

## 論文の内容の要旨

論文題目 敗血症に引き続く緑膿菌肺炎のマウスモデルに対する  
インターフェロン $\beta$ の治療的効果とそのメカニズム

氏名 比留間 孝広

Surviving Sepsis Campaign guideline、集中治療の発展に伴い、敗血症死亡は以前よりは減少しているが、現在も急性期死亡の主要な原因である。敗血症による過剰炎症は組織障害から多臓器不全に至り、高い死亡率の原因となる。逆に過剰な抗炎症では免疫抑制による2次感染へと進展する。敗血症等の重症患者では、炎症と抗炎症のバランスが重要である。また消化管穿孔、大侵襲手術後等それだけでは致死的な病態に至らなくても、その後の感染症を合併すると重症化し、重症敗血症、多臓器不全に至ることがある。初期の侵襲により生体防御能が低下し、2次感染への脆弱化が起きているためであるという報告があり、two hit theory という概念が提唱されている。こうした病態を治療する、臨床的に有効な薬剤は未だ認められていない。

Two hit theory に関連する重症呼吸不全の病態に急性呼吸窮迫症候群(acute respiratory distress syndrome; ARDS)があり死亡率の高い病態であるが、2014年 Bellingan らによって薬剤によって予後改善の可能性を示唆する臨床試験結果が報告された。Type I インターフェロンである、インターフェロン $\beta$  (IFN $\beta$ ) である。ARDS 患者に IFN $\beta$  を投与すると、非投与群での死亡率 32%が治療群では 8%まで改善したと報告された。機序は IFN $\beta$  が CD73, AMP, アデノシンの発現を増加させ、血管透過性を減少させるためと考察されている。また谷口らは免疫担当細胞が異物を認識したときに、IFN $\beta$  存在下ではより強い反応がおきることから、このような作用を Revving-up model と説明している。インターフェロンは IFN $\alpha/\beta$  は type 1、IFN $\gamma$  は type2、IFN $\lambda$  は type3 に分類され、それぞれ別の受容体、シグナル伝達を介するが、相互のシグナルに影響しあっており、IFN $\beta$  は生体防御に強力に作用することが知られている IFN $\gamma$  シグナルを強めることも報告されている。

本検討では two hit theory に基づき、腹膜炎を引き続いて、肺内へ感染を起こす two hit model を作成し、その重症化に関わるメカニズムを検討した。またそのような重症化のプロセスに、IFN $\beta$  を投与し、生存率への影響、及びその生体防御能への影響を評価した。

## 方法

### 実験 1 Two hit model の作成とその免疫機能の検討

C57/BL6 マウスに回盲部結紮穿孔 (cecal ligation and puncture;CLP) で腹膜炎モデルを作成し、4 日後に緑膿菌を気管内投与する肺炎モデルを作成した (*Pseudomonas aeruginosa* intratracheal instillation; PAIT)。①CLP 後に PAIT を施行した two hit(2H)群、②開腹手術のみの sham 手術後に PAIT 施行した sham 群、③CLP 後に生理食塩水を投与 (normal saline intratracheal instillation;NSIT) した NSIT 群、④CLP 群、⑤PAIT 群で、生存率を評価した。2H 群、sham 群で肺炎 18 時間後に気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid fluid;BALF)、肺組織を採取し、各種解析を施行した。

### 実験 2 Two hit model に対する IFN $\beta$ の効果

sham 群、2H 群に IFN $\beta$  を投与した 2H,IFN 群、生理食塩水 (NS) を投与した 2H,NS 群で生存率を比較した。IFN $\beta$  は CLP3 日後に 700,000unit/kg を皮下注射した。3 群で肺炎 18 時間後に各種解析をした。

### 実験 3 マクロファージの機能

CLP3 日後に IFN $\beta$ (CLP,IFN 群)または NS(CLP,NS 群)を投与し、Sham 群とあわせて、CLP4 日後の肺炎前に腹腔洗浄液、BALF を回収した。肺胞・腹腔マクロファージを培養後に貪食能、LPS 刺激後の TNF $\alpha$  発現量を測定した。また肺胞マクロファージの IFN $\gamma$  受容体 (IFN $\gamma$  R) の変化を測定した。

### 実験 4 脾臓細胞の機能

実験 3 と同様の 3 群で、脾臓細胞の IFN $\gamma$ R の変化を測定した。また脾臓細胞で CD3・CD28 刺激後の IFN $\gamma$  分泌能を評価した。

## 結果

### 実験 1 Two hit model の作成とその免疫機能の検討

CLP 群、PAIT 群、NSIT 群、sham 群の生存率に有意差はなかった。Sham 群と比較し、2H 群では生存率は著明な低下をきたした (図 1)。

肺病理・肺障害スコアで 2H 群でより強い傷害を認めた。2H 群で肺乾湿重量比で肺の含水量が有意に高く、肺 MPO (Myeloperoxidase) 値は有意に高値を示した。

BALF 中の好中球数は Sham 群と比較し、2H 群で有意に低下した。BALF 中の IL-6、TNF $\alpha$  は 2H 群で sham 群と比較し、半分以下に抑制された。2H 群で IL-10 は有意に上昇し、KC は有意に低下した (図 2)。

### 実験 2 Two hit model に対する IFN $\beta$ の効果

2H,IFN 群は 2H,NS 群に対し有意に生存率の上昇を認めた (図 1)。

2H,IFN 群は 2H,NS 群と比較し、BALF 中の好中球数は有意に上昇し、BALF 中の TNF $\alpha$ 、KC は有意に上昇し、IL-6 は高い傾向を示した (図 3)。肺病理・肺傷害スコアでは、2H,NS 群と比較すると 2H,IFN 群で傷害は軽度であった。肺乾湿重量比、肺 MPO 値で 2H,IFN 群と 2H,NS 群で有意差を認めなかった。

図1 生存率

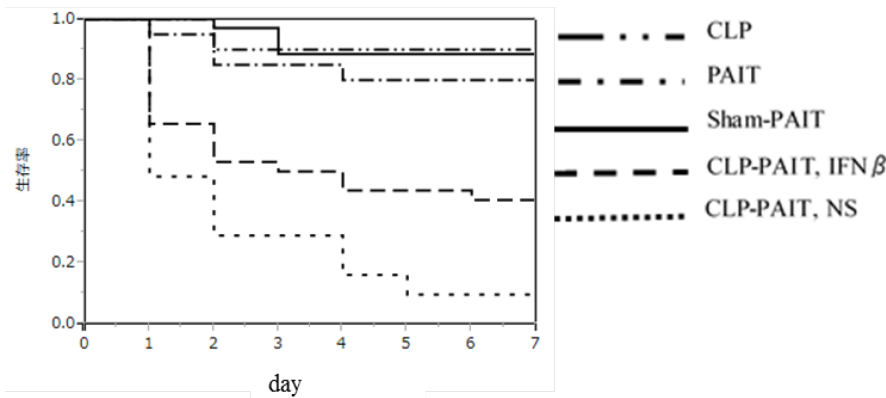


図2 肺内サイトカイン(IL-6)

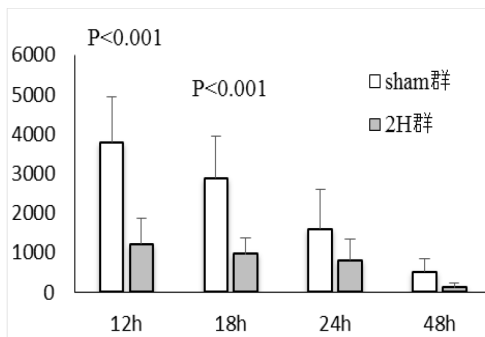


図3 IFNβ投与による肺内TNFαレベル

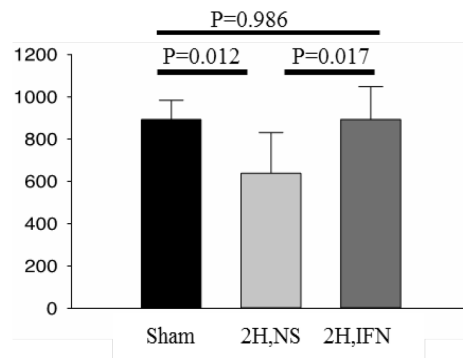
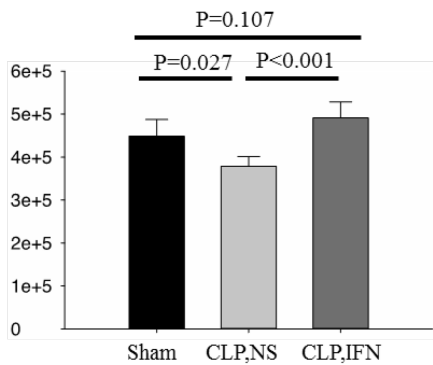


図4 IFNβ投与による肺胞マクロファージ貪食能



### 実験3 マクロファージの機能

肺胞・腹腔マクロファージの貪食能はCLP,NS群ではSham群と比較して有意に低く、CLP,IFN群はCLP,NS群と比較し有意に高かった(図4)。

肺胞・腹腔マクロファージにおけるLPS刺激のTNFα発現量は、CLP,NS群と比較してCLP,IFN群は有意に高値を示した。

肺胞マクロファージでのIFNγR発現量は、CLPにより増加し、IFNβを投与することでIFNγRがさらに有意に上昇した。

### 実験4 脾臓細胞の機能

脾臓細胞のIFNγRはsham群よりCLPで有意に上昇したが、IFNβによる影響はなかった。IFNγ分泌能はCLPにより有意に低下したが、これもIFNβによる影響はなかった。

## 考察

軽症であったはずの患者が、感染症等を合併することにより重症化することがある。そのような重症化のプロセスを解明し、治療介入できればさらなる治療成績の向上につながる。

Two hit model が、CLP・肺炎の単独の侵襲と比較して生存率を下げることを示された。two hit model の死亡率上昇のメカニズムは、2H 群では IL-6、TNF $\alpha$  が減少し、IL-10 が上昇していることから免疫抑制が考えられる。また 2H 群では好中球を遊走させる KC が低値で、BALF 中の好中球数も低値であり、好中球が炎症部位に集積することが障害されていることが示唆される。BALF 中の白血球数や炎症性サイトカインが高値であると肺障害が懸念されるが、肺病理では sham 群と比べ炎症性サイトカイン値が低値である 2H 群の方が肺傷害は進行していた。BALF 中の流入好中球数では sham 群が多いが、肺胞、肺実質全体の好中球数の指標としての MPO 値は 2H 群が有意に高値であり、2H 群では肺実質、間質への細胞浸潤が多いことが示唆される。肺乾湿重量比でも 2H 群では有意に肺含水量が多く、肺水腫が高度であった。

免疫抑制を背景とした Two hit model に対して、IFN $\beta$  は生存率を上昇させた。2H,NS 群で有意に低下した BALF 中の好中球数を、IFN $\beta$  投与は sham 群と同様にまで回復させた。2H,NS 群と比較すると IFN 群は BALF の TNF $\alpha$ 、KC は有意に上昇しており、IL-6 も上昇する傾向を示した。IFN $\beta$  は肺内の炎症性サイトカイン及び好中球流入を増加させたことから、低下した生体防御能を改善させることが生存率上昇に寄与している可能性がある。また BALF 中の流入好中球数は IFN 投与群で有意に上昇したが、肺胞、肺実質全体の MPO 値では両者に差がなく、2H,NS 群では肺実質、間質への細胞浸潤が多いことが示唆される。肺病理像でも IFN $\beta$  投与群の病理像は 2H,NS 群と比べるとその傷害は軽度である。

肺胞、腹腔マクロファージの食食機能は CLP,NS 群で大きく抑制されていたが、CLP,IFN 群では機能が sham 群に匹敵するレベルまで改善していた。LPS 刺激に対する反応性は CLP,IFN 群で有意に上昇した。また IFN $\beta$  投与により、肺胞マクロファージ表面上の IFN $\gamma$ R 数はさらに有意に増加した。IFN $\gamma$  に対する反応性亢進が、生体防御能上昇に関連していることが示唆された。

Dejager らは CLP や LPS モデルで、IFN $\beta$  のシグナル阻害が生存率を改善し、機序は炎症性サイトカインの抑制と報告している。また Yoo らは IFN $\beta$  投与が CLP や LPS 投与モデルで生存率を改善し、その機序は免疫抑制と報告しており、本検討の結果と相反する。動物モデルが異なること、IFN $\beta$  投与のタイミングや量の違い等が影響している可能性があるが、病態により IFN $\beta$  の作用が異なる結果を引き起こす可能性が考えられ、IFN $\beta$  投与が免疫賦活に至る詳細なメカニズムの解析、及び IFN $\beta$  投与が有効である病態を示すバイオマーカーを検討することが今後の課題である。

本研究では臨床での院内感染症を擬して、CLP による腹膜炎後の緑膿菌肺炎による two hit model を作成し、その解析から重症化に免疫抑制が関与していることを示した。また IFN $\beta$  の投与により two hit model の生存率は改善し、そのメカニズムが低下した生体防御能の復活である可能性を示した。