

学位論文の要約 (研究成果のまとめ)

氏名 馬越健介

学位論文名 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

学位論文の要約

【背景】

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非常に高く、敗血症に対する有効性の高い新たな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、全身性炎症反応症候群 SIRS として定義づけられてきた。しかし、敗血症における免疫反応は、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あるいは免疫不全(immunoparalysis)状態も惹起され、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。しかし、抗炎症反応や免疫不全状態に関する知見は臨床研究から得られたものが多く、敗血症発症時点の特定が困難な臨床症例の免疫学的分析には限界がある。そのため、げっ歯類を用いた盲腸結紮穿孔(Cecum ligation and puncture; CLP)による腹膜炎からの敗血症モデルによる研究が盛んに行われてきた。しかし、CLP モデルでは通常、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。今回我々は、マウス CLP モデルに、広域抗生物質投与および補液に加え、低体温を予防すれば、100%の生存率が得られることに気がついた。今回我々は、この死なない敗血症モデルを用いて、CLP 施行後 72 時間までの免疫反応の変化を詳細に追及した。

【材料と方法】

C57/BL6 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 37°C に設定した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、血液を血算装置で分析するとともに、フローサイトメトリー分析した。脾臓は全 RNA を採取し cDNA を合成、定量的 RT-PCR による mRNA 発現の変動を調べた。さらに、脾臓を酵素的に分散して、細胞をフローサイトメトリーにより分析した。また腹水を採取し、細菌培養を行った。なお、この動物実験は愛媛大学医学部の動物実験の倫理委員会によって承認されている。

【結果】

CLP 後、保温をしなければ 72 時間後までに 56.2%のマウスが死亡したが、保温をすれば死亡率は 0 となった。以後、全てのマウスを保温し、経時的変化を追及した。しかし、保温したマウスに

においても 48 時間後には相当量の細菌繁殖が腹水中で見られた。全血算では、赤血球、白血球には大きな変化見られなかったが、血小板は CLP6 時間後に 90%近くまで減少し、播種性血管内凝固症候群を生じていると考えられた。フローサイトメトリーによる末梢血免疫細胞の解析では、6 時間後の好中球の増加と B リンパ球の減少が顕著であり、B リンパ球減少は 72 時間の観察期間中持続した。T リンパ球は 24 時間後以降に減少を始めた。単球は当初の起炎症性のものから、抗炎症性へとフェノタイプが変化した。脾臓では 6 時間後に起炎症性サイトカイン(IL-1 β 、IL-6、IFN γ)と抗炎症性サイトカイン(IL-10)の急激な発現上昇があり、同時に免疫チェックポイント分子 PD-1 のリガンド PD-L1 も急激に発現上昇していた。末梢血中の B 細胞総数の減少にも関わらず、IL-10 産生性の CD1d⁺/CD5⁺制御性 B 細胞(Breg)数は維持されていた。脾臓の B 細胞は PD-L1 を顕著に発現していた。抗炎症反応あるいは免疫不全状態が、先行する起炎症反応に誘発されているのかどうかを明らかにするため、CLP 後 3 または 6 時間でデキサメサゾン を 3mg/kg で投与し、起炎症反応の抑制を試みた。これによって起炎症反応は部分的に抑制できたものの、Breg はさらに増加し、免疫不全状態はむしろ悪化した。

【考察】

CLP モデルの起因菌は主に大腸菌であり、TLR4 を介した起炎症性反応に引き続いて、抗炎症反応が生じるとの見方が強かったが、今回の結果は起炎症反応と抗炎症反応はほぼ同時に生じることを示している。また、極めて早期から Breg が IL-10 と PD-L1 を発現し、抗炎症または免疫不全状態を惹起していると考えられ、特に Breg の PD-L1 発現を通じて T 細胞を抑制し、IFN γ 産生を減少させ、単球を抑制していく免疫抑制過程が考えられた。

【結論】

抗体産生細胞との認識が強く、敗血症病態への関与について重視されていなかった B 細胞、中でも Breg が敗血症における免疫不全状態誘発に非常に大きな役割を果たしている可能性が示された。今後、B 細胞の急激な減少と Breg が維持されるメカニズムを解明すること、PD-1/PD-L1 相互作用阻害による、敗血症治療の最適化の研究が必要である。また、敗血症モデル動物の個体死がなぜ防がれるかについても解明の必要がある。

なお、この学位論文の内容は、以下の原著論文に既に公表済である。

主論文 : Kensuke Umakoshi, Mohammed E. Choudhury, Ryutaro Nishioka, Hironori Matsumoto, Naoki Abe, Yuki Nishikawa, Satoshi Kikuchi, Jun Takeba, Hajime Yano, Toshihiro Yorozuya, Norio Sato, Mayuki Aibiki, Junya Tanaka:

B lymphocytopenia and Bregs in a not-to-die murine sepsis model,

Biochemical and Biophysical Research Communications 523 (2020) 202-207

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.12.041>