

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09260

研究課題名（和文）頭部外傷特異的な免疫応答と二次性感染症におけるインフラマソーム制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulatory mechanisms of inflammasome in specific immune responses after infections secondary to traumatic brain injury

研究代表者

和田 剛志（Wada, Takeshi）

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：30455646

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：重度の怪我を負ったあとは一般的に身体の抵抗力が低下し肺炎をはじめとする感染症に罹患しやすく生命が危険に晒されるが、頭部外傷受傷後には感染症に対する免疫力が向上することが知られていたがその機序は明らかにされていなかった。本研究では、頭部外傷後の感染症では、臓器障害が軽減することを臓器の組織観察で証明した。その機序として、白血球の中でもっとも基本的かつ重要である好中球に、頭部外傷特異的な機能変化が生じることを先端免疫解析機器を用いて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般的に感染症は抗生物質で治療を行うが薬剤耐性菌の出現は避けられず、2019年には世界で約495万人が薬剤耐性菌に関連する疾患により死亡したと推定されており、あらゆる年齢層の人々の主要な死亡原因の一つであることが明らかになっている。近年、悪性腫瘍領域で腫瘍細胞を攻撃する自己の免疫機構に着目したがん免疫療法の一つである「免疫チェックポイント療法」が、がん治療の新基軸として期待されているが、本研究はこれと同様に、「頭部外傷で起きている免疫応答を誘導することで抗生物質を使わず感染症の治療を行う」という新たな感染症治療の概念構築につながりうる知見を得た点で非常に価値の高い研究であると評価する。

研究成果の概要（英文）：The immune system is generally deteriorated after receiving severe injuries, making the patient susceptible to infectious disease, including pneumonia, and putting the patient's life at risk. On the other hand, the patients with traumatic brain injury showed the enhancement of immunity against infection; however, this mechanism remains unclear. This study demonstrated the amelioration of organ dysfunction secondary to infection after traumatic brain injury by histological examination. In addition, we found that neutrophils, the most basic and important leukocytes, showed functional alterations specific to infection secondary traumatic brain injury.

研究分野：救急・集中治療医学

キーワード：自然免疫 好中球 CyTOF 頭部外傷 外傷後免疫応答

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)重症外傷を負った患者には複雑な生体反応が惹起され免疫系の恒常性が破綻をきたし、免疫不全を背景に二次性重症感染症・敗血症を発症ししばしば命を落とす。申請者は、外傷を模した熱傷後の二次性肺炎における肺の細菌除去能低下と生存率低下を基礎実験で明らかにした。一方で同じ「外傷」である外傷性脳損傷(traumatic brain injury: TBI)では、肺での細菌除去能が改善し肺炎の予後が改善することが臨床・基礎研究で明らかになっていた。この免疫能向上の効果は神経伝達物質であるサブスタンス P(SP)を阻害することで打ち消されるが、体内の SP レベルは TBI で有意な上昇を認めずその機序は不明のままであった。

(2)「Danger signals の番人」とも評されるインフラマソームを構成する NALPs(NACHT domain-, LRR-, and Pyrin domain-containing proteins)の一つ Nalp1 を介して SP は炎症性サイトカインを産生する。また、頭部外傷後の神経細胞の炎症に Nalp1 発現が関与する。

(3)CyTOF(Cytometry by time-of-flight)マスサイトメトリーは近年注目を集める新規免疫学解析ツールであり、金属同位体標識抗体を用いて細胞内外のたんぱく質を検出する多次元サイトメトリー技術である。蛍光標識抗体を用いる従来のフローサイトメトリーで問題となる色素漏れ込みによる評価精度の低下が完全に解決されており 40 種を超える抗体を同一細胞で同時に評価をすることが可能である。これにより従来検出が困難であった細胞集団の同定や細胞内外のタンパク質の網羅的解析が可能となる。

2. 研究の目的

上述 1. より生み出した研究仮説は、「TBI における細菌除去能向上の機序は、TBI に特異的な Nalp1 発現亢進を介した免疫機能増強である」であり、CyTOF をはじめとする先端免疫学解析ツールを用いてこの仮説を証明し、自己の免疫変化に着目した感染症治療の新たな方向性を提示するための新知見を得ることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

肺炎球菌による肺炎を本研究で用いる感染症と想定していたが、細菌の保管や取り扱いが研究実施に大きく影響を与えることが判明したため、盲腸結紮穿孔(cecal ligation puncture: CLP)による腹膜炎により感染症/敗血症を誘導させることとした。

(1)実験モデル

ICR マウスに対して、すでに確立している TBI 作成手順に従い、麻酔投与下に TBI を加え 24 時間後に CLP を実施し TBI 後二次性敗血症モデルを作成した。

(2)検体収集/保存

敗血症誘導 24 時間に外傷処置の 2 倍量の麻酔薬投与による安楽死後腹腔内に 5ml の生理食塩水を注入し腹水を採取、また心臓より血液検体を採取した。病理評価のため肺、肝、腎、脾を摘出し 10% フォルマリン内に保存した。血液は遠心分離し上澄みを LUMINEX によるサイトカイン測定のため -20 の冷凍庫に凍結保存、また赤血球溶解バッファーを用いて赤血球を除去し白血球を分離した後細胞を Cryostor0.5ml の入ったチューブに入れ測定まで液体窒素内に保存した。

(3)生存率評価

Sham 損傷後敗血症マウスと TBI 後敗血症マウスを敗血症誘導後 15 日まで観察し Kaplan-Meier 生存率曲線で解析した。

(4)腹水中生菌数測定

Sham 損傷後敗血症マウスと TBI 後敗血症マウスから採取した腹水を寒天培地に接種し 24 時間後の生菌数を計測した。

(4)検体測定/評価

病理組織評価

モルフォテクノロジー社に病理切片の作成を依頼し、共同研究先である北海道大学腫瘍病理学教室で病理組織評価を行った。

CyTOF マスサイトメトリー

CyTOF に使用する抗体は米国ハーバード大学 James A. Lederer 研究室から輸入した。液体窒素内に保管した検体は共同研究先である大阪医科薬科大学に輸送し、同施設での染色処理のうち聖路加エスアールエル先端医療研究センターに輸送し CyTOF 測定を行った。測定結果データはクラウドデータベース OMIQ にアップロードし多次元解析を行った。

LUMINEX

-20 で保存していた検体を共同研究先である大阪医科薬科大学に輸送し、MILLIPLEX MAP kit を用いて同施設で保有する LUMINEX を用いたマルチプレックス分析によりサイトカイン/ケモカインの網羅的解析を行った。

4. 研究成果

(1)生存率評価(図1)

sham 損傷後敗血症マウスおよび頭部外傷後敗血症マウスの15日生存率はそれぞれ66.7%、86.7%と頭部外傷後敗血症マウスで高い傾向にあった。

(2)腹水中生菌数測定

Sham 損傷後敗血症マウスに比して頭部外傷後敗血症マウスでは腹水中の細菌が有意に少なかった(p=0.0231)

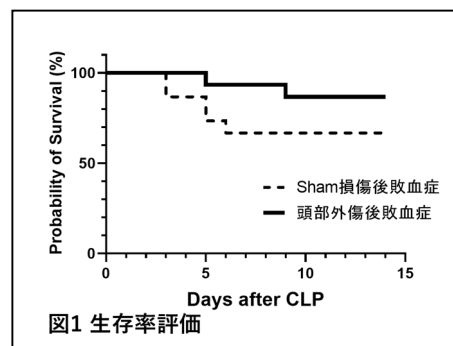


図1 生存率評価

(3)病理組織評価(図2)

脾臓内のマクロファージが TBI 後敗血症で著明に増加していた。また、sham 損傷後敗血症で生じていた肝の類洞拡張および肺毛細血管のうっ血は TBI 後敗血症では確認されなかった。これらの結果は TBI 後敗血症でのより強い免疫の活性化が感染症を抑制し肝、肺の臓器障害軽減につながったと推察される。

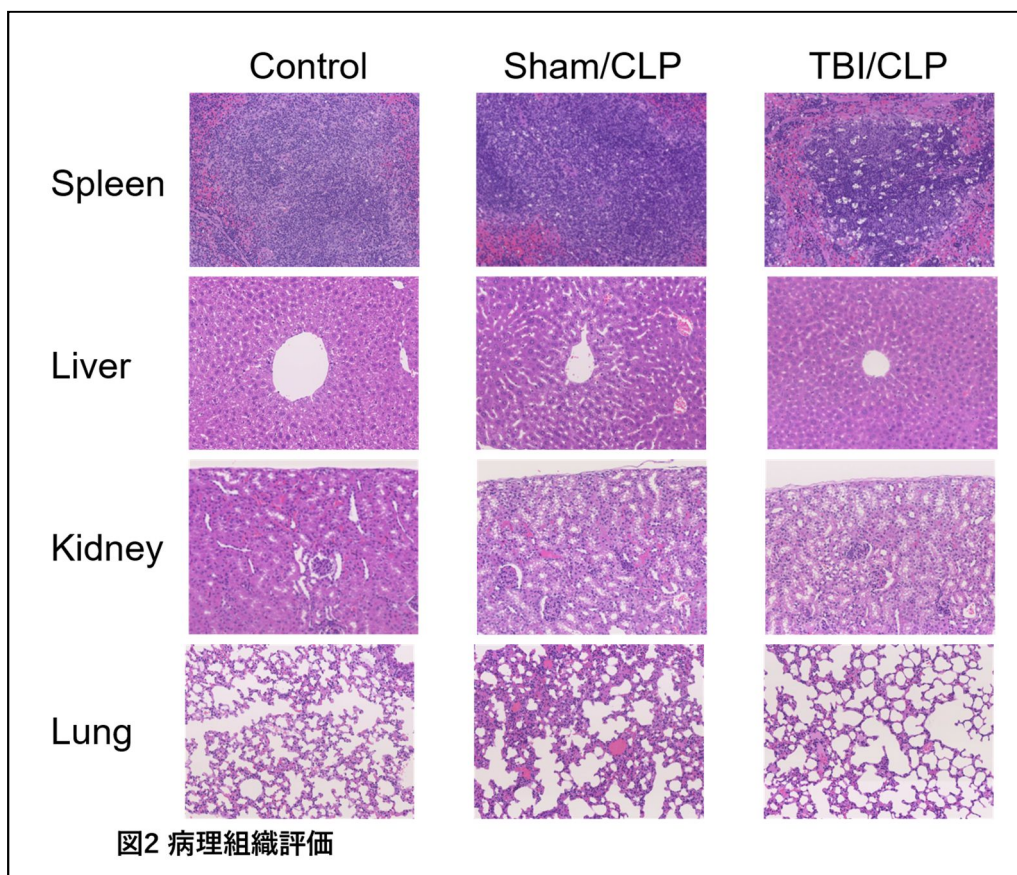


図2 病理組織評価

(4)LUMINEX(図3)

TBI 群では、IL-6、TNF α 、IL-17 に代表される炎症性サイトカインが有意に高値である一方、IL-4、IL-10 などの抗炎症性サイトカインは両群間に有意な差は認められなかった。また、TBI 群では T 細胞非依存性 INF γ 誘導に重要な役割を果たす IL-12P70 が高値であり、実際に INF γ の高値も確認された。

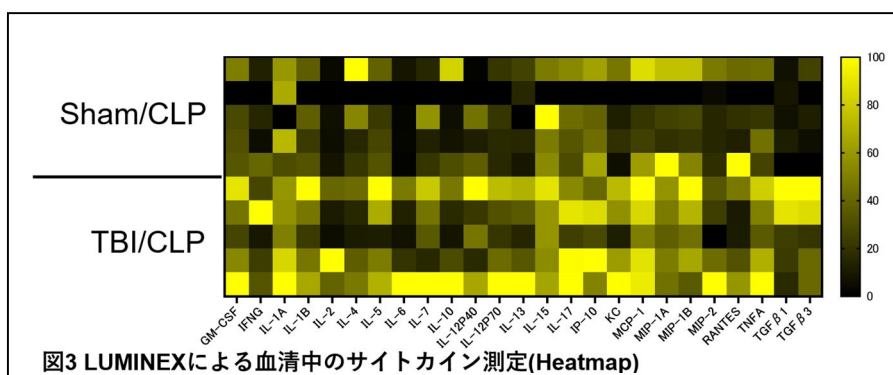


図3 LUMINEXによる血清中のサイトカイン測定(Heatmap)

(5) CyTOF マスサイトメトリー

好中球(図4) : Sham 損傷後敗血症において主要なクラスターである CD68+の好中球は TBI 後敗血症では CD14 高発現、Ly6C, SIRP and Ki67 が低発現の好中球に変化することが確認された。また TBI 後敗血症においては CD68、CD14、TLR4 が低発現の好中球が主要なクラスターを形成することが明らかとなった。

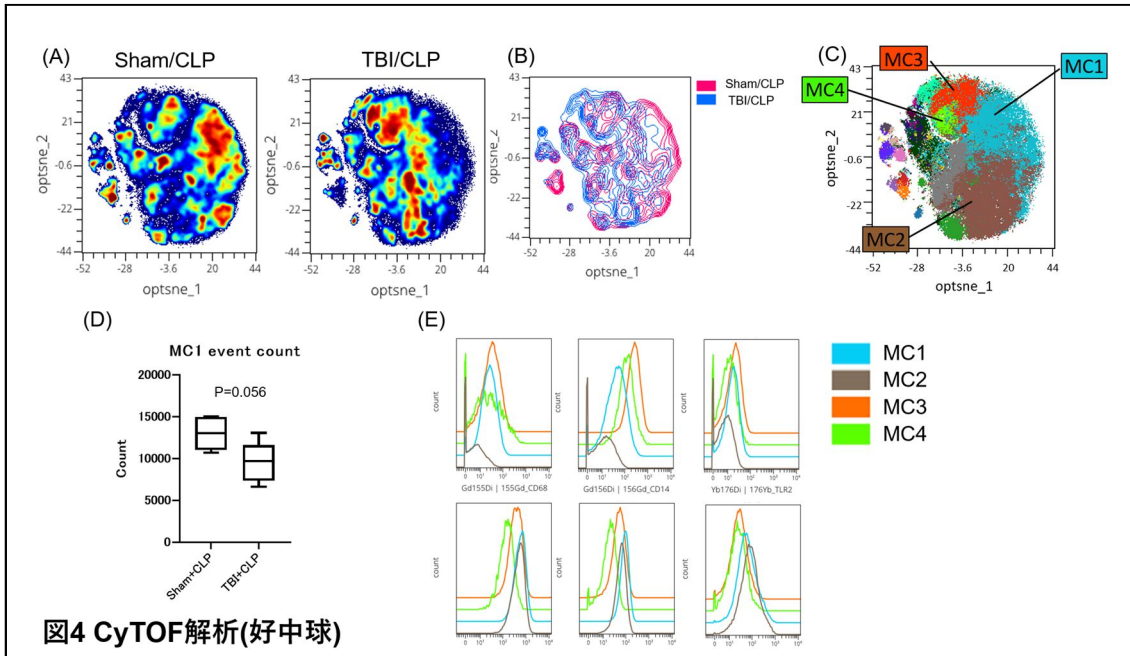


図4 CyTOF解析(好中球)

単球(図5) : PD1、CD14 が高発現の単球が TBI 後敗血症で減少し、CD206 高発現の単球が増加することなどが明らかになった。

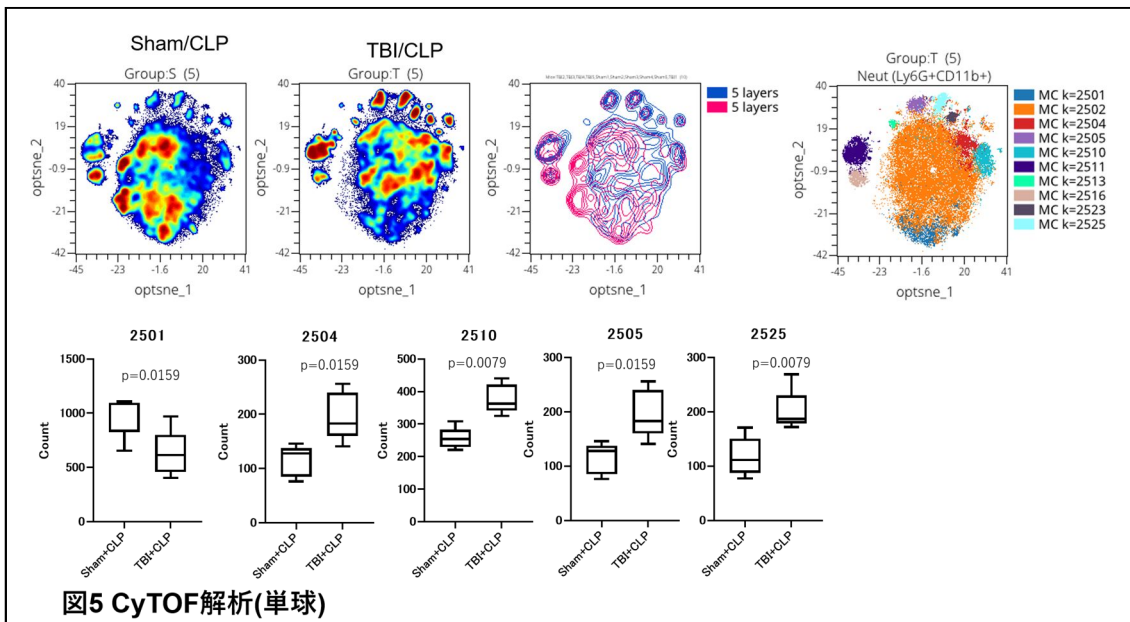


図5 CyTOF解析(単球)

(6)まとめ

動物飼育施設の関係でロックアウトマウスを使用することができずインフラマソームが関連する病態解析はかなわなかったが、先端免疫学解析ツールを用いて頭部外傷後二次感染症における特異的な自然免疫応答の一端を明らかにした。

感染症は抗菌薬投与により治療するのが一般的であるが薬剤耐性菌の出現は必発である。2019年には世界で 127 万人が耐性菌により死亡したと推計されている。悪性腫瘍の領域では自己の免疫変化に着目した免疫療法の一つである「免疫チェックポイント療法」が癌治療の新機軸として期待されている。本研究は免疫チェックポイント療法と共通のコンセプトを有しており、抗菌薬を使用せずに感染症を治療するという画期的な変革を医療現場にもたらす可能性を示した基盤研究であったと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Asumi Mizugaki, Takeshi Wada, Takumi Tsuchida, Yoshitaka Oda, Katsuhide Kayano, Kazuma Yamakawa, Shinya Tanaka	4. 巻 9
2. 論文標題 Neutrophil phenotypes implicated in the pathophysiology of post-traumatic sepsis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Medicine	6. 最初と最後の頁 982399
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmed.2022.982399	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1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 和田剛志
2. 発表標題 CyTOF technologyを用いた生体侵襲後免疫変化に起因する臓器不全、敗血症発症の病態解明
3. 学会等名 第51回日本救急医学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔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	山川 一馬 (Yamakawa Kazuma) (50597507)	大阪医科薬科大学・医学部・准教授 (34401)	

	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
研究協力者	田中 伸哉 (Tanaka Shinya) (70261287)	北海道大学・医学研究院・教授 (10101)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	レデラー ジェームス (Lederer James)	ハーバード大学	
研究協力者	水柿 明日美 (Mizugaki Asumi)	北海道大学 (10101)	
研究協力者	土田 拓見 (Tsuchida Takumi)	北海道大学 (10101)	
研究協力者	千葉 裕基 (Chiba Yuki)	北海道大学 (10101)	

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