細胞の機能を観察した。中等症(死亡率10%程度)モデルで、回復期である4日目にも、肺のマクロファージの成熟度が低下して、機能は抑制されていることがわかった。低下した機能や成熟度は、全身的IFNの投与、あるいは経気管的GM-CSFの投与によって復活した。重症モデルでも、敗血症早期に腹腔貪食細胞の機能は大幅に低下しており、全身的IFNの投与によって機能が復活した。しかし、この効果は、敗血症前に予防的に投与した時には認められず、むしろ生存率を下げた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症は、いまだに死亡率が高く、確立された薬物療法が無い病態である。臨床試験で有効性が示せない理由の1つに、病態の不均一性が挙げられている。本研究は、動物モデルで、ヒトの腹膜炎敗血症の病態を再現し、一次免疫担当細胞の機能が抑制されていることを直接的に示したこと、また免疫賦活効果を示すサイトカインを投与し、実際に機能の復活と生存率の改善を観察できたことは、今後の治療につながる社会的意義が大きい成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：A mouse model of human septic peritonitis was created and the function of innate immune cells in the lungs and abdominal cavity was observed. In the model of moderate severity (about 10% mortality), the function of alveolar macrophages in the lungs was found to be suppressed, with reduced maturation marker expression, even on day 4, where mice were in the recovery period. Impaired function and maturity were restored by systemic IFN administration or transtracheal GM-CSF administration. In the severe sepsis model, abdominal phagocyte function was greatly reduced as well and was restored by systemic IFN administration. However, this effect was not seen when prophylactic administration was given before sepsis.

研究分野：麻酔科学・集中治療医学

キーワード：敗血症 重症感染症 手術侵襲 免疫抑制 免疫賦活

1. 研究開始当初の背景

術後感染性合併症や、重症感染症に引き続く敗血症や急性呼吸窮迫症候群の予後は依然として悪く、現在のところ抗菌薬以外に、有効性が証明された薬物療法は確立されておらず、対症療法、維持療法にとどまっている。抗菌薬には腎障害などの副作用に加え、耐性菌の発生は予後をさらに悪化させるため、新しい治療方法の確立が急務である。病態生理については、これまで過剰免疫による重要臓器傷害と引き続く多臓器不全と考えられていたが、免疫抑制療法は臨床試験で成功を見ていない。近年、敗血症時には免疫機能が抑制されていることを示唆する報告がなされている。我々のグループも、マウスの敗血症モデルで、肺の生体防御機構が低下しており、引き続き緑膿菌肺炎の重症化に関わっていることを発見した。

2. 研究の目的

敗血症時の一次免疫機構が、1次感染巣である腹腔内、及び2次感染巣である肺において、抑制されていると仮説を立て、検証する。また、免疫賦活効果が期待されている顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) やインターフェロン (IFN) を投与することが治療的に働くかどうかを検証する。

3. 研究の方法

C57BL/6 マウスを用いて、回盲部結紮穿孔による腹膜炎敗血症モデルを作成した。中等症 (死亡率~10%)、及び重症腹膜炎 (死亡率~90%) を作成し、中等症モデルでは、肺内のマクロファージ機能を、*ex vivo* で測定した。また重症モデルでは、腹腔内の貪食細胞の機能を *ex vivo* で計測した。さらに、*in vivo*、*ex vivo* で、免疫賦活効果を持つとされる GM-CSF、IFN- を投与して、その効果を検証した。

また、中等症モデルでは、敗血症4日目の理学的所見 (マウスの摂食状況、活動性) は病前に戻っているような印象もあるにもかかわらず、そこで緑膿菌を気管内投与することによる日和見肺炎をひきおこす、いわゆる 2-hit モデルを作成すると、その死亡率が高い (~90%) ことがこれまでの研究で明らかになっている。

敗血症4日目の肺胞マクロファージ機能が低下していることがどのようなメカニズムで起きているのか、マクロファージ細胞株 RAW264,7 細胞を用いて *in vitro* で敗血症4日目の肺環境を再現して、その機能変化を観察した。

4. 研究成果

中等症敗血症モデルでは、敗血症4日目の肺胞マクロファージの貪食機能はコントロールと比較して 1/10 程度に大幅に低下していた (図1)。また貪食の際に、ケモカイン KC を放出する量も減少していた。IFN を敗血症3日目に全身投与すると、低下した機能が復活した。

腹腔内貪食細胞機能を、重症敗血症モデルで敗血症後1日目に検討したが、軽症腹膜炎と比較して大幅に低下していた。この低下は、腹膜炎発生12時間後に、IFN を全身投与 (「後投与」) することで復活した (図2)。

敗血症4日目に採取した肺胞マクロファージの表面抗原発現状態を、フローサイトメトリーで検討したところ、コントロール群と比較して、敗血症4日後は、細胞の活性化指標とされる表面抗原 CD11b が有意に上昇したが、成熟度指標とされる CD11c, Siglec F は低下した。一方、敗血症3日目に経気管的に GM-CSF を投与した群は、低下した CD11c, Siglec F が有意に復活した。

マクロファージをリポポリサッカライド (LPS) で刺激したところ、培養液中に分泌するサイトカイン IL-6, TNF- が、敗血症4日目で有意に低下していたが、敗血症3日目に経気管的に GM-

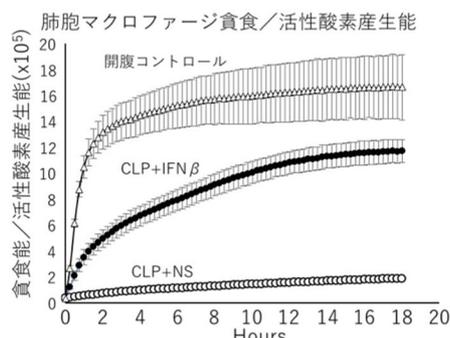


図1: 敗血症4日目の肺胞マクロファージの生体防御能。CLPによって高度に抑制され、免疫賦活サイトカイン IFN β 投与によって復活している。CLP: 回盲部結紮穿孔、IFN: インターフェロン

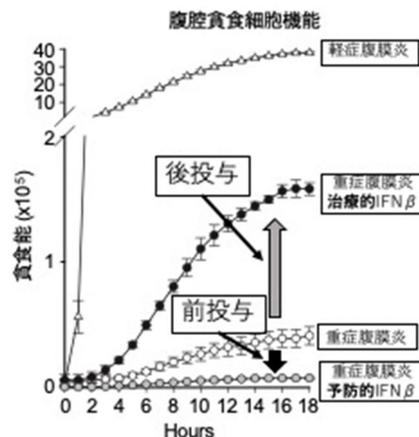


図2. 敗血症1日目の腹腔内貪食細胞の貪食能。重症腹膜炎で低下した機能は、治療的 (後) 投与で復活するもの、予防的 (前) 投与ではむしろ悪化した。IFN: インターフェロン

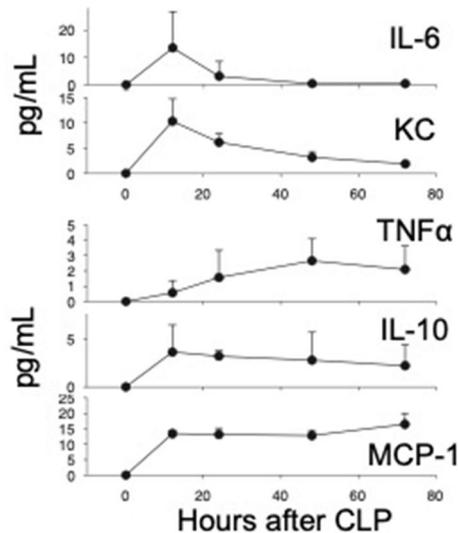
CSFを加えると復活した。この現象は、採取した肺胞マクロファージを *in vitro* で GM-CSF 刺激しても同様の傾向を示し、細胞内遺伝子発現パターンも同様の傾向を示した。中等症敗血症での、肺内のサイトカイン動態を経時的に観察したところ、IL-6、KC といった炎症性サイトカイン、ケモカインは早期に上昇し、速やかに基線に戻っていたが、TNF、IL-10、MCP-1 は敗血症後 72 時間後も高値を維持していた (図 3)。健常肺胞マクロファージを培養し、培養液中に、TNF、IL-10 を加えることで、*in vitro* に、肺内環境を再現したところ、LPS 刺激による IL-6 分泌能が抑制された。

これらの結果から、中等症敗血症時は、回復期でも肺内の免疫リモデリングが継続しており、生体防御能はむしろ低下していること、また重症敗血症でも、貪食細胞機能が低下していることが明らかとなった。IFN、GM-CSF の投与はこのような低下した機能を復活させる効果、ひいては生存率を上げる可能性が示唆された。

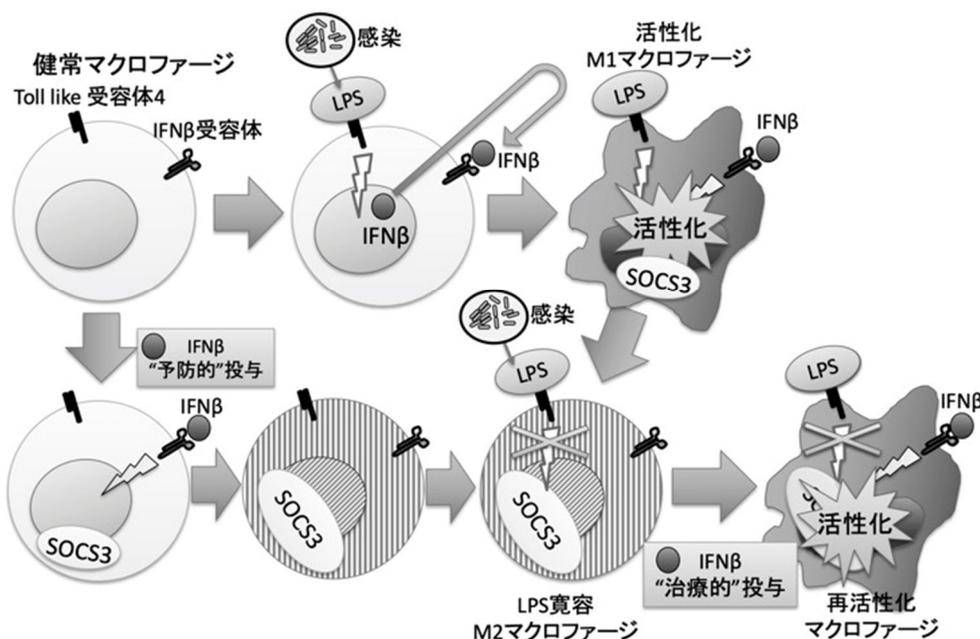
しかし、図 2 に示すように、IFN を重症敗血症の 3 時間前に、予防的に投与した場合(「前投与」)は、生存率はむしろ低下し、貪食能はさらに低下するという逆の現象も観察された(図 2)。このため、こうしたメディエータを使用した免疫賦活療法を実際に臨床応用する際には、タイミングが大変重要で、免疫担当細胞の機能低下が起きたところでの投与は有効でも、予防的投与は機能をさらに低下させる可能性があると考えられた。LPS 受容体である TLR4 と IFN 受容体の相互作用によって、機能が抑制されたり、活性化したりする現象のメカニズムは、過去の文献も踏まえて、下図のように推測された。

このように免疫賦活療法が、敗血症時の治療オプションとして有望である可能性が示唆された一方、有効性がある病態と、むしろ予後を悪化させる病態があることがわかったことは、今後臨床応用を検討する上で大変重要な知見であり、臨床検体を用いた適切なバイオマーカーの同定が大変重要であることを示唆する結果であった。

図 3. CLP 後の肺内サイトカインの推移。TNF、IL-10、MCP-1 は漸増し、72 時間後も維持されている。



IFNβ投与タイミングによる予後の違いのメカニズム



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Uchida K	4. 巻 33
2. 論文標題 Post-surgical immune suppression: another target to improve postoperative outcomes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Anesth	6. 最初と最後の頁 625-627
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00540-019-02651-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ikeda T, Yamauchi Y, Uchida K, Oba K, Nagase T, Yamada Y	4. 巻 19
2. 論文標題 Reference value for expiratory time constant calculated from the maximal expiratory flow-volume curve	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Pulm Med	6. 最初と最後の頁 208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12890-019-0976-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Aoyama H, Uchida K, Aoyama K, Pechlivanoglou P, Englesakis M, Yamada Y, Fan E.	4. 巻 2
2. 論文標題 Assessment of Therapeutic Interventions and Lung Protective Ventilation in Patients With Moderate to Severe Acute Respiratory Distress Syndrome: A Systematic Review and Network Meta-analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JAMA Netw Open	6. 最初と最後の頁 e198116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1001/jamanetworkopen.2019.8116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ku wajima K, Chang K, Furuta A, Bougaki M, Uchida K, Sawamura S, Yamada Y.	4. 巻 7
2. 論文標題 Synergistic cytoprotection by co-treatment with dexamethasone and rapamycin against proinflammatory cytokine-induced alveolar epithelial cell injury.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Intensive Care	6. 最初と最後の頁 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40560-019-0365-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kusakabe Yoshiomi, Uchida Kanji, Yamamura Yoshiro, Hiruma Takahiro, Totsu Tokie, Tamai Yuho, Tsuyuzaki Hitoshi, Hasegawa Kyoko, Chang Kyungho, Yamada Yoshitsugu	4. 巻 129
2. 論文標題 Early-phase Innate Immune Suppression in Murine Severe Sepsis Is Restored with Systemic Interferon-	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anesthesiology	6. 最初と最後の頁 131 ~ 142
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/ALN.0000000000002185	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiruma Takahiro, Tsuyuzaki Hitoshi, Uchida Kanji, Trapnell Bruce C., Yamamura Yoshiro, Kusakabe Yoshiomi, Totsu Tokie, Suzuki Takuji, Morita Shigeki, Doi Kent, Noiri Eisei, Nakamura Kensuke, Nakajima Susumu, Yahagi Naoki, Morimura Naoto, Chang Kyungho, Yamada Yoshitsugu	4. 巻 59
2. 論文標題 IFN- Improves Sepsis-related Alveolar Macrophage Dysfunction and Postseptic Acute Respiratory Distress Syndrome-related Mortality	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 45 ~ 55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1165/rcmb.2017-02610C	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hosoki, K., Mikami, Y., Urushiyama, H., Souma, K., Kawamura, G., Uchida, K., Nagase, T., Jo, T.	4. 巻 7
2. 論文標題 Predictors of postoperative acute exacerbation of interstitial lung disease: A case-control study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMJ Open Respiratory Research	6. 最初と最後の頁 e000634
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bmj resp-2020-000634	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hirose, K., Uchida, K., Umezu, S.	4. 巻 34
2. 論文標題 Airtight, flexible, disposable barrier for extubation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Anesth	6. 最初と最後の頁 798-799
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00540-020-02804-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Naito, A., Taguchi, S., Suzuki, M., Kawai, T., Uchida, K., Fujimura, T., Fukuhara, H., Kume, H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Transient acute kidney injury observed immediately after robot-assisted radical prostatectomy but not after open radical prostatectomy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mco.2020.2087	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Aoyama, H., Uchida, K.	4. 巻 35
2. 論文標題 Respiratory characteristics and related intraoperative ventilatory management for patients with COVID-19 pneumonia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Anesth	6. 最初と最後の頁 356-360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00540-020-02845-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Uranbileg, B., Ito, N., Kurano, M., Kano, K., Uchida, K., Sumitani, M., Aoki, J., Yatomi, Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 Inhibition of autotaxin activity ameliorates neuropathic pain derived from lumbar spinal canal stenosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3984
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-83569-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hoshino, Y., Okuno, T., Saigusa, D., Kano, K., Yamamoto, S., Shindou, H., Aoki, J., Uchida, K., Yokomizo, T., Ito, N.	4. 巻 36
2. 論文標題 Lysophosphatidic acid receptor1/3 antagonist inhibits the activation of satellite glial cells and reduces acute nociceptive responses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e22236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202101678R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Tsuyuzaki H, Hiruma T, Uchida K, Tamai Y, Yamada Y.
2. 発表標題 Effects of peritoneal polymicrobial infection on the maturation and function of alveolar macrophage and therapeutic effect of intratracheal GM-CSF
3. 学会等名 American Thoracic Society International Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsuyuzaki H, Uchida K, Hiruma T, Yamada Y.
2. 発表標題 Effects of Peritoneal Polymicrobial Infection on Lung Innate Immunity and Therapeutic Effect of Intratracheal GM-CSF.
3. 学会等名 American Thoracic Society International Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Meng Q, Seto F, Kariya T, Hiruma T, Totsu T, Uchida K.
2. 発表標題 Time Course Phagocyte Accumulation in the Lung in Murine Mild Sepsis
3. 学会等名 American Thoracic Society International Conference 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 倉橋清泰、内田寛治、山田芳嗣 編集	4. 発行年 2021年
2. 出版社 克誠堂出版	5. 総ページ数 403
3. 書名 Q&A形式で学ぶ 周術期気道・呼吸管理の基礎と実際－周術期呼吸管理のエキスパートへー	

〔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	山田 芳嗣 (YAMADA YOSHITSUGU) (30166748)	国際医療福祉大学・国際医療福祉大学三田病院・教授 (32206)	
研究分担者	比留間 孝広 (HIRUMA TAKAHIRO) (40572277)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	

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