

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06176

研究課題名(和文) 院内感染症モデルに対するインターフェロンの治療的効果とそのメカニズム

研究課題名(英文) The effect of interferon beta on septic pneumonia mouse model

研究代表者

比留間 孝広 (HIRUMA, Takahiro)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40572277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：回盲部結紮穿孔(CLP)4日後に肺炎を起こすtwo hit modelで死亡率が上昇し、IFN投与が生存率を改善した。CLPによる免疫担当細胞の変化とそれに与えるIFNの効果を検討した。CLP後の肺内KC、IL6は速やかに低下する一方、TNFとIL-10は持続的に上昇した。健常な肺胞マクロファージにTNFやIL10を加えると、dose dependentに貪食能が抑制されたが、IFNを追加投与でその貪食能は復活した。サイトカインの曝露により肺胞マクロファージの機能に変化がおき、IFNはその機能を復活させ、それがtwo hit modelの結果に影響していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We evaluate effects of IFN $\beta$  in a murine model of septic pneumonia. Murine sepsis was induced by cecal ligation and puncture (CLP). Pneumonia was made with instillation of *Pseudomonas aeruginosa*. Outcomes included survival, lung histology, cytokine responses in blood and lung, alveolar macrophage (AM) phagocytosis. While mortality from sepsis or pneumonia alone was low, pneumonia following sepsis resulted in increased mortality in association with an altered profile of blood/alveolar cytokines, reduced alveolar macrophage localization of neutrophils into the endoalveolar space. IFN $\beta$  normalized alveolar macrophage phagocytic function and neutrophil chemoattractant release, and improved survival in a murine model of pneumonia following sepsis. Impaired host defense mechanism might associate with higher mortality in septic pneumonia mouse model. Subcutaneous IFN $\beta$  may restore production of inflammatory cytokines in the lung and impaired alveolar macrophage functions.

研究分野：集中治療

キーワード：敗血症 ARDS インターフェロン

## 1. 研究開始当初の背景

Surviving Sepsis Campaign guidelines (SSCG) は敗血症治療におけるガイドラインであり、重症敗血症、敗血症性ショックに関する診断、治療に関して各種の推薦を提示している (Crit Care Med.2013;41:580-637)。SSCG や集中治療の発展に伴い、敗血症死亡は以前よりは減少しているが、現在もその死亡率は 25%を超え、急性期死亡の主要な原因である。敗血症による過剰炎症は組織障害から多臓器不全に至り、高い死亡率の原因となる。逆に過剰な抗炎症では免疫抑制による 2 次感染へと進展する。敗血症等の重症患者では、炎症と抗炎症のバランスが重要である。また消化管穿孔、外傷、大侵襲手術後等それだけでは致死的な病態に至らなくても、その後感染を合併すると重症化し、重症敗血症、多臓器不全に至ることがある。初期の侵襲 (first hit) により生体防御能が低下し、2 次感染 (second hit) への脆弱化が起きているためであるという報告があり、このような概念は two hit theory と呼ばれている。こうした病態を治療する、臨床的に有効な薬剤は未だ認められていない。

Two hit theory に関連する重症呼吸不全の病態に急性呼吸窮迫症候群 (acute respiratory distress syndrome; ARDS) があり死亡率の高い病態であるが、2014 年 Bellin らによって薬剤によって予後改善の可能性を示唆する臨床試験結果が報告された (Lancet. Respir. Med. 2014;2: 98-107)。Type I インターフェロンである、インターフェロン (IFN) である。ARDS 患者に IFN を投与すると、非投与群での死亡率 32% が治療群では 8% まで改善したと報告された。機序は IFN が CD73, AMP, アデノシンの発現を増加させ、血管透過性を減少させるためと考察されている。また谷口らは免疫担当細胞が異物を認識したときに、IFN 存在下ではより強い反応がおきることから、このような作用を Revving-up model と説明している (Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2001;2:378-86)。インターフェロンは IFN / は type 1、IFN は type2、IFN は type3 に分類され、それぞれ別の受容体、シグナル伝達を介するが、相互のシグナルに影響しあっており、IFN は生体防御に強力に作用することが知られている IFN シグナルを強めることも報告されている (Cell.Microbiol.2006;8 :907-22)。

申請者は回盲部結紮穿孔 (CLP) を施行し、4 日後に緑膿菌の気管投与による肺炎 (PAIT) を起こす two hit model を作製してきたが、Sham-PAIT の生存率 88.6% に対して、two hit 群 (2H, NS 群) である CLP-PAIT は 9.7% と低下し ( $P < 0.001$ )、肺炎に対する生体防御能が CLP 後に低下していた。CLP-PAIT に IFN を

投与した 2H, IFN 群では、生存率は 40.6% に上昇し ( $P < 0.01$ )、immune modulation が予後改善に働く可能性が示唆された。two hit model の死亡率上昇のメカニズムは、2H, NS 群では IL-6, TNF が減少し、IL-10 が上昇しており、免疫抑制が考えられた。また 2H, NS 群では好中球を遊走させる KC (keratinocyte derived chemokine) が低値で、BALF 中の好中球数も低値であり、好中球が炎症部位に集積することが障害されていることが示唆される。また 2H, NS 群で有意に低下した BALF 中の好中球数を、IFN の投与は sham 群と同様にまで回復させた。2H, NS 群と比較すると 2H, IFN 群は BALF の TNF、KC は有意に上昇しており、IL-6 も上昇する傾向を示した。

two hit model において IFN が治療的効果を認めているが、そのメカニズムについてはまだ深く検討していく余地がある。マクロファージを中心に、白血球、脾臓細胞などを用いて、自然免疫機能の変化についての考察が加わることで、IFN の治療的効果についてのメカニズムがより明白なものになると考えられ、本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

院内感染症を想定とした動物モデルにおいて、インターフェロンの治療的効果を検討し、自然免疫機能におけるそのメカニズム解析を行う。

- (1) 院内感染症を想定した、腹腔内、肺内へ感染を起こす two-hit model を作成し、その免疫機能の変化を検討する。
- (2) 急性呼吸窮迫症候群 (acute respiratory distress syndrome; ARDS) の治療として着目されているインターフェロンを用いて、Two-hit model におけるその治療的効果を検討する。
- (3) インターフェロン投与における自然免疫機能の変化を解析し、その治療メカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

腹膜炎+肺炎の院内感染症を想定し、軽症の first hit に軽症の second hit を与えることで、重症の敗血症をきたす two hit model (2H model) にて実験を行う。C57/BL6 マウスに回盲部結紮穿孔 (cecal ligation and puncture; CLP) で腹膜炎モデルを作成し、4 日後に緑膿菌を気管内投与する肺炎モデルを作成する (Pseudomonas aeruginosa intratracheal instillation; PAIT)。CLP 後に PAIT を施行し、CLP3 日後に治療コントロールとして生食 (NS; normal saline) を投

与した 2H, NS 群、開腹手術のみの sham 手術後に PAIT 施行した sham 群、2H 群に CLP3 日後に治療薬として IFN を投与した 2H, IFN 群の 3 群における解析を行ってきた。Sham 群と比較して、Two hit により生存率は著明に低下し、IFN の投与はその生存率を有意に回復した。好中球を遊走させる KC

(keratinocyte derived chemokine) は、Bronchoalveolar Lavage (BAL) 中で two hit により低下し、IFN は KC を増加させた。BAL 中の好中球数は two hit により低下し、IFN は流入好中球数を増加させた。また two hit により低下した炎症性サイトカインは IFN の投与により増加し、IFN が炎症・抗炎症に関与している可能性を示唆している。

Two hit による生体防御能の変化、IFN によるその影響をより深く解明するために、自然免疫担当細胞を中心に、主に ex vivo にて下記の実験を行った。

#### (1) 肺組織における免疫組織化学的検討

先行実験において 2H, NS 群、sham 群、2H, IFN 群の 3 群において、BAL 中の細胞数や KC の値に大きく変化が出ていることは確認した。また既知の報告として、IFN は肺胞にて CD73 という接着分子の発現を増幅しているとの報告があり、それが肺での血管透過性に関与しているとされている。このような先行実験、報告を踏まえて、2H 群にて two hit 後一定時間後の肺組織を採取し、KC や TNF をはじめとしたサイトカインの発現の有無や、CD73 の発現の有無を免疫組織化学的に評価を行う。

#### (2) マクロファージの機能評価

腹膜炎が肺胞および腹腔マクロファージの機能に与える影響と、IFN のそれらに対する治療効果を検証するため、ex vivo の実験を行う。細菌の流入が起きた時に、まず細菌と接触するのはマクロファージであり、そこから抗原提示や、サイトカインの動きにより各種免疫担当細胞が動きだし、いわば司令塔の役割を行っているマクロファージの機能を評価することは必須である。また CLP や IFN が与える影響が、次なる刺激である肺炎に対する反応性の違いに影響しうると考えている。CLP3 日後に IFN (CLP, IFN 群) または NS (CLP, NS 群) を投与し、Sham 群とあわせて、CLP4 日後の肺炎直前に腹腔洗浄液、BALF を回収し、肺胞・腹腔マクロファージの機能評価を行なっていく。

マクロファージを培養後に蛍光ラベルした緑膿菌 (死菌) を貪食させ、その貪食能を定量化する。また貪食後の上清中の各種サイトカイン (IFN、TNF、IL6、KC など) を測定する。

培養したマクロファージに対して、well 上での two hit として LPS 刺激を行う。LPS 刺激後の各種サイトカインを測定す

る。IFN と IFN との相互作用が報告されているため、マクロファージの IFN 受容体 (IFN R) の変化を測定する。またマクロファージ上の表面抗原の測定を行う。

#### (3) 脾臓細胞の機能

脾臓はリンパ球が豊富であり、IFN はリンパ球に影響するとの報告もある。腹膜炎が脾臓細胞機能に与える影響と、IFN のそれらに対する治療効果を検証するため、ex vivo の実験を行う。2) と同様の 3 群で、CLP3 日後に IFN (CLP, IFN 群) または NS (CLP, NS 群) を投与し、Sham 群とあわせて CLP4 日後の肺炎前に脾臓を採取する。脾臓を破砕し、脾臓細胞を回収し、脾臓細胞の IFN R の変化及び表面抗原の測定を行う。また脾臓細胞での免疫機能評価としては、脾臓細胞で CD3・CD28 刺激後の IFN 分泌能をみることで、脾臓細胞の反応性を評価することが知られており (Infect. Immun. 2010; 78: 1582-92)、3 群において脾臓細胞の IFN 分泌能を測定する。

#### (4) 好中球の機能評価

Two hit や IFN 投与の影響で、BAL 中の好中球数の変化は先行実験ですでに確認されている。生体内の好中球に Two hit や IFN 投与の影響で、好中球の機能変化が起きているかどうかを検討する。まずは血液中の好中球の評価を行い、最終的には BAL 中の好中球の機能評価を行っていく。

まずは two hit (2H) 群、sham、2H, IFN 群の 3 群において、two hit である肺炎直前、そして肺炎後一定期間を置いたのちに、マウス末梢血は後眼窩静脈叢より採取し、フローサイトメーターにより以下を評価する。

#### 白血球数、好中球分画

好中球の成熟マーカーである表面抗原 Ly6G の発現量

CD11b stimulation index; 10ng/mL の GM-CSF (顆粒球マクロファージコロニー刺激因子) で全血を刺激した際の好中球表面 CD11b の上昇率 (J Immunol Methods. 2014; 413: 1-11.)

また好中球の遊走能の変化に関しても評価を行う。

#### (5) 肺胞マクロファージにおけるサイトカイン・LPS 刺激後の評価

In vivo では CLP によるサイトカインの放出、LPS の刺激が、肺胞マクロファージに何らかの機能変化を及ぼすと考えられる。その状況で、肺胞に細菌が投与されるという two hit の刺激が起きた際に肺胞マクロファージの反応性が異なる結果になりうるのではという仮説をたてた。そこで、まず CLP を施行し、CLP 後 day0, 1, 2, 3, 4 日の血清、腹腔洗

浄液、BAL 中の各種サイトカインの時間的変化を測定する。血液中のサイトカインの動きを把握するとともに、肺胞マクロファージにおいてどのようなサイトカインに暴露されているのかを把握する。

次に正常マウスから採取した肺胞マクロファージを回収、培養し、生体内でマクロファージが暴露されたであろうサイトカインや LPS で、一定期間共培養を行う。その後の貪食能や LPS 刺激後の反応性、表面抗原の変化などを評価する。例えば IL10 や TNF で肺胞マクロファージを一定期間共培養したうえで、その後の貪食機能や LPS への反応性の変化を評価する。

#### (6) データ解析と報告

上記結果を適宜解析、集計した上で各種学会や論文に報告を行う。

## 4. 研究成果

マウスに回盲部結紮穿孔 (CLP) を作成し、4 日後に緑膿菌肺炎 (PAIT) を作成し、two hit model を作成した。sham に PAIT 施行した sham 群、two hit model に生食 (NS) を投与した 2H, NS 群、two hit model に IFN を投与した 2H, IFN 群の生存率は、Sham 群と比較して 2H, NS 群は著明に低下し、IFN の投与により生存率は有意に回復した。

(1) First attack である腹膜炎が腹腔・肺胞マクロファージ、脾臓細胞にどのような影響を与えるかについて着目し、肺炎直前のこれらの機能について検討した。

腹膜炎が肺胞・腹腔マクロファージに与える影響と、IFN の効果を検証した。CLP3 日後に IFN (CLP, IFN 群) または NS (CLP, NS 群) を投与し、sham 群とあわせて、CLP4 日後の肺炎直前に腹腔洗浄液、気管支肺胞洗浄液 (BALF) を回収し、肺胞・腹腔マクロファージの機能評価を行った。肺胞・腹腔マクロファージの貪食能は CLP, NS 群では sham 群と比較して有意に低く、CLP, IFN 群は CLP, NS 群と比較して有意に高かった。肺胞・腹腔マクロファージにたいして、well 上での two hit として LPS 刺激を行い、上清の TNF 発現量を測定したところ、CLP, NS 群と比較して CLP, IFN 群は有意に高値を示した。

(2) 腹膜炎や IFN が脾臓細胞機能に与える影響を検証した。上記と同様の 3 群で、肺炎直前に脾臓を採取し、脾臓細胞を回収し、脾臓細胞の IFN 受容体数の変化を測定したが、sham 群より CLP, NS 群で有意に上昇したが、IFN による影響はなかった。

(3) 肺胞マクロファージにおけるサイトカインの変化、およびサイトカイン刺激後の機

能評価を In vivo で行った。

CLP によるサイトカインの放出が、肺胞マクロファージに何らかの機能変化を及ぼすと考えられる。その状況で、肺胞に細菌が投与されるという two hit の刺激が起きた際に肺胞マクロファージの反応性が異なる結果になりうるのではという仮説のもと、まず CLP を施行し、CLP 後 day0, 1, 2, 3, 4 日の血清、腹腔洗浄液、BAL 中の各種サイトカインの時間的変化を測定した。これらの結果の中で、腹膜炎後の肺内の KC, IL6 は速やかに低下している一方、TNF と IL10 は 3 日後にも持続的に上昇していた。

(4) 次にこのような CLP 後の肺胞の状態を模して、正常マウスから採取した肺胞マクロファージを回収、培養し、TNF と IL10 と共培養した場合に健常な肺胞マクロファージの機能にどのように影響するかを検討した。健常な肺胞マクロファージに TNF や IL10 を加えると、dose dependent に貪食能が抑制されることがわかった。ここに IFN を追加投与することでその貪食能は復活した。

これらの結果からはサイトカインの曝露により肺胞マクロファージの機能に変化がおき、それが two hit model の結果に影響していることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Hirayama I, Hiruma T, Ueda Y, Doi K, Nakajima S. Hamman syndrome: pneumomediastinum combined with hyperosmolar hyperglycemic state. Am J Emerg Med. 2016 ;34(10):2058.e1-2058.e2. DOI: 10.1016/j.ajem.2016.03.039

Nakamura K, Inokuchi R, Hiruma T, Tokunaga K, Doi K, Nakajima S. Switching therapy from intravenous beta blocker to bisoprolol transdermal patch for atrial fibrillation tachycardia. J Anesth. 2016;30(5):891-4. doi: 10.1007/s00540-016-2199-9.

[学会発表](計 3 件)

比留間孝広・長期の人工呼吸器管理後にも関わらず、ECMO の導入により救命できたレジオネラ肺炎 . 日本集中治療医学会. 2017 年 3 月 11 日 . ロイトン札幌 (北海道札幌市)

比留間孝広. Peritoneal sepsis impairs efficient recruitment of neutrophils into the alveolar space and augment lung injury after nosocomial infection. The American Thoracic Society 2016 International Conference. 2016年5月13日～18日. サンフランシスコ(アメリカ)

比留間孝広. 緊張型統合失調症に肺塞栓症を合併した一例. 日本臨床救急医学会. 2016年5月13日. ビッグパレットふくしま(福島県郡山市)

〔図書〕(計 件)  
該当ありません

〔産業財産権〕  
出願状況(計 件)  
該当ありません。

取得状況(計 件)  
該当ありません。

〔その他〕  
ホームページ等  
該当ありません。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

比留間 孝広 (HIRUMA, Takahiro)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 40572277