

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861721

研究課題名(和文)インフラマソームを標的とした新規敗血症治療法の開発

研究課題名(英文)A novel therapy for sepsis targeted to the inflammasome

研究代表者

田島 吾郎(TAJIMA, Goro)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：00437427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：自然免疫系の新規炎症起動システムであるインフラマソーム(inflammasome)を標的とした敗血症治療法の開発を目的に、マウス腹膜炎モデルを用いて免疫担当細胞の活性化とインフラマソームの活性化を測定し、Caspase-1遮断薬を用いてインフラマソーム遮断効果を評価した。腹膜炎マウスにおいて免疫系細胞は炎症マーカーの上昇を認め、インフラマソームの活性化(Caspase-1活性化、NALP3発現)、また自然免疫受容体の発現は上昇を認めた。インフラマソーム遮断薬の前投与により、免疫系細胞は炎症マーカー、インフラマソームの活性化の低下と、自然免疫系受容体の発現においては更なる上昇を認めた。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop a novel therapy of sepsis targeting for inflammasome, which is responsible for activation of inflammatory process in innate immune system. We measured activation of immune cells and inflammasome in murine sepsis model, and evaluated the effect of blocking inflammasome using blocking reagent of caspase-1. In murine sepsis model, immune cells showed increase of activation markers and inflammasome activation (caspase-1, NALP3), and innate immune receptors. Prior administration of inflammasome inhibitor reagent decreased the expression of activation markers and inflammasome activation, and increased the expression of innate immune receptors in immune cells.

研究分野：救急医学

キーワード：インフラマソーム 敗血症 自然免疫 SIRS

### 1. 研究開始当初の背景

敗血症治療は、抗生剤による原因菌治療、全身管理（生理学的治療）、全身炎症コントロール（生化学的治療）が中心となる。抗生剤、輸液、人工呼吸器、人工腎臓（血液透析）の進歩により系統だった治療法が確立されてきた。一方、敗血症の生化学的メカニズムの理解は侵襲学として、炎症、免疫、凝固など様々な方面から研究されているが、未だ混沌としており、生化学的アプローチからの全身炎症に対する有効な治療法は皆無である。インフラマソームは 21 世紀はじめに、細胞質内で caspase-1 を介し IL-1 $\beta$  を活性化する炎症起動システムとして報告された (Martinon F et al:2002, Mol Cell)。自然免疫系受容体である Pattern Recognition Receptors (PRRs) の一つ、Nod-Like Receptors (NLRs) が異物を認識し、NLR 以下のアダプター分子群が集合し巨大蛋白複合体を構成し、caspase-1 の活性化により IL-1 $\beta$ 、IL-18 の活性化体へのプロセッシングを行う。IL-1 $\beta$ 、IL-18 は炎症早期に発現し、NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$  を誘導し、炎症反応の成立において根本的な役割を果たす。

インフラマソームの発見以来、これまで知られていたさまざまな炎症性疾患が、インフラマソームが原因で引き起こされていることが明らかとなっている。Sepsis においても、国内外でインフラマソームの活性化が報告され、中でも NLR のひとつである NLRP3 を介した機序が最も注目されている (Costa A et al:2012, J Immunol)。

我々はこれまで侵襲時の過剰免疫反応と免疫不全状態に着目し、免疫担当細胞の活性化とコミュニケーションについて研究し、過剰侵襲時の抑制性反応と炎症性反応のバランスを指摘したが、調節するメディエーターは特定できていない。インフラマソームによりプロセッシングされる IL-1 ファミリーは炎症の極初期におこる反応で、NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$  とそれに続く炎症、抗炎症反応を制御するキー

メディエーターとなる可能性がある。インフラマソームを治療の標的とすることで、敗血症における複雑な炎症カスケードの根本に介入できるのではないかと考え、本研究を計画するに至った。

### 2. 研究の目的

本研究の目的はインフラマソーム (inflammasome) を標的とした敗血症治療法を開発することである。自然免疫系の新規炎症起動システムであるインフラマソームに着目し、以下 2 点に絞って研究を実施した。

【1】マウス敗血症モデルにおける局所と全身における免疫担当細胞の活性化とインフラマソームの活性化を明らかにする。【2】マウス敗血症モデルにおけるインフラマソーム遮断薬 (Caspase-1 遮断薬) 投与による各免疫担当細胞の活性化、インフラマソームの活性化の変化を評価し、インフラマソーム遮断による炎症制御メカニズムを明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究では、動物モデルを中心に、免疫担当細胞におけるインフラマソームの活性化、インフラマソームの遮断による敗血症生存率と各免疫担当細胞活性化へ及ぼす影響を評価した。

【1】敗血症モデルとしてマウス腹膜炎モデルを用い、局所と全身における免疫組織での各免疫担当細胞の活性化、自然免疫受容体の発現とインフラマソーム活性化を評価した。

(a) マウス腹膜炎モデル (Cecal Ligation and Puncture : CLP)

CLP は腹膜炎モデルとして確立されたモデルで、敗血症研究に広く用いられている (Hubbard WJ et al: 2005, SHOCK)。本研究モデルは、開腹後、盲腸を根部で結紮、23G 針で 1 回貫通するもので、死亡率が約 80% の致死的な重症敗血症モデルである (control

群では開腹術のみ)、受傷 24 時間後にリンパ組織(脾臓、腸間膜、鼠径リンパ節)のサンプリングを行った。

(b) リンパ組織(脾臓、腸間膜、鼠径リンパ節)の免疫担当細胞の活性化

局所リンパ節として腸間膜、鼠径リンパ節、全身への影響を反映するリンパ組織として脾臓をサンプリングした。各免疫担当細胞を同定するマーカーはマクロファージ:F4/80、好中球:Gr-1、ヘルパーT細胞:CD4 とする。免疫担当細胞の活性化は抗原提示細胞では CD80,86、T細胞は CD28、CD62L の表面抗原を、更に TLR(Toll Like Receptor)2,4,9 を免疫染色してフローサイトメトリー法で測定した。

(c) 免疫担当細胞のインフラマソーム活性化

各免疫担当細胞におけるインフラマソーム活性化は、活性型 caspase-1 測定のため、FLICA™(Fluorescent-Labeled Inhibitor of Caspases) キット (Immunochemistry Technologies) と NALP3 を用いて染色した。いずれも測定はフローサイトメトリー法で行った。

【2】マウス敗血症モデルを用い、インフラマソーム遮断薬(Caspase-1 遮断薬)による各免疫担当細胞の活性化、インフラマソーム活性化の変化を評価した。

(a) インフラマソーム遮断薬と投与方法

インフラマソーム遮断には caspase-1 遮断薬 : Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-chloromethyl ketone (AC-YVAD-CMK) (Cayman Chemical) を用いた(Osuka A et al:2011, SHOCK)。投与のタイミングは臨床的な治療を考えると受傷後からの投与が現実的であるが、インフラマソーム遮断による病態を明確に評価するため CLP 施行 2 時間前に AC-YVAD-CMK 10mg/kg を腹腔内投与とした(control 群では生食投与)。

(b) インフラマソーム遮断による各免疫担

当細胞の活性化、インフラマソーム活性化の変化

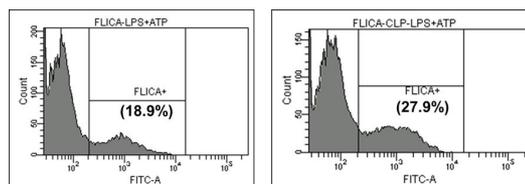
AC-YVAD-CMK 投与、CLP 受傷 24 時間後に【1】と同様に各リンパ組織をサンプリングし、免疫担当細胞の活性マーカーと TLRs を免疫染色して、インフラマソーム活性化は FLICA™ キットと NALP3 を用いて染色し、測定はフローサイトメトリー法で行った。

#### 4. 研究成果

【1】CLP 群においてマクロファージ、好中球などの自然免疫系細胞は CD80、CD86 などの炎症マーカーの上昇を認め、獲得免疫系のヘルパーT細胞でも CD62L などの炎症マーカーの上昇を認めた。

インフラマソームの活性化については FLICA™ による Caspase の活性化を認め(図1)、NALP3 の細胞内染色で、NALP3 インフラマソームの活性化を認めた。また、自然免疫系細胞では TLR2,4 の発現は上昇を認めたが、TLR9 は低下を認めた。

(図1)

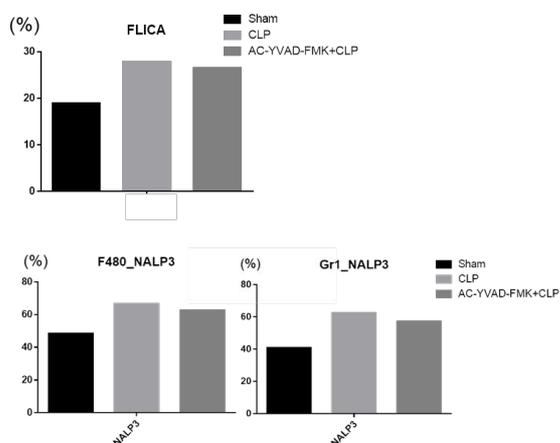


【2】インフラマソーム遮断効果の評価のため、マウスに AC-YVAD-FMK を前投与して CLP を施行した。インフラマソーム遮断により、マクロファージ、好中球においては CD80、CD86 の低下を認め、ヘルパーT細胞でも CD62L の低下を認めた。FLICA™ による Caspase の活性化は軽度低下し、NALP3 インフラマソームの活性化の低下を確認した。(図2)

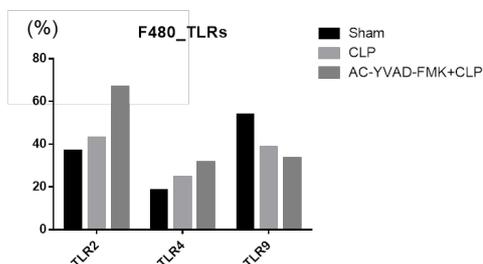
自然免疫系細胞では TLR2,4 の発現は更なる上昇を認めたが、TLR9 は低下を認めた。(図3) また、敗血症患者の全身性炎症反応の基礎的なデータ、病態を解析してまとめ報告したが、今後は臨床検体の患者白血球におけるインフラマソームの活性化とインフラマソ

ーム遮断効果の検討が必要である。

(図 2)



(図 3)



## 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 1 件)

1) Tajima G, Shiozaki T, Izumino H, Yamano S, Hirao T, Inokuma T, Yamashita k, Nagatani A, O nishi M, Hirose T, Shimazu T, Hamasaki T and Tasaki O: Portable system for monitoring of regional cerebral oxygen saturation during prehospital cardiopulmonary resuscitation: a pilot study. Acute Medicine & Surgery, 2015; 2: 48-52 (査読有)

[学会発表](計 2 件)

1) 田島 吾郎, 塩崎 忠彦, 泉野 浩生, 山野 修平, 猪熊 孝実, 平尾 朋仁, 山下 和範, 長谷 敦子, 田崎 修  
ドクターカーによる病院前心肺蘇生におけ

る脳局所酸素飽和度モニタリングシステム  
第 34 回日本救急医学会 福岡国際会議場・  
福岡サンパレス (福岡) 2014 年 10 月 17 日  
2) 田島 吾郎, 泉野 浩生, 山野 修平, 猪熊 孝実, 平尾 朋仁, 山下 和範, 長谷 敦子, 田崎 修 長崎大学病院救命救急センターにおける DIC に対するリコモジュリンの使用例の検討”長崎 SIRS 研究会 ホテルニュー長崎 (長崎) 2013 年 9 月 12 日

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田島 吾郎 (TAJIMA, Goro)  
長崎大学・病院 (医学系)・助教  
研究者番号: 00437427

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号: