

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10523

研究課題名(和文)高齢者敗血症におけるマクロファージの機能障害の機序解明と治療への応用

研究課題名(英文)Clarification of the mechanism of functional impairment of macrophages in sepsis and development of novel therapeutics

研究代表者

渡邊 伸央 (WATANABE, Nobuo)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：80396928

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：高齢者の敗血症では、発症直後は免疫系が活性化過剰状態となり全身炎症状態となるが、その後には免疫不活性化状態に陥り、二次感染の危険性が高まる。本研究では、敗血症に伴う免疫低下の機序を解明し、免疫機能の回復させる治療法の確立を目指した。マウスを用いた敗血症モデルを解析した結果、敗血症はマクロファージを抗菌能力の低い表現型(M2型)に変化させることが判明した。抗体産生に代表される獲得免疫は、マクロファージが貪食した細菌由来のペプチドをT細胞へ提示することで開始される。そこで、マクロファージの抗原提示を促進する化合物取得を目指し、多数の候補化合物の中から迅速に選抜するための新規評価系を構築した。

研究成果の概要(英文)：Sepsis in elderly patients is associated initially with severe systemic inflammation, but later followed by immuno-suppressive state, which increases the risk of secondary infection. In this study we investigated the mechanism of sepsis-induced immuno-suppression and, based on the mechanism, aimed to established therapeutic strategy to reinstate impaired immune functions. Analysis of macrophages in mice with sepsis revealed that macrophages shifted to a low bactericidal phenotype (M2 type). Presentation by macrophages to T cells of antigenic peptide derived from phagocytosed bacteria is essential for mounting adaptive immune responses. We have established a screening assay system to select compounds that can facilitate antigenic peptide loading onto macrophages.

研究分野：炎症

キーワード：感染症 敗血症 マクロファージ 抗原提示 自己免疫疾患

### 1. 研究開始当初の背景

敗血症では、罹患直後は自然免疫系を中心として免疫系が活性化過剰状態となる。若年者はその後正常状態へ戻るが、高齢者の場合、免疫状態が正常レベルより低下する。この結果、高齢者では敗血症後に、2次感染の発症率が高まることが知られている。そこで、本研究では、敗血症に伴う免疫低下のメカニズムを探り、低下した免疫機能の向上させる方法の確立を目指した。

### 2. 研究の目的

(1) マウス敗血症モデルを用いて、自然免疫の中心を担うマクロファージにどのような変化が起こるかを探り、治療法を開発することを目指した。  
 (2) マウス敗血症モデル解析の結果マクロファージの機能が抑制されていることが判明したため、主要組織適合抗原(MHC class II, HLA)への抗原ペプチドの提示を促す化合物の取得を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 敗血症におけるマクロファージの極性的変化の測定

マウスを盲腸結索穿刺により腹膜炎(CLP)を誘導した。経時的に腹腔内へ浸潤した細胞(主としてマクロファージ)を採取し、リアルタイムPCRにて発現遺伝子を測定した。また24時間後に採取したマクロファージの貪食能を蛍光標識ビーズとフローサイトメーター(FACS)を用いて調べた。

#### (2) HLA/MHC クラス II への抗原ペプチドの結合を促進する化合物のスクリーニング系の開発

健常人から、MHC クラス II の  $\alpha$  鎖をコードする DRA ならびに  $\beta$  鎖をコードする DRB1 の4種(0101, 0405, 0901, 1501)の遺伝子をクローニングし、発現ベクターを作成した。3T3 マウス繊維芽細胞にレンチウイルスベクターによって MHC 遺伝子を導入し安定発現細胞を樹立した。フローサイトメーターによる解析により、これらの細胞上の MHC が、ビオチン化した特異的な抗原ペプチドと結合することを確認した。そこで 96 ウエルプレートを用いたハイスループット・スクリーニング系の構築を試みた。

### 4. 研究成果

#### (1) 敗血症によるマクロファージの抗炎症型への変移

敗血症モデルマウスから腹腔浸潤細胞を回収し、リポポリサッカライド(LPS)刺激を行い M1、M2 型に焦点をあてて遺伝子発現プロファイルを求めた。この結果、CLP 誘導 3~6 時間で M1 マーカーである NO 合成酵素(iNOS)などの炎症系遺伝子が発現するが、20時間のマウスでは相対的にアルギナーゼ 1(Arg-1)をはじめとした M2 型マーカー遺伝子

#### M1/M2 polarity of marker enzymes

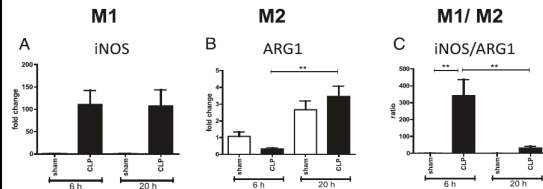


図1 敗血症マウス腹腔マクロファージのマーカー遺伝子の発現変化

マウスに CLP 処置後、腹腔浸潤マクロファージを回収して LPS で刺激して遺伝子発現プロファイルを得た。

の発現増加が見られた(図1)。一般に LPS の投与によって誘導される全身炎症では、マクロファージが M2 にシフトして抗炎症型となることが知られているが(LPS トレランス)、本結果より CLP による敗血症でも同様の結果となることが示された(論文6)。また、CLP 誘導 24 時間後の腹腔浸潤マクロファージの貪食能を測定した結果、貪食能が著しく低下していることが明らかとなった。貪食後の細菌由来のペプチドは、MHC/HLA クラス II 上に提示され、特定の T 細胞の活性化を介して獲得免疫系を始動させる。したがって敗血症による M2 型へのシフトが2次感染のリスクを高めている可能性が示された。そこで敗血症に伴う免疫抑止緩和に向けて、マクロファージの MHC クラス II 上への抗原ペプチド提示能力を促進する化合物の取得を目指した。

#### (2) HLA への抗原提示を促進させる化合物のハイスループット・スクリーニング系の構築 <HLA と抗原ペプチドとの結合性の評価>

非抗原提示細胞において強制発現させた HLA に抗原提示能があるかどうか調べた。健常人末梢血単球・リンパ球から DRA ならびに4種の DRB1(01:01, 04:05, 09:01, 15:01)遺伝子をクローニングし、発現ベクターを作成した。これを HEK293 細胞に導入して発現させ、種々の抗原ペプチドとの結合をフローサイトメーター(FACS)によって測定した。HLA は DRA と DRB1 の両方を発現させた場合のみ、細胞表面に発現し、抗原ペプチド

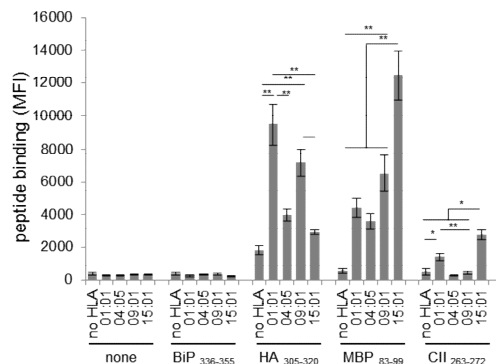


図2 HEK293 細胞に発現させた各遺伝子型の HLA と抗原ペプチドの結合

評価は FACS で行い、独立した3回の実験結果をグラフにまとめた。

MBP83-99 (多発性硬化症のミエリン塩基性タンパク質)と結合した。これより我々の発現ベクターによる $\alpha$ 鎖 $\beta$ 鎖の共発現は、抗原提示能を有するHLA発現に至ることが示された。

次に各遺伝子型のHLA発現細胞と種々の抗原ペプチドとの結合性を調べた。その結果、DRB1\*15:01ならびにDRB1\*01:01を含むHLAに対して、MBP83-99に強い結合性が見られた(図2)。これより、DRB1\*15:01、とDRB1\*01:01に焦点を絞りレンチウイルスベクターと、3T3マウス繊維芽細胞を用いて安定発現細胞の樹立を行った。得られたHLA安定発現細胞もHEK293細胞と同様の遺伝子型依存の抗原ペプチド結合プロファイルを示した。

### <96 ウェルプレートを用いた抗原ペプチド結合評価系の確立>

96ウェルプレートにおいて、HLAを発現させた3T3細胞にビオチン化MBP83-99を添加しインキュベートした。非結合ペプチドを洗浄した後、グルタルアルデヒドを用いて細胞を固定し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ標識ストレプトアビジン(SA- $\beta$ -Gal)によってHLAに結合したペプチドを検出した。当初、高濃度のSA- $\beta$ -Galと発色基質(2-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside; ONPG)を用いて検出を行ったところ、FACSで見られた遺伝子型依存性が見られなかった。そこで、SA- $\beta$ -Gal濃度を1/10に低下させ、高感度の蛍光基質(4-methylumbelliferyl  $\beta$ -D-galactopyranoside; 4MUG)を用いた。この結果、96ウェルプレートによる測定でも遺伝子型依存的な抗原ペプチドの結合を測定できることが判明した(図3)。

### <評価系のバリデーション>

本ハイスループット評価系が候補化合物のスクリーニングに利用できるかどうか、モデル化合物を用いて検証実験を行った。HLAへの抗原ペプチドの結合を促進する化合物は複数の化合物が論文で報告されているが、

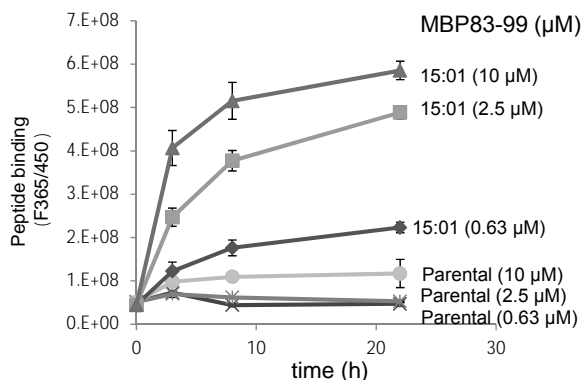


図3 HLAを発現させた3T3細胞とMBPペプチドとの結合の時間、濃度、ならびにHLA依存性

96ウェルプレートでのHTSの条件にて、コントロールの3T3細胞、ならびにDR15(DRB1\*15:01)発現3T3細胞を用いて評価を行った。

実際に入手するのは困難であった。このため、バリデーション実験では、逆に抗原ペプチドの結合を妨げる化合物の選択を目指した。CLIP (Class II-associated invariant chain)はHLAのペプチド結合部位に結合する内因性のペプチドである。DR15 (DRB1\*15:01)の系において、CLIPを共存させたところ、濃度依存的にMBPペプチドの結合が抑制された(図4A)。また、バインディングアッセイ終了後のウェル内の細胞をクリスタルバイオレットにて染色して計測したところ、細胞数には変化がないことが示された(図4B)。これよりCLIPはHLAとMBPペプチドとの結合を抑制したことが示された。このように本系では同一プレートを用いて被験化合物の細胞毒性も同時に評価できるため、擬陽性を除去することが可能となる。同様な方法にてMBPとDR1 (DR01:01)を用いた評価系も構築した。

このように本系は抗原ペプチドの提示を阻害する化合物のスクリーニングにも利用できることが判明した。関節リウマチなどの自己免疫疾患では自己ペプチドがMHCクラスIIに提示され自己反応性T細胞の活性化が誘導されるが、本系は抗原提示阻害化合物のハイスループット・スクリーニング系にも用いることができることが示された。自己免疫疾患治療薬開発に結びつくこの知見についてはすでに論文発表を行った(論文4)。現在、本評価系を用いて、本来の目的である抗原ペプチドの提示を促進する化合物のスクリーニングを行っている。

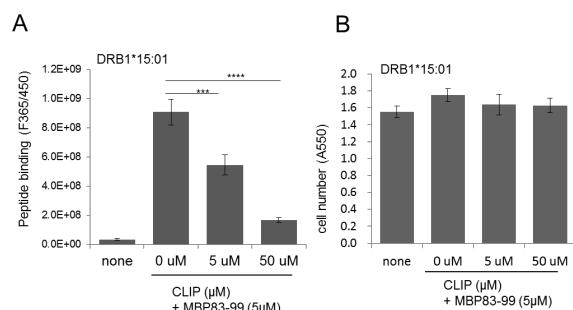


図4 CLIPによる結合阻害効果

(A) CLIPによる濃度依存的なMBP結合抑制効果  
(B) 同プレートのクリスタルバイオレットによる細胞毒性の評価

## 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 8件)

(1) Yamamoto B, Suzuki Y, Yonezu T, Mizushima N, Watanabe N, Sato T, Inoue S, Inokuchi S Cha-Koji, comprising green tea leaves fermented with *Aspergillus luchuensis* var *kawachii* kitahara, increases regulatory T cell production in mice and humans. (査読あり)

*Biosci Biotechnol Biochem.* 2:1-8, 2018

(2) Kawaguchi R, Hirata N, Tokinaga Y, Hayashi S, **Inoue S**, **Watanabe N**, Yamakage M.

Nitrite administration improves sepsis-induced myocardial and mitochondrial dysfunction by modulating stress signal responses.

*J Anesth.*, 31(6):885-894, 2017 (査読あり)

(3) Yahata T, Ibrahim AA, Murguruma Y, Eren M, Shaffer AM, **Watanabe N**, Kaneko S, Nakabayashi T, Dan T, Hirayama N, Vaughan DE, Miyata T, Ando K

TGF-beta-induced intracellular PAI-1 is responsible for retaining hematopoietic stem cells in the niche

*Blood*, blood-2017-02-767384. doi: 10.1182/blood-2017-02-767384. 2017 (査読あり)

(4) **Watanabe N**, Suzuki Y, Yonezu T, Nakagawa N, Shiina T, Hirayama N, Inokuchi S, **Inoue S**

A cell-based high-throughput screening assay system for inhibitor compounds of antigen presentation by HLA class II molecule

*Scientific Reports*, 7 (1) 6798: DOI:10.1038/s41598-017-07080-4, 2017 (査読あり)

(5) Horio Y, Shiraishi Y, **Watanabe N**, **Inoue S**, Imanishi T, Asano K

Empyema associated with *Campylobacter curvus* infection.

*Respirol Case Rep.* 5(4):e00234. doi: 10.1002/rcr2.234. 2017 (査読あり)

(6) **Watanabe N**, Suzuki Y, Inokuchi S, **Inoue S**.

Sepsis induces incomplete M2 phenotype polarization in peritoneal exudate cells in mice.

*J Intensive Care.* doi: 10.1186/s40560-015-0124-1. 2016 (査読あり)

(7) Suzuki K, **Inoue S**, Morita S, **Watanabe N**, Shintani A, Inokuchi S, Ogura S.

Comparative Effectiveness of Emergency Resuscitative Thoracotomy versus Closed Chest Compressions among Patients with Critical Blunt Trauma: A Nationwide Cohort Study in Japan.

*PLoS One.* e0145963. doi: 10.1371/journal.pone.0145963. 2016 (査読あり)

(8) Liu RM, Eldridge S, **Watanabe N**, Deshane J, Kuo HC, Jiang C, Wang Y, Liu G, Schwiebert L, Miyata T, Thannickal VJ Therapeutic potential of an orally effective small molecule inhibitor of plasminogen activator inhibitor for asthma.

*Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* L328-36, 2016 (査読あり)

〔学会発表〕(計 1 件)

(1) Development of a small-molecule immunosuppressive agent based on inhibition of HLA-epitope peptide binding.

**Watanabe N**, Suzuki Y, Nakagawa Y, **Inoue S**  
The 8th Congress of the International Federation of Shock Societies (Tokyo, Japan) 2016年10月5日

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者  
渡邊 伸央 (WATANABE, Nobuo)  
東海大学・医学部・助教  
研究者番号：80396928

(2)研究分担者  
井上 茂亮 (INOUE, Shigeaki)  
東海大学・医学部・准教授  
研究者番号：30582209

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )