

(第7号様式)

学位論文審査結果の要旨

氏名	馬越 健介
審査委員	主査 竹中 克斗 副査 山下 政克 副査 江口 真理子 副査 高田 康德 副査 吉田 理

論文名 死亡しないマウス敗血症モデルにおける経時的免疫学的解析：
Bリンパ球減少と起炎症・抗炎症反応

審査結果の要旨

【背景と目的】

敗血症は、感染に対する生体反応の統御不全により多臓器不全を呈する状態である。集中治療医学の進歩にも関わらず死亡率は高く、敗血症に対する有効性の高い治療法開発が希求されてきた。病原菌に対する全身性の起炎症反応が敗血症における多臓器不全の原因とみなされてきたが、敗血症における免疫反応では、起炎症反応だけではなく病原体の増殖を許すような抗炎症反応も惹起され、現在では免疫抑制状態が予後不良因子として重視されている。これまで、げっ歯類を用いた盲腸結紮穿孔(CLP)による腹膜炎からの敗血症モデルによる研究が行われてきたが、CLPモデルでは、動物の死亡率が50%を超え、免疫反応の経時的な分析を行うことが困難であった。本研究では、CLPモデルを改良し、広域抗生剤、補液、低体温予防により、100%の生存を得ることに成功し、CLP後72時間までの免疫反応の変化を詳細に解析した。

【材料と方法】

C57BL/6マウス、オス8-9週齢をCLPモデルに用いた。CLP施行後3時間で、抗生物質メロペネムと維持輸液を皮下投与した。この3時間はマウスをヒートパッド上に置き、低体温を防いだ。CLP施行後、0、6、12、24、48、72時間後に心臓穿刺による採血、脾臓組織の採取を行い、血球数とフローサイトメトリー分析を行った。脾細胞は、フローサイトメトリー分析、および定量RT-PCRによるmRNA発現の変動を調べた。

【結果】

CLP後、保温しなければ72時間後までに56.2%のマウスが死亡したが、保温すれば死亡率は0%となり、以後はマウスを保温して経時変化を追求した。全血算では、赤血球、白血球には大

きな変動はなく、血小板数は減少した。フローサイトメトリー解析では、6時間後の好中球増加とBリンパ球の減少が顕著で、Bリンパ球減少は観察期間中持続した。しかし、制御性B細胞(Breg)数は維持されていた。脾臓では、6時間後に起炎症性サイトカイン、抗炎症性サイトカイン、免疫チェックポイント分子PD-L1の急激な発現上昇がみられた。抗炎症反応が、先行する起炎症性反応に誘発されているのか明らかにするために、デキサメサゾンで起炎症反応の抑制を試みたが、Bregはさらに増加し、抗炎症反応はむしろ増悪した。

【結論】

盲腸結紮穿孔CLPによる標準的なマウス敗血症モデルにおいて生じる低体温を阻止することで、マウスの個体死を完全に抑制できることを見出した。このモデルを用いて、CLP後の免疫反応を経時的に解析した。従来は、敗血症では、起炎症反応から抗炎症反応へ移行すると考えられていたが、本研究で、ごく早期から起炎症反応と抗炎症反応が並行して生じ、B細胞の急激な減少が早期から持続することが明らかとなった。一方、Bregは維持され、IL-10とPD-L1を発現し、その後の起炎症反応の抑制の起点となる可能性を明らかにした。本研究により、敗血症へのPD-1/PD-L1相互作用の阻害やB細胞死の抑制、Breg活性化抑制、あるいは低体温阻止が新たな敗血症の治療法となる可能性が示された。

本論文に対する公開審査会は、平成31年2月4日に開催され、申請者は、研究内容を英語で明確に発表した後に、審査員から本研究に関する以下の質問がなされた。

- 1) 保温マウスと保温していないマウスの実験条件について。および、保温なしで生存したマウスを含めて、マウスのB細胞、サイトカインの変動、免疫抑制の定義について。
- 2) CLP敗血症モデルの全血算の変化について、および、Bリンパ球の減少についてアポトーシスを直接検出しているかについて。
- 3) 本CLPモデルでのTリンパ球のPD-1発現、Bリンパ球減少に伴う免疫グロブリンの変化、B1 B細胞IL-17について。
- 4) 腹腔内マクロファージ、リンパ球の解析について。
- 5) このモデルで生存したマウスと死亡したマウスで起炎症と抗炎症のバランスに差があるか。起炎症反応と抗炎症反応が初期から同時に生じているのであれば、初期から免疫抑制に対する治療の必要性についての考察。
- 6) 制御性T細胞の増加は敗血症の予後を増悪させるが、エンドトキシン吸着で制御性T細胞は減少する。このモデルではどうか。
- 7) デキサメサゾンの作用時間を考慮し、48時間、72時間後の起炎症反応と抗炎症反応のバランスについては検討したか。
- 8) 治療モデルとして、PD-1/PDL-1阻害の可能性を述べているが、治療を要する判断の指標となるマーカーが存在するか。PD-1/PD-L1阻害による治療のこれまでの知見について。

これらに対して申請者は、質問の意図を十分に理解した上で、詳細かつ明確に応答した。

本論文は、敗血症において、ごく早期から起炎症反応と抗炎症反応が並行して生じ、制御性B細胞が、その後の起炎症反応の抑制の起点となる可能性を初めて明らかにし、敗血症治療の新規治療法の開発に重要な知見を含んでおり、今後の研究の発展が期待される。

審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。