



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	外傷後敗血症病態に関与する好中球フェノタイプの研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	水柿, 明日美
Description	配架番号 : 2810
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15650号
Issue Date	2023-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90963
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	MIZUGAKI_Asumi_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 水柿 明日美

学位論文題名

外傷後敗血症病態に関与する好中球フェノタイプの研究

(Neutrophil phenotypes implicated in the pathophysiology of post-traumatic sepsis)

【背景と目的】重症外傷による死亡は、受傷後からの時期によって3つに分けることができる。すなわち、治療介入の余地がない超急性期の死と、医学・医療の進歩によって死亡率が改善してきた急性期の死、そして現時点では支持的療法が中心で根本的治療方法が確立されていない亜急性期～慢性期の死である。救命率の比較的低い外傷急性期を乗り越えたにもかかわらずその後の亜急性期～慢性期に命を落とす原因としては、手術侵襲や二次性に発症する感染症・敗血症による臓器不全が考えられているが、その機序としては免疫恒常性の破綻が知られている。好中球は、自然免疫の中核を担い、感染症の最前線で病原体を排除する役割を持つことで広く知られてきた。しかし近年、炎症性好中球だけではなく、抗炎症作用を持つ好中球など様々な機能を有する好中球フェノタイプの存在が指摘されている。腫瘍性疾患や自己免疫性疾患、アレルギー性疾患を中心としてさまざまな病態に好中球フェノタイプが関与している可能性が示唆されている。外傷後敗血症病態にも好中球フェノタイプの偏在が関与していることが報告されているが、その全容は依然として明らかにされていない。外傷後敗血症病態における好中球フェノタイプの関与を明らかにし予後と関連する因子について検討する目的で本研究を行った。本研究では外傷後敗血症モデルマウスを用い、生存率や腹水生菌数の検討、病理組織学的解析を行った。さらに、同モデルマウスの血液および腹水中サイトカイン測定や好中球フェノタイプの解明を目的としたマスサイトメトリーによる免疫学的解析を行った。

【材料と方法】週齢 7-8 の雄の ICR マウスを用いて外傷後敗血症マウスモデルを作成した。外傷として 25%3 度熱傷もしくはコントロールとして Sham を施し、受傷 24 時間後に盲腸結紮穿孔 (cecal ligation and puncture: CLP) を行うことによって敗血症を引き起こし、熱傷を施した Burn/CLP モデルと、Sham を施した Sham/CLP モデルを作製した。CLP 後 14 日生存率、CLP 翌日の腹水生菌数、CLP 翌日の脾臓、肝臓、腎臓、肺組織の病理組織学的所見を両群間で比較した。さらに両群の血清および腹水のサイトカイン測定と、血液中および腹水中の好中球、単球・マクロファージに的を絞ったマスサイトメトリーによって免疫学的解析を行った。

【結果】 Burn/CLP 群は Sham/CLP 群と比較し有意に生存率が低かった。腹水生菌数測定においては Burn/CLP 群と Sham/CLP 群の間に有意な差を見出すことができなかったが、病理組織学的検査では Sham/CLP 群と比較して Burn/CLP 群では脾臓組織中のマクロファージが

少なく、肝臓、腎臓、肺の組織では Burn/CLP 群で Sham/CLP 群よりも進行した臓器障害が見られた。Burn/CLP 群では、血清中の transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) のレベルが Sham/CLP 群と比して高く、その他のサイトカインレベルは血清、腹水中ともに概して Burn/CLP 群で低下していた。血液、腹水それぞれについて行ったマスサイトメトリーでは、clusters of differentiation (CD) 11b と CD172a が血液、腹水中の好中球、単球・マクロファージいずれにおいても Burn/CLP 群で高い傾向にあり、sialic acid-binding Ig-like lectin F (Siglec F) 陽性好中球が Burn/CLP 群の腹水中で多く見られた。また、腹水中の CD68 陽性好中球群が Burn/CLP 群で著減していた。

【考察】本研究では、外傷後敗血症病態における好中球フェノタイプの関与を検討した。細胞死や細胞分化に関与しサイトカイン放出を抑制する働きも持つとされる TGF- β 1 が、Sham/CLP 群と比して Burn/CLP 群の血清中から高く検出されたが、これによって Burn/CLP 群では炎症性サイトカイン・抗炎症性サイトカインいずれの放出も抑制された可能性が考えられた。マスサイトメトリーでは、好中球の接着や遊走に関与するとされる CD11b と貪食細胞の貪食能に関与するとされる CD172a が、血液および腹水中の好中球、単球・マクロファージいずれにおいても Burn/CLP 群で高く発現する傾向にあり、炎症組織での組織修復に関与している可能性のある Siglec F 陽性好中球が Burn/CLP 群の腹水中で多く見られた。これらの好中球フェノタイプの局在が Burn/CLP 群の免疫抑制状態に関与している可能性があるが、本研究では因果関係の証明には至っていない。また、Sham/CLP 群で認められた CD68 陽性好中球が Burn/CLP 群では欠損していることがわかった。CD68 陽性好中球は炎症性腸疾患患者の腸管組織から検出されたという報告はあるがその存在意義は明らかにされておらず、外傷後敗血症病態における CD68 陽性好中球の役割についても明らかにすることはできなかった。腹水生菌数は Burn/CLP 群と Sham/CLP 群で違いが指摘できなかったが、病理組織学的解析からは Burn/CLP 群において脾臓のマクロファージの減少が反映する免疫応答の抑制と肝臓・腎臓・肺の臓器虚血の進行が示された。マスサイトメトリーの結果 Burn/CLP 群において見られた好中球フェノタイプの偏在は血液中の TGF- β 1 をはじめとするサイトカインによって引き起こされ、免疫恒常性の破綻を招き、病理組織学的検査によって得られた臓器障害や生存率の低下に関与している可能性が考えられた。腹水生菌数に Burn/CLP 群と Sham/CLP 群の間で有意差がなかったことについては、腹水採取の時期などが原因として考えられた。

【結論】Burn/CLP 群と Sham/CLP 群において、血清中 TGF- β 1 レベルの違いといくつかの好中球フェノタイプの偏在を認めた。これらの結果が、生存率の低下や病理組織学的検査で認められた臓器障害の進行など、Sham/CLP 群と比較した際の Burn/CLP 群の悪い予後に寄与している可能性が考えられた。ノックアウトマウスや抗体を用いたさらなる検討により、両群で違いが見られた因子が予後に寄与していることを証明することが今後の課題である。