

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16635

研究課題名（和文）新規敗血症モデルと免疫学的先端技術を用いた敗血症免疫反応の解明

研究課題名（英文）Elucidation of sepsis immune response using a novel sepsis model and advanced immunological techniques

研究代表者

土田 拓見 (Tsuchida, Takumi)

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：50838654

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：我々が確立させた敗血症マウスであるFSI(fecal suspension intraperitoneal injection)モデルを用いて、重症疾患後に生じるImmuno-suppression and Catabolism Syndrome (PICS)モデルを作成し、サイトカイン/ケモカイン測定と病理組織学的観察により評価した。その結果、PICSモデルではヒトのPICSと同様のサイトカイン/ケモカイン挙動と組織への炎症細胞浸潤が認められた。PICSモデルに対してリポポリサッカライドを二次的侵襲として投与した際にも同様の特徴が認められた。本研究により、質の高いPICSモデルが確立された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が確立したFSIモデルは、敗血症モデルとして一般的に用いられているCLP(cecal ligation and puncture)モデルと同様の免疫学的、病理組織学的特徴を有している。FSIモデルの敗血症モデルとしての妥当性がすでに示され(T.Tsuchida, et al. Front Med. 2022)、その研究結果は既に多くの論文に引用されている。本研究によりFSIモデルから作成したPICSモデルが確立された。本研究により生み出されたモデルマウスやサイトカイン測定結果をベースとして、今後、敗血症やPICS研究を中心に様々な応用研究が行われることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Using our established mouse model of sepsis, the fecal suspension intraperitoneal injection (FSI) model, we created an Immuno-suppression and Catabolism Syndrome (PICS) model that occurs after severe disease and the PICS model was evaluated by cytokine/chemokine measurements and histopathological observations. The PICS model showed cytokine/chemokine behavior and tissue inflammatory cell infiltration similar to human PICS, and similar characteristics were observed when lipopolysaccharide was administered as a secondary invasion to the PICS model. This study established a high-quality PICS model.

研究分野：敗血症

キーワード：敗血症 PICS

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在までに臨床で有効性が認められた敗血症治療薬は皆無であり、敗血症治療薬の開発は停滞している。敗血症の免疫反応をターゲットとした治療薬が生み出せない主要な原因として、感染に対する免疫応答が関与する敗血症の病態生理が十分に解明されていないことが挙げられる。今日までの敗血症研究には、さまざまな動物モデルが用いられてきた。しかし、動物モデルでは成功した治療薬もヒトの臨床試験ではほとんど有効ではなかった。新規治療薬を開発するための動物モデルは、ヒトの疾患の経過を模倣したものでなければならないが、現在までに開発されてきた敗血症モデル動物にはそれぞれに特有の問題点がある。近年、作成が容易な新規の敗血症モデルマウスである FSI (Fecal Suspension Intraperitoneal Injection) モデルを開発され、敗血症モデルとしての臨床的妥当性を証明されたが、FSI モデルを用いて免疫組織学的な考察が行われた研究はまだない。

### 2. 研究の目的

本研究では、作成が容易で個体差が少ない FSI モデルを用いて、敗血症研究における免疫反応に関して新たな知見を生み出すことを目的とした。さらに、重症疾患後に生じる疾患概念である Immuno-suppression and Catabolism Syndrome (PICS) モデルを FSI モデルから作成し、その妥当性もサイトカイン/ケモカイン測定および病理組織学的観察によって評価した。

### 3. 研究の方法

CLP モデル、FSI モデル、対象群で、腹膜炎発症 20 時間の検体を用いて比較を行った。サイトカイン/ケモカイン測定は、Luminex® 100/200™ (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) を用いたマルチプレックス解析により実施した。病理組織学的評価は、腎臓、脾臓、肺、肝臓のヘマトキシリン・エオジン染色標本を用いて行った。

また、腹膜炎後 2 ヶ月間生存したマウスを PICS マウスと定義した。PICS モデル作成に関する実験は、CLP で作成した PICS モデル (CLP-PICS)、FSI で作成した PICS モデル (FSI-PICS)、および腹膜炎を誘発しない対照群の 3 群において、上記と同様のサイトカイン/ケモカインおよび病理組織を比較した。PICS モデルに対する second-hit として、lipopolysaccharide (LPS) の腹腔内投与も行い、各 PICS モデルの侵襲に対する反応性についても同様の評価方法で検証を行った。腹膜炎発症 20 時間後 (急性期) と 2 ヶ月後 (慢性期) の比較も行うことで、敗血症免疫機構の経時的な変化についても考察した。標本数は各 5 検体で、急性期の摘出臓器のみ各 3 検体とした。

### 4. 研究成果

図 1 には腹膜炎 20 時間後のサイトカイン/ケモカインレベルをヒートマップで示したものである。PICS 群は FSI により作成されたものを示しており、PICS 群のみ 2 度目の腹膜炎後のデータである。腹膜炎を生じているにも関わらず、PICS 群では反応が抑制されていることが良く示されている。PICS 群では、腹膜炎が誘発されていないコントロール群よりもサイトカイン/ケモカインレベルが低下している所見を認めた。

表 1 は 2 度目の感染に対するコントロール群と PICS 群の比較である。結果、CLP-PICS+LPS 群と FSI-PICS+LPS 群では、サイトカイン/ケモカインの特性 (炎症性または抗炎症性) にかかわらず、ほとんどすべて測定項目で抑制が確認された。この傾向は特に CLP-PICS+LPS 群で顕著であった。Control+LPS 群では、LPS 投与により高い炎症反応が誘導された。

図 1 各モデルのサイトカイン/ケモカインの比較

	Control	CLP model	FSI model	PICS model
G-CSF	Green	Red	Red	Green
GM-CSF	Green	Yellow	Red	Green
IFN $\gamma$	Green	Yellow	Red	Green
IL-1 $\alpha$	Green	Yellow	Red	Green
IL-1 $\beta$	Green	Yellow	Red	Green
IL-2	Green	Yellow	Red	Green
IL-4	Green	Yellow	Red	Green
IL-5	Green	Yellow	Red	Green
IL-6	Green	Yellow	Red	Green
IL-7	Green	Yellow	Red	Green
IL-10	Green	Yellow	Red	Green
IL-12(p40)	Green	Yellow	Red	Green
IL-12(p70)	Green	Yellow	Red	Green
IL-13	Green	Yellow	Red	Green
IL-15	Green	Yellow	Red	Green
IL-17	Green	Yellow	Red	Green
IP-10/CXCL10	Green	Yellow	Red	Green
KC/CXCL1	Green	Yellow	Red	Green
MCP-1/CCL2	Green	Yellow	Red	Green
MIP-1 $\alpha$ /CCL3	Green	Yellow	Red	Green
MIP-1 $\beta$ /CCL4	Green	Yellow	Red	Green
MIP-2/CXCL2	Green	Yellow	Red	Green
RANTES/CCL5	Green	Yellow	Red	Green
TNF $\alpha$	Green	Yellow	Red	Green

表1 Second-hit としてのLPS 投与時の各モデルのサイトカイン/ケモカインレベル

	Control+LPS	CLP-PICS+LPS	FSI-PICS+LPS
G-CSF	10000.00 ± 0.00	10000.00 ± 945.34	10000.00 ± 552.19
GM-CSF	63.24 ± 4.12	23.08 ± 4.66*	34.62 ± 4.66*
IFN $\gamma$	46.54 ± 19.22	1.32 ± 1.49**	10.24 ± 3.04*
IL-1 $\alpha$	83.40 ± 19.79	26.24 ± 7.02*	37.20 ± 4.00*
IL-1 $\beta$	4.85 ± 0.88	0.00 ± 1.24*	0.00 ± 0.03*
IL-2	5.79 ± 1.55	0.08 ± 0.22**	8.83 ± 2.42
IL-4	0.76 ± 0.05	0.46 ± 0.65*	0.57 ± 0.12
IL-5	3.32 ± 0.27	1.23 ± 2.28**	3.53 ± 0.79
IL-6	1665.44 ± 467.40	19.72 ± 7.36**	45.34 ± 17.20*
IL-7	3.73 ± 0.28	4.88 ± 0.81	5.58 ± 2.99
IL-9	33.13 ± 13.15	31.70 ± 72.53	7.92 ± 17.19
IL-10	170.94 ± 18.10	7.74 ± 19.51*	22.68 ± 5.76*
IL-12	14.21 ± 2.75	1.00 ± 6.80*	1.00 ± 0.20*
IL-13	58.27 ± 5.99	19.48 ± 2.28*	26.60 ± 3.49*
IL-15	24.33 ± 6.80	13.15 ± 9.93	56.01 ± 37.26
IL-17	36.75 ± 13.52	1.28 ± 36.24*	1.53 ± 0.91*
CXCL-1	2634.54 ± 306.24	37.20 ± 24.77*	115.61 ± 17.28*
CXCL-2	110.18 ± 10.89	1.00 ± 0.00*	1.00 ± 3.02*
CXCL-10	1584.25 ± 102.46	471.18 ± 35.45*	525.96 ± 46.49*
CCL-2	2558.74 ± 311.02	84.00 ± 58.98*	120.84 ± 32.90*
CCL-3	73.10 ± 6.56	44.40 ± 19.33**	79.87 ± 6.32
CCL-4	303.22 ± 88.76	71.52 ± 12.74*	84.63 ± 8.52*
CCL-5	387.99 ± 59.79	23.89 ± 3.46**	51.38 ± 6.26*
CCL-5	387.99 ± 59.79	23.89 ± 3.46**	51.38 ± 6.26*
TNF $\alpha$	23.55 ± 2.01	8.24 ± 0.85*	8.24 ± 1.06*
TGF- $\beta$ 1	5.00 ± 0.60	6.50 ± 0.23	6.00 ± 0.27
TGF- $\beta$ 2	17.50 ± 1.03	15.75 ± 1.33	14.00 ± 0.57
TGF- $\beta$ 3	6.00 ± 0.17	6.00 ± 0.22	6.00 ± 0.09

データは中央値±標準誤差で表示。単位はすべて pg/ml。

\*コントロール+LPS 群と有意差あり (p 値 < 0.05)。

# FSI-PICS+LPS 群と有意差あり (p 値 < 0.05)

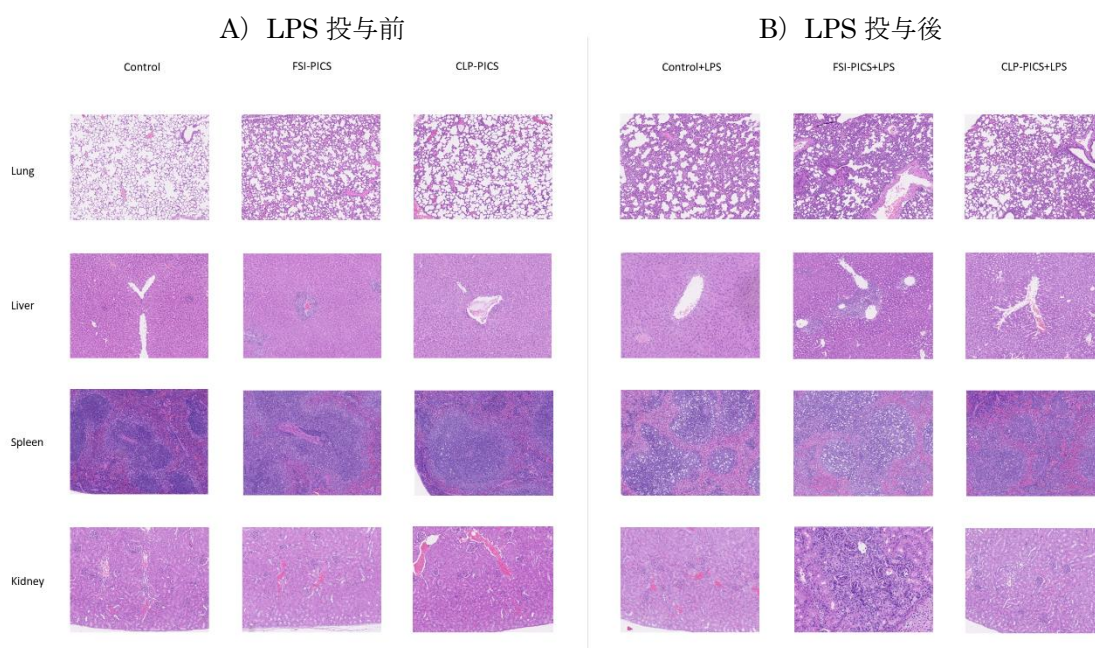
表2は腹膜炎発症20時間後(急性期)、2ヶ月後(慢性期/PICS)、および2か月後+LPS投与(FSI+LPS、CLP+LPS)の病理組織学的所見を比較したものである。脾臓のマクロファージの出現はFSI+LPS、CLP+LPSともに2度目の炎症惹起で抑制されていた。肺のうっ血に関してはそれぞれFSI+LPSとFSI、CLP+LPSとCLPで差は無かった。腎臓についてはFSI+LPSで糸球体の数珠状の脱落が見られ、循環不全を示唆する可能性があった。肝臓においてはFSI+LPSでは逆行性胆管炎を示唆する所見が存在した。FSI急性期およびFSI+LPSでは門脈内での好中球が目立っていた。以上より2度目の炎症惹起では免疫反応が遅れる、または弱くなっているために重症化している可能性が示唆されたが、臓器虚血による重症度の差は明らかでなかった。

表 2 敗血症急性期および慢性期に対する LPS 投与前後における病理組織学的所見の比較

	FSI急性期	FSI慢性期	FSI+LPS	CLP急性期	CLP慢性期	CLP+LPS	LPS	Control
肺	うっ血高度	うっ血なし	うっ血高度	うっ血中等度	うっ血なし	うっ血中等度	うっ血中等度	うっ血なし
肝臓	0/3例で急性胆管炎、1/3例で門脈内の好中球、0/3例で肝細胞の変性	0/5例で急性胆管炎、0/5例で門脈内の好中球、0/5例で肝細胞の変性	2/5例で急性胆管炎、4/5例で門脈内の好中球、0/5例で肝細胞の変性	0/3例で急性胆管炎、0/3例で門脈内の好中球、0/3例で肝細胞の変性	0/5例で急性胆管炎、0/5例で門脈内の好中球、0/5例で肝細胞の変性	0/5例で急性胆管炎、1/5例で門脈内の好中球、0/5例で肝細胞の変性	0/4例で急性胆管炎、1/4例で門脈内の好中球、0/4例で肝細胞の変性	なし
腎臓	なし	なし	腎糸球体の数珠状の硬化が2/5例で見られる	なし	なし	なし	なし	なし
脾臓のマクロファージ	3/3例で高度	1/5例で軽度、4/5例でなし	2/5例で高度、1/5例で中等度、2/5例で軽度	2/3例で中等度、1/3例で軽度	2/4例で軽度、2/4例でなし	1/4例で中等度、3/4例で軽度	4/5例で高度、1/5例で中等度	5/5例でなし

図 2 は Second-hit としての LPS 投与前後の各 PICS モデルの病理組織学的所見である。LPS 投与前の肺、肝臓、腎臓においては、対照群と PICS 群との間に有意差は認められなかった (図 2A)。しかし、FSI-PICS 群と CLP-PICS 群では、脾臓に軽度のマクロファージ浸潤が観察された。LPS 投与後では、各群で所見がわずかに異なっていた (図 2B)。LPS 投与後の肺では、全群で肺うっ血が認められ、FSI-PICS+LPS 群、コントロール+LPS 群、CLP-PICS+LPS 群の順に強かった。腎臓では、FSI-PICS+LPS 群の 2 匹に糸球体の脱落が認められたが、他の群では認められなかった。肝臓では、FSI-PICS+LPS 群の 2 匹にのみ急性胆管炎が観察された。門脈への好中球浸潤は FSI-PICS+LPS 群で 4 例、CLP-PICS+LPS 群とコントロール+LPS 群で各 1 例に認められた。脾臓では、マクロファージ浸潤は FSI-PICS+LPS 群と control+LPS 群で高度、CLP-PICS+LPS 群で中等度であった。

図 2 Second-hit としての LPS 投与前後の各 PICS モデルの病理組織学的所見



本研究の結果、PICS モデルではヒトの PICS と同様のサイトカイン/ケモカイン挙動と組織への炎症細胞浸潤が認められた。PICS モデルに対して LPS を二次的侵襲として投与した際にも広範な免疫抑制状態を呈しており、ヒトの PICS と同様の特徴が認められた。また CLP と FSI の間に大きな差は無く、FSI モデルの妥当性が示された。今後、本研究結果をもとに個体差の少ない FSI モデルが普及することが期待される。また、網羅的なサイトカイン/ケモカイン測定結果を提供したことにより、本研究結果は今後の敗血症免疫、PICS 免疫に関する研究の重要なエビデンスになりうる。

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 Tsuchida Takumi, Wada Takeshi, Mizugaki Asumi, Oda Yoshitaka, Kayano Katsuhide, Yamakawa Kazuma, Tanaka Shinya	4. 巻 9
2. 論文標題 Protocol for a Sepsis Model Utilizing Fecal Suspension in Mice: Fecal Suspension Intraperitoneal Injection Model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Medicine	6. 最初と最後の頁 765805
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmed.2022.765805	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

本研究結果を応用したPICSモデルに関する研究成果は現在論文投稿準備中の状態です。

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------