

学位論文審査結果の要旨

| | |
|------|--|
| 氏名 | 西岡 龍太郎 |
| 審査委員 | 主査 武内 章英 副査 渡部 祐司 副査 竹下 英次 副査 藤岡 徹 副査 ミヤケ 深雪 |

論文名

マウス敗血症モデルにおけるアドレナリン β 2受容体を介した循環血液中B細胞数・好中球数の変化

審査結果の要旨

【背景】

敗血症は治療困難な病態であり、死亡率は非常に高い。病原体の侵入に対して免疫系が反応し、高強度な全身性の起炎症反応を起こすことから、長らく全身性炎症反応症候群と同義に扱われてきたが、近年免疫不全を引き起こす可能性についてより多くの注目が集まる様になっている。本研究では、盲腸結紮穿孔(Cecum ligation and puncture; CLP)によって作製するマウス敗血症モデルにおいて、B細胞がモデル作成後2時間というごく短時間で大きく減少し、好中球は急速に増加していたことに着目し、そのメカニズムの解明を試みた。

【材料と方法】

C57/BL6 マウス、オス 8~9 週齢を用いた。CLP はマウス右下腹部腹壁を切開し、盲腸を体外に取り出し、結紮後、23 ゲージ注射針にて二箇所穿孔、閉創した。偽 CLP 群では腹壁切開後、盲腸を体外に取り出す、結紮・穿孔せず閉創した。処置後、0、1、2、3、4、6 時間後に心臓穿刺により採血した。副腎摘出を行った群は偽 CLP の一日前に副腎摘出術を行った。ノルアドレナリン、アドレナリン、フェニレフリン(α 1 アゴニスト)、ICI118,511 (ICI; β 2 アンタゴニスト)、クレンブテロール(β 2 アゴニスト)

ト)、ナドロール(脳移行性のない β 受容体アンタゴニスト)、AMD3100(ケモカイン受容体 CXCR4 阻害薬)を皮下または腹腔内投与し、交感神経系の関与を検討した。血球数を全血算分析装置で解析し、白血球分画をフローサイトメトリーにより解析した。脾臓を採取して全 RNA を調製、cDNA を合成後定量的 RT-PCR による mRNA 発現を調べた。動物実験については、愛媛大学動物実験員会から承認を受け実施した(承認番号: 05-U-37-1)。

【結果】

CLP 後 1~2 時間で、有意な末梢血中 B 細胞の減少と顆粒球(主に好中球)の増加が観察された。大腸菌等の細菌感染の結果とは考えられない非常に急速な変化であるため、手術侵襲によるストレス反応の可能性を疑い、腹腔内への大腸菌播種を伴わない偽 CLP 手術をおこなった。その結果、偽 CLP でも CLP と同等の急速な B 細胞数の減少と好中球の増加が観察された。次に、選択的 $\beta 2$ アンタゴニストである ICI の投与を事前に行い、CLP、偽 CLP を行なったところ、血中の B 細胞減少や好中球増加は有意に抑制された。また $\beta 2$ アゴニストのクレンブテロールを投与したところ、CLP 後の変化と類似する血中の B 細胞減少や好中球増加が観察された。脳移行性のない β アンタゴニスト、ナドロール投与でも ICI 投与とほぼ同じ結果が得られた。さらにアドレナリン投与でも同様の結果を得たが、ノルアドレナリンや $\alpha 1$ アゴニストのフェニレフリン投与では、有意な変化は生じなかった。事前に副腎を摘出した個体で偽 CLP を行うと、血中の B 細胞数・好中球数の変化は大幅に抑制された。B 細胞や好中球の血液中への動員と関連するケモカイン受容体の CXCR4 mRNA の脾臓での発現を調べたところ、偽 CLP 群やクレンブテロール投与群で発現が上昇し、副腎摘出群で発現変化が抑制されることが判明した。また、CXCR4 阻害剤である AMD3100 投与で、偽 CLP による血中の B 細胞減少や好中球増加が抑制された。

【結論】

手術侵襲などのストレス負荷は、急性期の血中 B 細胞や好中球の割合に大きな影響を与えることが判明した。この変化は、アドレナリン投与や副腎摘出により相殺されることから、アドレナリン依存的なものと考えられた。一方、 α 作用アゴニストの投与は末梢血白血球数に大きな影響を与えることはないため、敗血症治療等において循環管理のために安全に使用できると考えられた。

本論文は、外科的手術や外傷に起因する敗血症の超早期に起こる免疫抑制状態の分子病態を解明するとともに、選択的なアドレナリン $\beta 2$ 受容体遮断薬がその治療に使用できる可能性を提示したものであり、明瞭な結果と十分な考察が提示されている。公開審査会は、令和 4 年 8 月 18 日に開催され、申請者は、研究内容を英語で明確に発表し、1) 盲腸結紮穿孔(CLP)モデルの樹立方法とその経緯や n 数決定の根拠、2) 副腎由来のアドレナリンによる $\beta 2$ シグナルの病態形成への寄与とその他のサイトカインまたはステロイド等との関係、3) 脾臓リンパ球の特定のサブセットや血液内の白血球数の変化の計測方法とその解釈、4) ケモカイン受容体 CXCR4 介在性・非介在性の B 細胞減少のメカニズム、5) 病態を説明する血中のアドレナリンや好中球増加に関連する血中 G-CSF の分泌量とその時間的推移、6) 自律神経系刺激により

B細胞減少が起こる分子メカニズム、7) ヒトの敗血症の病態データとの比較検討、8) 敗血症治療における α 作用中心のノルアドレナリンの選択の是非や $\beta 2$ 受容体遮断薬が治療応用可能かどうかの検討等、に関する多くの質問に対し日本語での的確に回答した。

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。