

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18317

研究課題名(和文)敗血症性肺傷害における2型自然リンパ球の炎症制御機構とその集積メカニズムの解明

研究課題名(英文)The trafficking and effector function of the group 2 innate lymphoid cells in sepsis-induced lung injury

研究代表者

赤間 悠一 (Akama, Yuichi)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40763313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：免疫の制御異常は、敗血症性肺損傷を含む敗血症における多臓器不全の病因の中心的役割を果たしている。グループ2自然リンパ系細胞(ILC2)は、肺の免疫恒常性を制御する新たなプレーヤーとして登場したが、敗血症性肺傷害におけるILC2の役割はまだ十分に理解されていない。我々の知る限り、本研究成果は傷害肺におけるILC2の共刺激分子の発現量の違いをIL-33/IL-13経路を介した2型免疫応答による炎症の進行と消退との関係で示した初めての報告である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PD-1/PD-L1シグナル阻害は敗血症マウスの転機を改善すること知られている。この治療効果は主にT細胞の疲弊を改善することによってもたらされていると考えられていたが、本研究において『PD-1/PD-L1シグナル阻害は敗血症性肺傷害においてILC2のIL-13産生抑制を緩和する可能性』が見いだされた。IL-13が肺傷害を改善させる可能性が指摘されている先行研究結果があること、本研究成果がPD-1/PD-L1シグナル阻害の治療効果に対するILC2を介した新規メカニズム解明につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Deregulation of the immune system in sepsis plays the central role in the pathogenesis of multiple organ failure, including septic lung injury. Group 2 innate lymphoid cells (ILC2) have emerged as a new player in regulating immune homeostasis in the lung; however, the role of ILC2 in lung injury in sepsis remains unclear. To the best of our knowledge, this is the first report demonstrating differential co-stimulatory/inhibitory molecule expression on ILC2 in a septic lung in the context of an IL-33/IL-13 pathway-mediated type 2 immune system in the progression and resolution of inflammation.

研究分野：敗血症と炎症制御

キーワード：敗血症 自然リンパ球 PD-1 免疫 感染症 炎症 ショック 免疫抑制

1. 研究開始当初の背景

自然リンパ球(Innate Lymphoid Cell: ILC)は、この10年程で発見された新しい自然免疫系細胞で、抗原受容体を持たず、機能的にヘルパーT細胞と類似している。産生サイトカインや発現する転写因子の違いから、1型、2型、3型自然リンパ球(ILC1, 2, 3)と3つのグループに分類される。

敗血症は、感染に対する生体反応の不調によって引き起こされる重篤な臓器機能障害である。長年、敗血症早期の病態は細菌感染に伴う過剰な免疫応答と考えられていたが、現在は免疫抑制が同時に起こっていることが分かっており、両者の制御が敗血症の治療にとって重要である。早急な治療開発が望まれ、一部の悪性腫瘍の免疫療法で劇的な効果を上げているPD-1/PD-L1抗体の敗血症への応用を目指した臨床治験はその一端であるが、特に免疫麻痺には不明な点が多く有効な治療法は未だ見出だせていない。

敗血症において、肺は最も障害を受けやすい臓器の一つである。肺傷害を併発した敗血症患者は未だに死亡率が高く(60%-38.2%)、治療に難渋する。肺傷害は肺胞の血管内皮や上皮のバリア機構の破綻と間質内及び肺胞内の液体貯留(肺水腫)に特徴付けられるが、これまでそのメカニズムは好中球や肺胞マクロファージを中心に研究されてきており、ILCの機能解析は始まったばかりである。

ILC2は肺において最も多く存在し、Th2細胞が関与する一連の免疫嘔吐の初期誘導を担うだけでなく、生体防御や組織修復など恒常性維持に重要な役割を果たしていることが分かっている。敗血症性肺傷害においてはその制御異常が予想されることから、免疫麻痺への関与が考えられる。また、ILCは定常状態や感染状態において一旦組織に留まった後に移動が起こらない組織滞在型細胞と考えられ、恒常性の維持や微小環境の構築にそれぞれ重要な役割を持っていると考えられていた。しかし、寄生虫感染時において、組織間を移動することが2018年に見出され(Huang, *et al. Science*.2018)、生体内制御に関してtraffickingの視点から新たな知見が得られた。敗血症におけるILCの研究のうち、traffickingに注目した研究報告はこれまで無い。

2. 研究の目的

こうした背景を踏まえて、我々は免疫細胞の新たなプレイヤーであるILC2の敗血症性傷害肺への集積メカニズムと病態への関与を解明することを目的に本研究を行った。

3. 研究の方法

(1)野生型マウス(WT)に盲腸結紮穿孔(CLP)により敗血症を誘導し、パーコールを用いた密度勾配遠心法にて肺組織内白血球を分離した。FACSを用いて組織滞在性のnatural ILC2と遊走性のinflammatory ILC2を表面抗原から分離、解析して経時的变化を評価した。

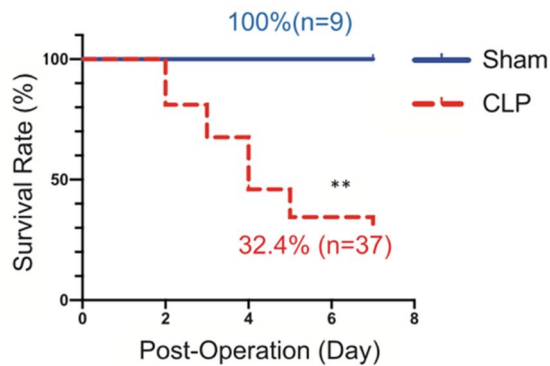
(2)次にILC2のIL-5とIL-13の産生能の経時的变化を解析、比較した。続いて、ILC2の機能制御に関する受容体であるST2、ICOS(活性化)及びPD-1(抑制)の発現量を解析、比較した。

(3)傷害肺中ILC2におけるIL-33の役割を検討するため、IL-33ノックアウト(KO)マウスにCLPで敗血症を誘導し、傷害肺中のILC2の解析を行った。

4. 研究成果

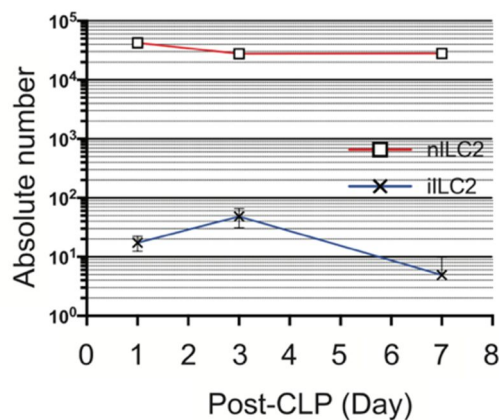
(1)メスの生後 8-12 週の C57BL/ 6 J マウスを使用。盲腸を根部から先端の中間点で結紮した後、先端部分に 21G 針で 2 箇所穿刺して CLP モデルを作成した。7 日間生存率は 32.4%であった。

(図 1)



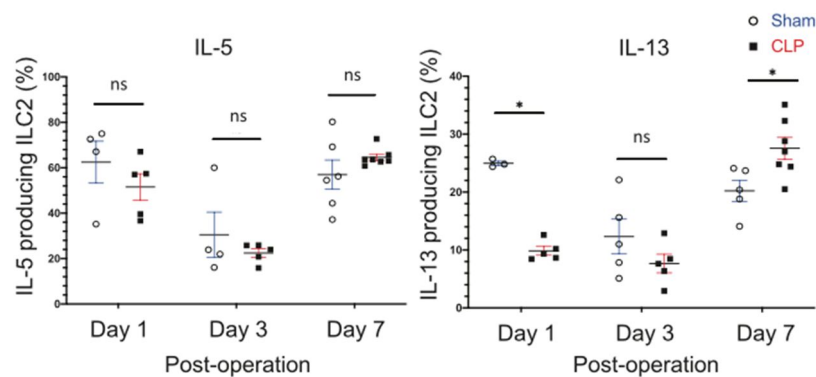
(図 1) CLP モデル

(2)傷害肺における inflammatory ILC2 (iILC2)と natural ILC2 (nILC2) の数を比較した。iILC2 の数に有意な増加は認められず、nILC2 が敗血症性肺傷害における主要な集団であると考えられた。(図 2)



(図 2) 傷害肺中 ILC2 サブセットの解析

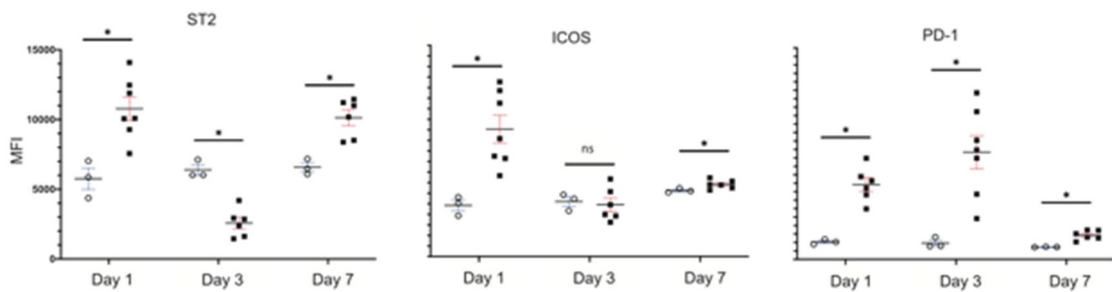
(3)肺 ILC2 の IL-5 と IL-13 産生能を経時的に解析した。IL-5 はコントロールと比べて明らかな差は認めなかった一方で、IL-13 は CLP day1 において有意に低下し、day7 では有意に増加していた。(図 3)



(図 3) 傷害肺中 ILC2 の IL-5 と IL-13 産生能

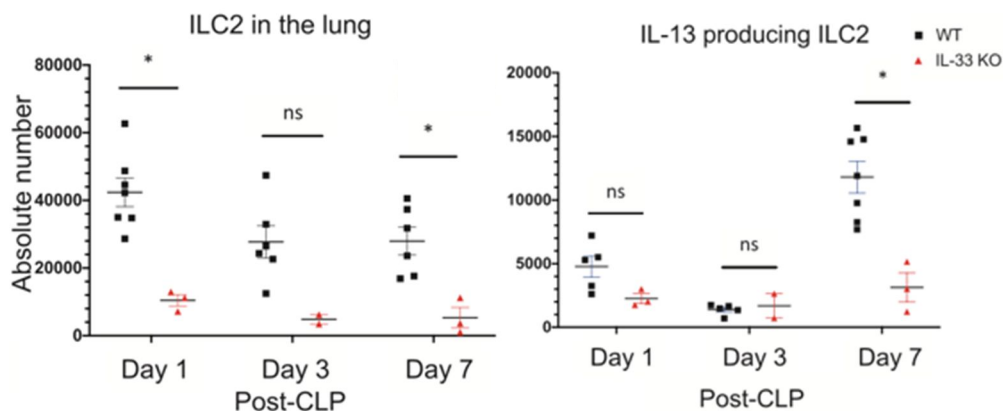
(4)続いて、肺 ILC2 の機能制御に関わる受容体の発現量を解析した。驚くべきことに、CLP day1

での肺 ILC2 では活性化に機能する ST2 や ICOS の発現量が増加していた。この結果は IL-13 産生量が低下していることと矛盾するため、何かしらの抑制機能の存在が示唆された。ILC2 抑制効果が知られている PD-1 受容体の発現量を解析すると増加しており、PD-1/PD-L1 を介した抑制メカニズムが肺 ILC2 に起きている可能性が示唆された。(図 4)



(図 4) 傷害肺中 ILC2 の表面抗原の経時的変化

(5) IL-33K0 マウスに CLP により敗血症を導入、肺 ILC2 の解析を行った。ILC2 の数は CLP day3 では有意差は出なかったものの、WT マウスに比べ IL-33K0 マウスでは、数が少なかった。さらに、IL-33K0 マウスにおける ILC2 の IL-13 産生細胞も WT マウスで day 7 に増加しているにもかかわらず、IL-33K0 マウスでは増加せず、肺傷害中 ILC2 の制御に IL-33 が関与している可能性が示唆された。(図 5)



(図 5) WT と IL-33K0 マウスにおける傷害肺中 ILC2 の数とサイトカイン産生の経時的変化の違い

本研究により、CLP day1 から day7 の敗血症性肺傷害においては、寄生虫感染肺に認めたような遊走性 ILC2 である iILC2 の明らかな集積は認めず、主要な集団は組織滞在性の nILC2 であることが明らかとなった。また、傷害肺中 ILC2 は PD-1 高値となる一方で、IL-13 産生能は抑制されており、ILC2 における PD-1/PD-L1 を介した抑制メカニズムの関与が示唆された。IL-33K0 マウスを用いた研究から、IL-33 が敗血症性肺傷害における ILC2 の制御に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Akama Yuichi, Park Eun Jeong, Satoh-Takayama Naoko, Gaowa Arong, Ito Atsushi, Kawamoto Eiji, Darkwah Samuel, Appiah Michael G., Myint Phyo Kyaw, Ohno Hiroshi, Imai Hiroshi, Shimaoka Motomu	4. 巻 55
2. 論文標題 Sepsis Induces Dereglulation of IL-13 Production and PD-1 Expression in Lung Group 2 Innate Lymphoid Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Shock	6. 最初と最後の頁 357 ~ 370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SHK.0000000000001647	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Akama Yuichi, Satoh-Takayama Naoko, Kawamoto Eiji, Ito Atsushi, Gaowa Arong, Park Eun Jeong, Imai Hiroshi, Shimaoka Motomu	4. 巻 10
2. 論文標題 The Role of Innate Lymphoid Cells in the Regulation of Immune Homeostasis in Sepsis-Mediated Lung Inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 808 ~ 808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics10100808	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 伊藤温志、赤間悠一、島岡要	4. 巻 47
2. 論文標題 免疫チェックポイントと2型自然リンパ球	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 97 ~ 100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Appiah Michael G., Park Eun Jeong, Darkwah Samuel, Kawamoto Eiji, Akama Yuichi, Gaowa Arong, Kalsan Manisha, Ahmad Shandar, Shimaoka Motomu	4. 巻 21
2. 論文標題 Intestinal Epithelium-Derived Luminally Released Extracellular Vesicles in Sepsis Exhibit the Ability to Suppress TNF- and IL-17A Expression in Mucosal Inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8445 ~ 8445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21228445	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawamoto Eiji, Nago Nodoka, Okamoto Takayuki, Gaowa Arong, Masui-Ito Asami, Akama Yuichi, Darkwah Samuel, Appiah Michael Gyasi, Myint Phyo Kyaw, Obeng Gideon, Ito Atsushi, Caidengbate Siqingaowa, Esumi Ryo, Yamaguchi Takanori, Park Eun Jeong, Imai Hiroshi, Shimaoka Motomu	4. 巻 9
2. 論文標題 The Lectin-Like Domain of Thrombomodulin Inhibits 1 Integrin-Dependent Binding of Human Breast Cancer-Derived Cell Lines to Fibronectin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 162 ~ 162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines9020162	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ikejiri Kaoru, Akama Yuichi, Ieki Yohei, Kawamoto Eiji, Suzuki Kei, Yokoyama Kazuto, Ishikura Ken, Imai Hiroshi	4. 巻 100
2. 論文標題 Veno-arterial extracorporeal membrane oxygenation and targeted temperature management in tricyclic antidepressant-induced cardiac arrest	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e24980 ~ e24980
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.00000000000024980	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Akama Yuichi, Matsutani Takeshi, Hagiwara Nobutoshi, Umezawa Hiroki, Nomura Tsutomu, Hanawa Hidetsugu, Mishima Keisuke, Tani ai Nobuhiko, Yoshida Hiroshi	4. 巻 6
2. 論文標題 Pyogenic spondylodiscitis of the lumbar spine related to anastomotic fistula after surgery for esophageal cancer: a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surgical Case Reports	6. 最初と最後の頁 155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40792-020-00922-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 赤間悠一、朴恩正、佐藤尚子、川本英嗣、阿栄高娃、伊藤温志、江角亮、池尻薫、今井寛、島岡要
2. 発表標題 PD-1が敗血症性肺傷害における2型自然リンパ球の疲弊を起こす
3. 学会等名 第35回日本Shock学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤間悠一, 朴恩正, 佐藤尚子, 川本英嗣, 伊藤亜紗実, 伊藤温志, 江角亮, 池尻薫, 今井寛, 島岡要
2. 発表標題 敗血症性肺傷害における2型自然リンパ球の機能解析
3. 学会等名 第47回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石倉 健, 奥野 郁斗, 池尻 薫, 江角 亮, 赤間 悠一, 川本 英嗣, 鈴木 圭, 横山 和人, 金子 唯, 今井 寛
2. 発表標題 急性肺血栓塞栓症による心肺停止に対して、肺循環維持をした人工心肺補助装置管理で救命できた一例
3. 学会等名 第47回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 赤間 悠一, 金子 唯, 鈴木 圭, 武田 多一, 石倉 健, 横山 和人, 川本 英嗣, 家城 洋平, 佐々木 賢, 今井 寛
2. 発表標題 救急外来におけるCT室への搬送距離延長がICU入室患者にもたす影響
3. 学会等名 第47回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石倉 健, 奥野 郁斗, 池尻 薫, 江角 亮, 赤間 悠一, 伊藤 亜紗実, 新貝 達, 鈴木 圭, 金子 唯, 今井 寛
2. 発表標題 病院前12誘導心電図伝送による緊急カテーテルチームのワークライフバランス改善の可能性について 三重ACSレジストリより
3. 学会等名 第48回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金子 唯, 山口 貴則, 赤間 悠一, 新貝 達, 伊藤 亜紗実, 家城 洋平, 川本 英嗣, 横山 和人, 石倉 健, 今井 寛
2. 発表標題 院外心停止に対するECPRの予後良好に関わる因子の検討
3. 学会等名 第48回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 江角 亮, 家城 洋平, 赤間 悠一, 新貝 達, 金子 唯, 今井 寛, 石倉 健
2. 発表標題 地方大学病院での外傷カンファレンスを通じた診療体制づくりの試み
3. 学会等名 第34回日本外傷学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金子 唯, 山口 貴則, 赤間 悠一, 伊藤 亜紗実, 宮村 岳, 家城 洋平, 鈴木 圭, 石倉 健, 武田 多一, 今井 寛
2. 発表標題 院外心停止へのECPR対応へむけた病院前因子の検討
3. 学会等名 第23回日本臨床救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	朴 恩正 (Park Eun Jeong) (20644587)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	佐藤 尚子 (Sato Naoko) (90732446)		
研究協力者	川本 英嗣 (Kawamoto Eiji) (20577415)		
研究協力者	伊藤 温志 (Ito Atsushi) (80783133)		
研究協力者	今井 寛 (Imai Hiroshi) (00184804)		
研究協力者	島岡 要 (Shimaoka Motomu) (40281133)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関