

平成 21 年 5 月 5 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18591990
 研究課題名（和文） 熱傷ストレス下における免疫異常と樹状細胞機能：CpG モチーフによる免疫調節
 研究課題名（英文） CpG oligonucleotides activate the immune response in burned mice

研究代表者
 武山 直志 (TAKEYAMA NAOSHI)
 愛知医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：00155053

研究成果の概要：熱傷受傷ラットにおける免疫能を脾細胞にて経時的に検討したところ、MHC class II 発現および炎症性サイトカイン産生能の低下を認めたことより immunoparalysis に陥っている事が明らかになった。免疫賦活作用を有する CpG oligonucleotides を前投与したところこれらの異常が改善した。以上より CpG oligonucleotides は熱傷後免疫抑制の治療薬になりうる可能性が明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,000,000	0	2,000,000
2007 年度	800,000	240,000	1,040,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	420,000	3,820,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：熱傷、CpG oligonucleotides、MHC class II、サイトカイン、immunoparalysis

1. 研究開始当初の背景

著しい免疫抑制が熱傷に合併することは人ならびに動物モデルにおいて報告されている。その発生機序としてヘルパーT細胞(Th)1/Th2の不均衡状態、すなわちTh2優位状態への偏位、またプロスタグランジンE2、カテコラミンをはじめとした血液中に増加するストレス関連因子の関与が推定されている。また従来からリンパ球に繰り返し抗原刺激を与えると低反応、無反応状態すなわち

アネルギーに陥ることが知られている。熱傷創部より放出される大量の変性蛋白質、腸内環境の変化により引き起こされた enteral translocation 由来の大量の抗原物質などがアネルギーの原因物質とも推測されている。しかしながら抗原情報をリンパ球に提示する単球、樹状細胞、とりわけ皮膚ランゲルハンス細胞機能に関する報告は皆無である。またIL-12、IFN、CpG DNAは、実験的感染症に

対して治癒効果を発揮することが報告されている。とりわけ IFN はわれわれの施設を含め人に対する投与がすでに始められており感染防御能の改善効果を認めている。

2. 研究の目的

重症熱傷は免疫不全による易感染状態に陥りやすい。感染症の併発は敗血症などの重症感染症に進行し予後を左右する。重症熱傷に認められる免疫不全の発生機序として様々な理由があげられているものの詳細は不明であり、その根本的な治療法も見あたらないのが現状である。本研究では熱傷に伴う免疫不全の発生機序をT細胞、単球、樹状細胞機能を検討することにより明らかにする。樹状細胞は単球の数十倍におよぶ抗原提示能を有しT細胞の分化、活性化をはじめとした免疫反応に必須である。本研究ではその樹状細胞の大きなpopulationを占める皮膚ランゲルハンス細胞が熱傷によっていかなる影響を受け、またその障害が全身免疫状態にどう影響しているかに焦点をあて検討を行う。さらに免疫賦活作用を有するIFN、IL-12ならびにCpG DNAの投与を試み、易感染状態からの脱却ひいては創部二次感染、多臓器不全への進展に対する予防効果を明らかにする。本研究の独創的な点は皮膚免疫反応の中心的役割を果たしているランゲルハンス細胞の熱傷時における動態を新たに検討する事である。ランゲルハンス細胞は皮膚から浸入した外来異物抗原を認識し、その抗原情報をリンパ球に提示する樹状細胞であり生体防御上極めて重要で欠かすことのできない免疫細胞である。その減少もしくは機能障害は免疫反応を極めて低下させる。熱作用によりこのランゲルハンス細胞が甚大な損傷を被っていることは当然予想されるがこの点に関しては内外においていまだ検討がなされていない。もし何らかの損傷が生じていれば、異

物の認識、抗原提示といった免疫反応の初期段階で免疫系が破綻していることになる。もう一点本研究の特色としてあげることができるのは免疫賦活療法の一環としてCpG DNAの効果を検討する点である。CpGモチーフとは中心部にシトシン (C)、グアニン (G) が並ぶ6塩基からなる配列で細菌DNAにおいて高率に出現する反面、ほ乳類には認められない。すなわちほ乳類にとっては非自己となるためエンドトキシンなどと同様に強力な免疫賦活作用を発揮する。IFNなどの炎症性サイトカイン直接投与による免疫賦活療法に比べより生理的で効果発現も緩徐であるため安全である。また極めて安価に行えることも特徴である。

3. 研究の方法

熱傷モデルの作成

8週齢(体重20g前後)の雄BALB/cマウスを使用する。背部を剃毛した後エーテル麻酔下で80°Cおよび250°Cに加熱したステンレスブロックを15秒間背部に押し当てることにより全体表面積あたり10、25、40%の2度および全層熱傷を作製する。面積はMeehの公式に従って計算する。脱水予防のため乳酸加リンゲル液1ml/10%(熱傷面積)、および鎮痛剤としてブプレノルフィン(2mg/kg)を腹腔内投与する。モデル作成後連日7日目まで尾静脈より採血を行い血液の細菌培養を施行する。また7日目に脾臓を摘出し単核球細胞の免疫学的検討を行う。

脾細胞の遊離

無菌的に摘出した脾臓は10%仔牛血漿加RPMI1640培地で洗浄後、脾細胞をスパーテルにて遊離する。細胞懸濁液はナイロンメッシュを通した後赤血球を溶血除去する。1000 x g、4°C、5分間遠心後 10^7 cell/mlの10%仔牛血漿加RPMI1640培地に浮遊させる。

リンパ球、樹状細胞における細胞内サイトカ

イン産生能

脾細胞は lipopolysaccharide (*E. coli* 026-B6; Difco laboratories, USA) または phorbol myristate acetate + ionomycin にて活性化し、37°C、4時間CO₂インキュベーター内でインキュベーション後、RPE標識抗CD4抗体 (Beckman Coulter, USA) もしくはRPE標識抗CD11b抗体 (Beckman Coulter, USA) とを用いて細胞表面抗原の染色を室温で15分間行う。なおインキュベーション前にゴルジ体蛋白輸送阻害剤である brefeldin A (10 µg/ml) を添加し産生されたサイトカインの細胞外への分泌を阻害しておく。ついでFACS lysing solution (BD Biosciences, USA)、FACS permeabilizing solution (BD Biosciences, USA) を加え細胞膜透過処置を行った後、FastImmune IFN-γ FITC/IL-4 PE (BD Biosciences, USA)、FastImmune TNF FITC/IL-10 PE を添加して室温暗所で30分間インキュベートし細胞内に蓄積しているサイトカインを染色、PBS 2回洗浄、1%パラホルムアルデヒドPBSにて固定後フローサイトメーター (Epics XL; Beckman Coulter, USA) にて測定する。CD4もしくはCD11b陽性細胞をゲーティングし、ついで各サイトカイン産生細胞を同定する。対照にはアイソタイプ抗体染色を用いる。活性化ThはIFN-γを産生する細胞をTh1に、IL-4産生細胞をTh2とし、全Th中で各々の細胞群の占める比率としてあらわす。単球のHLA-DR発現は fluorescein isothiocyanate 標識抗HLA-DR抗体 (BD Biosciences, USA) とRPE標識抗CD11b抗体を用い二重染色を行った後フローサイトメーターにて測定する。対照にはアイソタイプ抗体染色を用い、HLA-DR陽性率は全CD11b陽性細胞中の抗HLA-DR抗体陽性細胞の割合で表す。

免疫賦活

CpG-ODN は (5'-TTCATGACGTTCTGATGCT-3') Kreigら (Nature, 374; 546, 1995) の報告している配列に従って作製する。対照には 5'-GCTTGATGACTCAGCCGAA-3' でCpGモチーフを含んでいないヌクレオチド配列を用いる。CpG-ODN はPBSにて溶解し一回当たり64 µg/20 gを腹腔内投与する。CpG-ODNは熱傷作製3日前、当日、3日後の計3回投与群と、当日と3日後の計2回投与群、ならびにおのおの対照ヌクレオチド投与群を作製する。IFN、抗IL-10抗体 (1 mg/ml溶液0.25 ml) およびIL-12は熱傷作製当日3日後、6日後の計3回腹腔内投与する。対照にはラットIg Gを用いる。

末梢血好中球および樹状細胞機能

尾静脈より採取した血液にて食食能、活性酸素産生能を測定する。食食能は全血100 µlに20 µlのFITC標識大腸死菌浮遊液を加え37度5分間インキュベーションを行う。赤血球を溶血にて除去後、取り込まれた大腸菌のFITC蛍光発色率をフローサイトメーターで測定する。活性酸素種産生能は、DCFH-DAのDCFへの酸化率で測定する。1 ml の全血にDCFH-DA (100 µM) を加え37°C、15分間インキュベートする。ついで100 nM PMA もしくはLPS (5 µg/ml) + fMLP (10⁻⁶ M) にて15分間刺激する。反応停止後、好中球、樹状細胞表面抗原 (ILT3) を染色した後赤血球を溶血除去しフローサイトメーターでDCFHのDCFへの酸化率を測定する。

4. 研究成果

脾細胞 IAd 発現は熱傷後経時的に減少している (図1)。受傷後14日目には対照の約50%、21日目には対照の20%であった。熱傷受傷後14日目に採取した脾細胞をCpG ODN存在下で24時間培養した後各種サイトカインの産生能を検討した (図2)。測定した全てのサイトカイン (IL-12, IL-6, IL-1,

TNF) で CpG ODN によるサイトカイン産生能賦活効果を認めた。

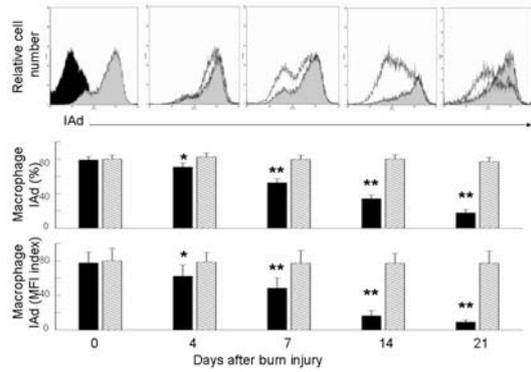


図 1

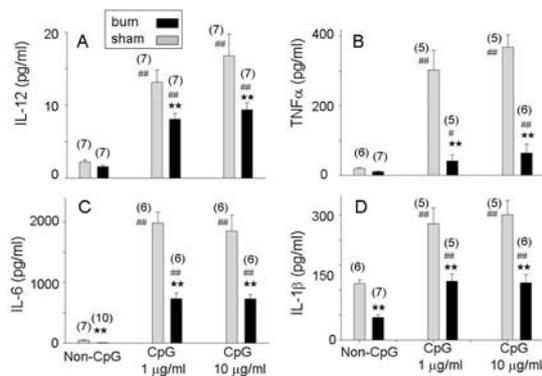


図 2

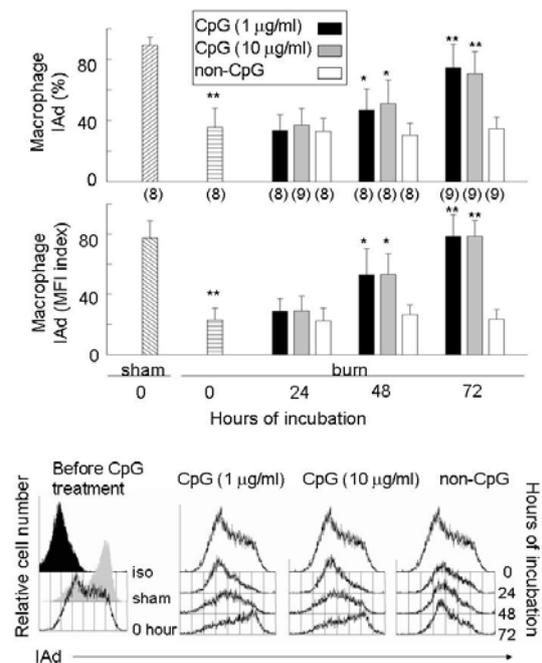


図 3

熱傷マウスから採取した脾細胞における IAd

発現は低下しているものの CpG ODN 存在下では有意な増加を認めた (図 3)。

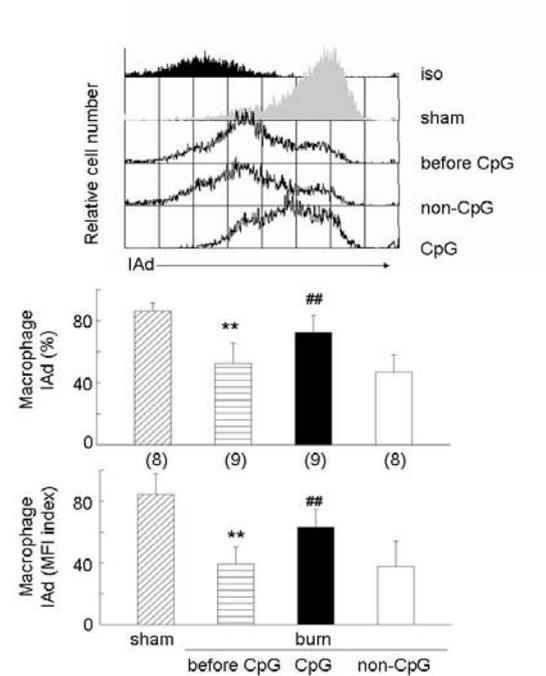


図 4

CpG ODN を熱傷 4 日後のマウスに投与しさらに 10 日間飼育した後脾臓を摘出し脾細胞 IAd 発現を測定した。図 4 に示すとおり CpG ODN 投与マウスは有意に脾細胞 IAd 発現が回復した。

国内外における位置とインパクト

熱傷マウスにおける immunoparalysis を実験モデルで再現した報告は国内では本研究が初めてである。さらに CpG ODN による免疫賦活効果を in vitro, in vivo 両面で証明したことも極めて意義がある。今後 CpG ODN 投与による二次感染予防効果が明らかになれば immunoparalysis に対する画期的な治療に発展しうる可能性がある。

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 4 件)

①武山直志, 田中孝也, 野口 宏, 免疫調節を行うために必要な免疫学的モニタリング、

- 日救急医学会誌、査読有、17、2006、 199-209.
- ②田中孝也, 武山直志, 升田好樹, 新田正和, 原口義座、救急領域における感染症と immunoparalysis、日本救命医療学会誌、査読有、20、2006、 49-53.
- ③田中孝也, 矢吹 輝, 武山直志. 免疫系と サイトカイン、救急医学、査読有、31、2007、 768-9.
- ④Yabuki T, Takeyama N, Tsuda M, CpG oligonucleotides activate the immune response in burned mice, J Surg Res, 査読有, 2009, in press

〔学会発表〕(計3件)

- ①矢吹輝、マウス熱傷モデルにおける immunoparalysis の検討、第32回日本熱傷学会総会、2006. 6、仙台
- ②矢吹輝、CpGDNA による熱傷モデル immunoparalysis の改善効果、第34回日本救急医学会総会、2006. 10、福岡
- ③武山直志、高度侵襲下における immunoparalysis の病態と治療戦略、第35回日本救急医学会総会、2007. 10、大阪

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武山 直志 (TAKEYAMA NAOSHI)
愛知医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00155053

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし