

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462773

研究課題名(和文) 侵襲時の生体防御不全対策としての貪食細胞活性化

研究課題名(英文) The therapeutic strategy for burn-induced immunosuppression: Regulation of phagocytes function.

研究代表者

宮崎 裕美 (MIYAZAKI, Hiromi)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・防衛医学研究センター・助教)

研究者番号：30531636

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：熱傷後は主として好中球などが産生する活性酸素(ROS)が臓器障害を惹起し、これにより生体防御能が破綻し感染などへの抵抗性が減弱すると言われている。熱傷によって産生されるROSを消去することが受傷後の生体防御能にどのような変化を与えるか、好中球の機能に着目し検討した。その結果、広範囲熱傷によって産生されるROSの産生を質的・量的に制御することは、受傷後に低下する貪食細胞の機能に影響を与え、易感染病態の回避、ひいては受傷後感染の予後を改善することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Although reactive oxygen species (ROS) basically play beneficial roles to maintain host homeostasis against external disturbance including infection, excessive ROS generation by activated neutrophils can cause organ damage. We investigated the role of burn-induced ROS generation in the injured hosts, focusing on postburn infection. Inhibition of the ROS production during/immediately after injury did not improve the burn-induced susceptibility to infection or the neutrophil dysfunction. Interestingly, inhibition of the subsequent ROS production potentially restored the neutrophil functions and hematopoietic function of the bone marrow cells, thereby improving the postburn infection. Although the inhibition of burn-evoked ROS generation is effective against burn-induced organ injury, it may be ineffective against postburn infection. Preservation of the immediate burn-evoked ROS production, but the inhibition of subsequent ROS production, may be crucial to protect against postburn infection.

研究分野：救急医学

キーワード：侵襲 活性酸素 好中球 貪食活性

### 1. 研究開始当初の背景

広範囲熱傷や多発外傷、大手術など重度侵襲が生体に加わるとその生体防御機構は破綻し易感性となり、医療技術が進歩した近年においても、感染併発の危険性が増す。事実、広範囲熱傷の主な死因は免疫機能低下に起因する重症感染症であり、敗血症によって死に至る患者が減少しない。これまでの知見から、炎症応答の抑制のみでは敗血症対策とはなり得ず、免疫賦活化による対処療法も、過剰な免疫応答を誘導する可能性が示唆されている。

感染防御に重要な役割を担う食細胞(好中球やマクロファージ)は、ミトコンドリアの電子伝達系と並び、生体内での主要な活性酸素種(ROS)産生源である。ROSは病原体の殺菌・排除など、宿主防御に必要であるとともに、細胞内のシグナル分子、すなわちセカンドメッセンジャーとして作用し、細胞機能の制御に重要な役割を担っている。一方で、侵襲時には、好中球の活性化が起こりROSやプロテアーゼが過剰に産生され、酸化ストレスによる臓器や細胞機能の障害を惹起する。しかしながら、侵襲後による好中球やマクロファージなどの自然免疫をはじめ、免疫細胞の機能低下に由来する生体防御能の破綻と感染抵抗性の減弱化、さらにはそれに関わるROS産生の影響について未だ不明な点が多い。したがって、「ROSシグナルの質的・量的な制御異常が恒常性制御を破綻させる」という新機軸から、侵襲時の生体防御に対し、諸刃の剣と考えられるROS産生の意義について検討し生体防御調節機構について詳細に研究をすすめることは、重度侵襲である広範囲熱傷時の感染合併症の発生、救命率の向上を目指した感染症対策の確立に有用であると考えた。

### 2. 研究の目的

広範囲熱傷や多発外傷などの重度侵襲では、生体防御能が減弱化し易感性となり、この感染併発が予後をさらに不良とする。とくに好中球やマクロファージなどの貪食系細胞は病原体を直接貪食排除することから、その機能不全は感染抵抗性の消失に直結する。一方、侵襲刺激などによる貪食系細胞の過度の活性化は活性酸素(ROS)や炎症性サイトカインの過剰産生を惹起し臓器・組織を傷害するため、これら細胞機能の適切な制御・活性化を図ることが侵襲時の重要な治療戦略と考える。そこで、重症熱傷によって産生されるROSを制御することにより、主要なROS産生細胞である食細胞の機能にあたる影響について検討し、生体防御機能の異常化(paralysis)、感染併発の回避、さらには救命率の向上を目指した有用な感染対策の確立を図ることが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

熱傷によって産生されるROSを消去するこ

とが受傷後の生体防御能にどのような変化を与えるか、好中球・マクロファージの機能に着目し検討するために、下記の研究を行った。

広範囲熱傷後のROS産生による臓器・細胞障害性に対するラジカルスカベンジャーの投与効果

マウス広範囲重症熱傷モデルに対し、ラジカルスカベンジャーとしてSODを投与し、受傷6時間後に肺胞洗浄液中のアルブミン濃度を測定し肺血管透過性を評価した。また、フローサイトメトリーにて好中球ROS産生量について評価した。マウスは、受傷直前にSODを投与するpre SOD群、受傷1時間後にSODを投与するpost SOD群、対照群として生理食塩水を投与する未治療群(Vehicle群)の3群に分けた。

熱傷受傷後の細菌感染に対するSODの投与効果

研究と同様にSODを投与した熱傷モデルを用いて、受傷5日後に大腸菌を尾静脈から接種する感染モデルを作成し、7日後までの予後を評価した。また、血中及び肝臓中の差異菌数を測定した。

ROS産生制御による受傷後の好中球及び骨髄機能の評価

研究と同様にSODを投与した熱傷モデルを用いて、受傷5日後の好中球及び骨髄細胞を採取し、ROS産生能、貪食能、アポトーシス陽性細胞、さらに骨髄造血幹細胞マーカーの発現についてフローサイトメトリーにて解析した。

### 4. 研究成果

広範囲熱傷後のROS産生による臓器・細胞障害性に対するラジカルスカベンジャーの投与効果

熱傷受傷6時間後の好中球の細胞内ROS産生量を測定したところ、未治療群では著しく上昇していたのに対し、pre SOD群、post SOD群ともに正常レベルまで低下していた(図1)。

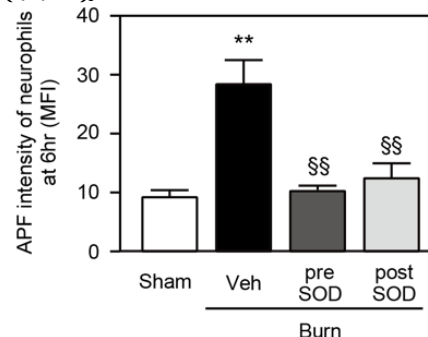


図1. 受傷6時間後の好中球活性酸素産生量. mean±SE. \*\* p<0.01 vs. sham; § § p<0.01 vs. burn vehicle.

また、肺胞洗浄液中のアルブミン濃度を測定したところ pre SOD群は未治療群と比較し

て有意に低下し、血管透過性亢進の改善効果を示した。一方、ROS 産生量は軽減されていた post SOD 群では、未治療群と比較してアルブミン濃度に有意な変化はなく、血管透過性亢進の改善効果は示さなかった。

#### 熱傷受傷後の細菌感染に対する SOD の投与効果

受傷後の大腸菌感染に対し、未治療群では 24 時間以内に敗血症性ショックに陥り約 80% が予後不良となったが、post SOD 群では 80% が生存し、7 日後までの生存率は約 55% であり予後が有意に改善していた。一方、pre SOD 群では対照群と同様に 24 時間までに敗血症性ショックによって 80% が予後不良であった (図 2)。

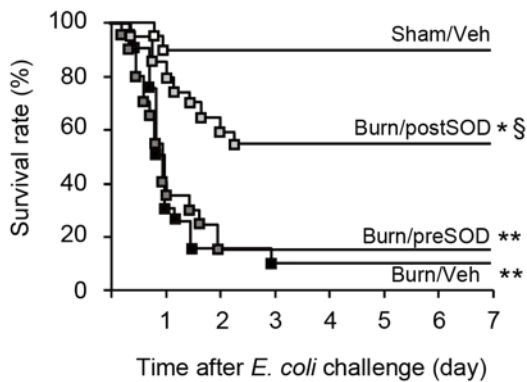


図2. 受傷後大腸菌感染の生存率。  
\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. sham; §  $p < 0.05$  vs. burn vehicle.

受傷 1 時間後に SOD を投与した post SOD 群で予後改善効果が見られたのに対し、受傷直後から ROS 産生を抑制させた pre SOD 群には改善効果がなかったことから、受傷後の ROS 産生は生体恒常性を保つ一面をも持つものと示唆された。

#### ROS 産生制御による受傷後の好中球及び骨髄機能の評価

受傷 5 日後の好中球内 ROS 産生能を評価したところ、未治療群では PMA 刺激に対し過剰な ROS を産生させていたが、post SOD 群では PMA 刺激による ROS 産生が非熱傷マウスと同程度を示し正常化していた。一方、pre SOD 群では未治療群と同様に過剰な

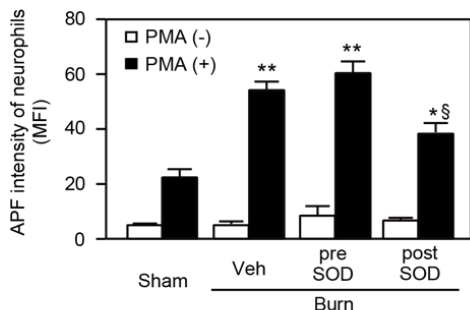


図3. PMA刺激による好中球活性酸素産生。  
\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. sham; §  $p < 0.05$  vs. burn vehicle.

ROS 産生を示し、感染時のショック緩和作用が得られない可能性が示唆された (図 3)。また、受傷 1、3、5 日後の好中球貪食活性を検討したところ、未治療群と pre SOD 群では 5 日後に最も貪食活性が減弱化していたのに対し、post SOD 群では減弱化が軽減していた (図 4)。

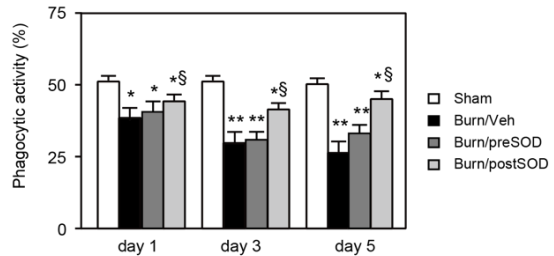


図4. 熱傷受傷後の好中球貪食活性。  
\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. sham; §  $p < 0.05$  vs. burn vehicle.

post SOD 群ではアポトーシス陽性細胞の割合が非熱傷群と同程度にまで回復していた (図 5)。

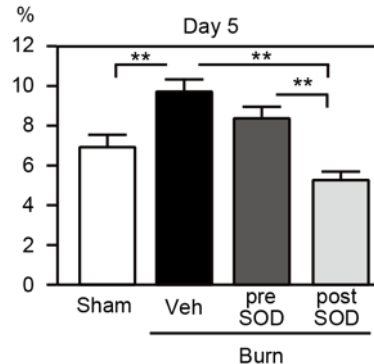


図5. 受傷5日後のアポトーシス陽性細胞。  
\*\*  $p < 0.01$ .

これは、骨髄の造血肝細胞マーカー (c-Kit) 陽性のミエロイド細胞数が post SOD 群においてのみ増大していたことが関与した可能性が示唆された (図 6)。

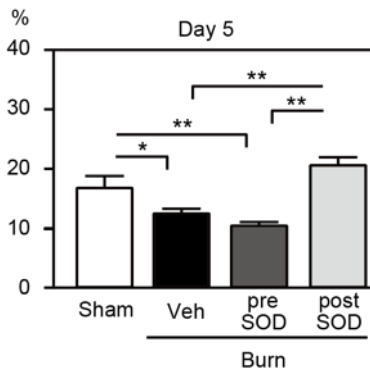


図6. 受傷5日後の骨髄c-Kit陽性ミエロイド細胞。  
\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

以上の研究によって、広範囲熱傷によって産生される ROS の産生を質的・量的に制御することは、受傷後に低下する貪食細胞の機能に影響を与え、易感染病態の回避、ひいては

受傷後感染の予後を改善することが明らかとなった。

## 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5件)

Miyazaki H, Kinoshita M, Ono S, Seki S, Saitoh D. Burn-evoked reactive oxygen species immediately after injury are crucial to restore the neutrophil function against postburn infection in mice. *Shock*. 44:252-257, 2015. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000404. 査読有. Zulaziz N, Azhim A, Himeno N, Tanaka M, Satoh Y, Kinoshita M, Miyazaki H, Saitoh D, Shinomiya N, Morimoto Y. Photodynamic therapy mediates innate immune responses via fibroblast-macrophage interactions. *Hum Cell*. 28:159-166, 2015. DOI: 10.1007/s13577-015-0118-2. 査読有.

Kubo T, Ono S, Miyazaki H, Saitoh D, Yamamoto J, Hase K. Perioperative programmed death 1 expression on CD4<sup>+</sup> T cells predicts the incidence of postoperative infectious complications. *Shock*. 44:323-329, 2015. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000419. 査読有.

Miyazaki H, Miyawaki H, Satoh Y, Saiki T, Kawauchi S, Sato S, Saitoh D. Thoracic shock wave injury causes behavioral abnormalities in mice. *Acta Neurochir (Wien)*. 15:2111-2120, 2015. DOI:10.1007/s00701-015-2613-3. 査読有. Nakashima H, Nakashima M, Kinoshita M, Ikarashi M, Miyazaki H, Hanaka H, Imaki J, Seki S. Activation and increase of radio-sensitive CD11b<sup>+</sup> recruited Kupffer cells/macrophages in diet-induced steatohepatitis in FGF5 deficient mice. *Sci Rep*. 6:34466, 2016. DOI: 10.1038/srep34466. 査読有.

[学会発表](計8件)

Miyazaki H, Kinoshita M, Ono S, Seki S, Saitoh D. Burn-evoked reactive oxygen species immediately after injury are important to restore the neutrophil function against post-burn infection in mice. 第43回日本免疫学会学術集会, 京都, 2014年12月.

宮崎裕美, 木下学, 関修司, 齋藤大蔵. エンドトキシントレランス時の Kupffer 細胞の殺菌能増強による致死的大腸菌感染の劇的な予後改善効果. 第30回日本ショック学会, 東京, 2015年5月.

Miyazaki H, Kinoshita M, Seki S, Saitoh D. Burn-evoked reactive oxygen

species after injury are crucial to restore the neutrophil function in mice. 15th International Conference on Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis and Antioxidants, Paris, France, 2015年6月.

木下学, 宮崎裕美, 高橋哲也, 関修司. (シンポジウム)外科侵襲時の食細胞制御の重要性-炎症性サイトカイン抑制と食細胞活化-. 第52回日本外科代謝栄養学会, 2015年7月.

Miyazaki H, Kinoshita M, Nakashima M, Nakashima H, Seki S, Saitoh D. Kupffer cell phenotype alteration by repeated low dose endotoxin contributes to survive against the lethal bacterial infection. 39th Annual Conference on SHOCK, Austin, USA, 2016年6月.

Miyazaki H, Kinoshita M, Seno S, Tomura S, Seki S, Saitoh D. PPAR-agonist protects burn-injured mice from bacterial infection. 18th Congress of International Society for Burn Injuries, Miami, USA, 2016年8月.

Miyazaki H, Kinoshita M, Nakashima H, Nakashima M, Seno S, Sekine Y, Tomura S, Seki S, Saitoh D. Pioglitazone restores phagocytic activity and ameliorates postburn infection in mice. 8th Congress of the International Federation of Shock Societies, Tokyo, 2016年10月.

宮崎裕美, 木下学, 瀬野宗一郎, 戸村哲, 関修司, 齋藤大蔵. 核内受容体活性化を介した重症熱傷後の細菌感染症対策. 第44回日本救急医学会総会・学術集会, 東京, 2016年11月.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

宮崎 裕美 (MIYAZAKI, Hiromi)

防衛医科大学校・防衛医学研究センター・助教

研究者番号: 30531636

### (2)研究分担者

齋藤 大蔵 (SAITOH, Daizoh)

防衛医科大学校・防衛医学研究センター・教授

研究者番号: 90531632

小野 聡 (ONO, Satoshi)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号: 30531355

木下 学 (KINOSHITA, Manabu)

防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・准教授

研究者番号: 70531391