

学内グラント 報告書

平成27年度 学内グラント終了時報告書

NKT細胞および制御性T細胞の敗血症における役割の解明と臨床応用の探索

研究代表者 樽本 憲人 (大学病院 感染症科・感染制御科)

緒言

敗血症とは、感染症に対する制御不能な宿主反応に起因した生命を脅かす臓器障害と定義される¹⁾。感染により惹起された過剰なサイトカインにより、臓器の循環障害をおこし、多臓器不全におちいり、不良な転帰をたどる^{2,3)}。特に、敗血症性ショックに陥った場合には、死亡率は45%にもほるため²⁾、さらなる病態の解明や治療法の探索は重要である。

C5aは、敗血症における主要なメディエーターの一つであることが知られている。好中球からの活性酸素や炎症性サイトカインの産生を誘導するなど、多彩な炎症反応惹起するほか、近年の報告では、C5aはリンパ球のアポトーシスとその減少に関与するとされる⁴⁾。これらの反応の結果、免疫機能低下、多臓器不全、凝固異常などが引き起こされる⁵⁾。C5aの受容体として、C5aRとC5L2の存在が知られており、免疫細胞において発現する⁶⁾。マウスでは、感染によりNKT細胞における発現が増強することが知られているが⁷⁾、ヒトにおける報告は少ない。また、近年regulatory T cell (Treg) が敗血症の早期に影響すること知られているが⁸⁾、C5aRが発現するかどうかは知られていない。今回、感染症患者におけるリンパ球にこれらが発現するかどうかを確認した。

材料と方法

入院中の患者で、臨床的に敗血症が疑われたヒト症例を感染症群とし、ボランティアの健常人(4名)を対象群とした。説明と同意を得たのちに、30 ccのフローサイトメトリー用の末梢血をヘパリン管に、5 ccの血漿中サイトカイン測定用の末梢血をEDTA-2K管に採取して以下の手順で保存および解析を行った。感染症群においては、後日、診療録から、血液検査や血液培養結果を含む臨床情報も収集した。

保存は、血液をHistopaque (SIGMA) を用いて、室温、400 xg, 25 minでプレーキなしで遠心してリンパ球を分離した。FACS buffer (BD Diagnostic Systems) で2回洗い(室温、400 xg, 5 min)、5 μ LのsampleをTurk液で希釈し、細胞をカウント後、セルバンカー1 (日本全薬工業) で 1.0×10^6 /mL

に調整し、緩徐に-80°Cにして、使用するまで保存した。

また、解析までは、以下の手順で行った。37°Cに調節したwater bathで解凍後、FACS bufferで2回washし、5 μ LのsampleをTurk液で希釈し、細胞をカウント後、 2.5×10^7 /mLに調整した。このsampleに10%量のHuman TruStain FcX™ (Biolegend) を混和して、冷所で10 min静置、フローサイト用の各抗体を混ぜた試薬に、sampleを混ぜて、冷所で30 min暗所で静置した。2回洗い、FACS bufferで300 μ Lに調整した。フローサイトメトリーの直前に、3 μ Lの7-AAD (Biolegend) を添加し、室温で10 min静置して、FACS canto II (BD Diagnostic Systems) で測定した。

解析用の抗体として、anti-CD3 (SK7, APC conjugated)、anti-CD19 (HIB19, PerCP conjugated)、anti-CD4 (OKT4, APC-Cy7 conjugated) anti-C5aR (S5/1, PE-Cy7 conjugated)、anti-CD25 (BC96, AL488 conjugated) を使用した。以上はBiolegendから入手した。また、invariant NKT (iNKT) 細胞の検出抗体として、PEでラベルされたCD1d tetramer with α -galactosylceramide (ProImmune) を用いた。compensationには、OneComp Beads (eBioscience) を用いた。

サイトカインの測定用に、上清を遠心し、-20°Cで保存した。解析時には室温で解凍し、IL-1 β 、IL-6、IFN γ 、IL-10をBD CBA Flex set™ (BD Diagnostic Systems) を用いたbead-based immunoassayで測定した。

フローサイトメトリーの解析には、FlowJo™ v10 (FlowJo) を用いて行った。また、統計解析における有意差検定には、studentのt検定を用いた。本研究は、関越病院の院内倫理委員会です承されたのちに開始された。

結果

敗血症が疑われた感染症群は5例とした。感染症群の平均年齢は81.8歳で、全員女性であった。感染症のフォーカスとしては、尿路感染症が3例、肺炎が1例、感染部位不明が1例であった。血液培養結果陽性であったのは2例(メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、大腸菌、各1例)であり、PCTは5例中4例陽性(平均23.2 ng/mL)であった。

リンパ球の解析として、CD3⁺細胞(T細胞)、およびCD3⁺PerCR⁻CD4⁺細胞(CD4陽性T細胞)を確認した(Fig. 1)。

これらは、感染症群と対象群において、差を認めなかった。また、 α -galactosylceramide-loaded CD1d tetramerで検出される、iNKT細胞の検出を試みたが、これも有意な差はみられなかった。また、活性化マーカーとして知られるCD25も確認したが、有意差はないものの、T細胞、CD4陽性T細胞、iNKT細胞において、感染症群で活性化している

傾向が見られた。これらの細胞は炎症性サイトカインを産生するため、サイトカインを測定したが、炎症性サイトカインであるIL-1 β 、IL-6、IFN γ などは感染症群において増加傾向がみられ、あわせて測定した抑制性サイトカインであるIL-10も感染症群で有意な増加を認めていた (Fig. 2)。

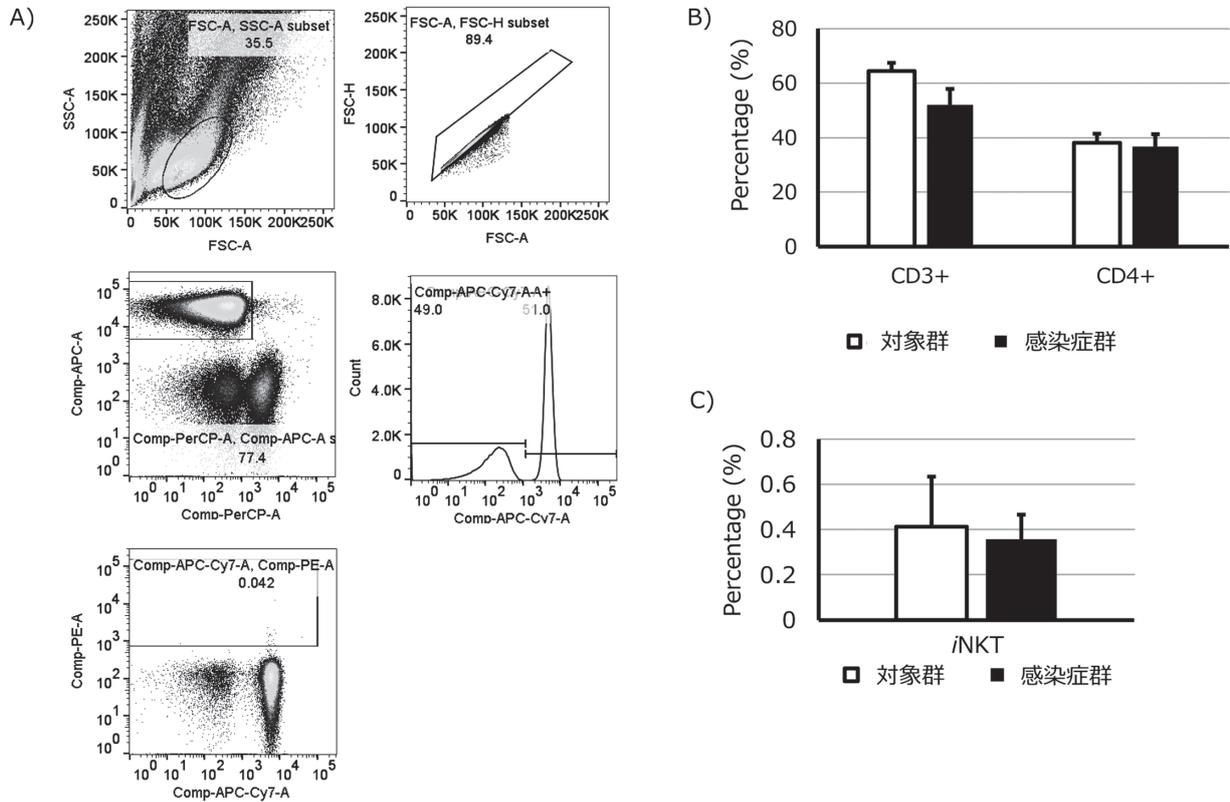


Fig. 1. リンパ球に占めるT細胞、CD4陽性T細胞、iNKT細胞の割合を確認した。A) フローサイトメトリーによる各リンパ球のサブセット。左上段のゲート内がリンパ球、左中段のゲート内がCD3⁺ (T細胞)、右中段の右のゲート内がCD4⁺、下段のゲート内がiNKT細胞を示す。B) 対象群と比較して、T細胞、CD4陽性T細胞との差はみられなかった。C) 対象群と比較して、感染症群におけるiNKT細胞の割合は、変わらなかった。

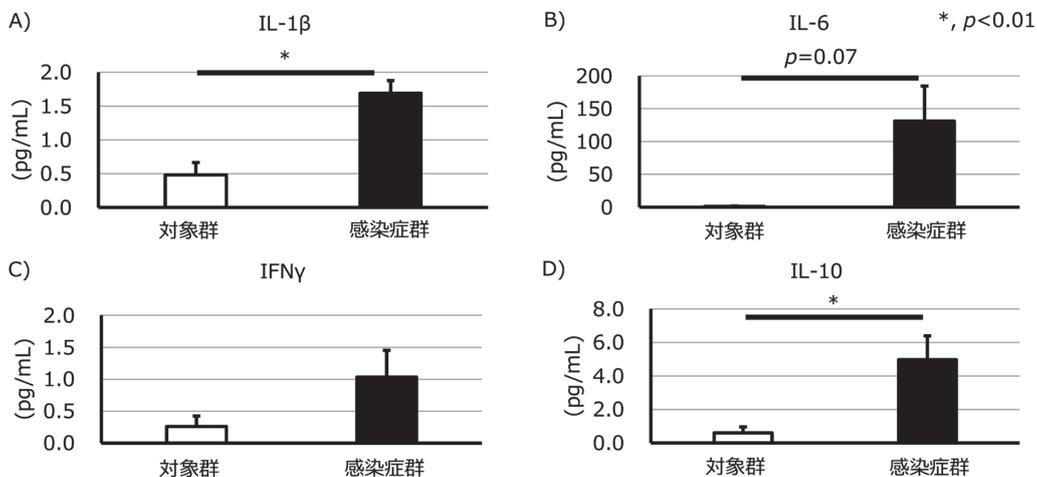


Fig. 2. 炎症性サイトカインであるIL-1 β (A), IL-6 (B), IFN γ (C), および炎症抑制性サイトカインであるIL-10 (D)が、感染症群で有意に上昇していた。

また、各リンパ球におけるC5aの受容体の1つであるC5aRの発現について検討した (Fig. 3). T細胞およびCD4陽性T細胞に占めるC5aR陽性率の平均は、それぞれ0.91%、0.84%で、健常人の0.35%、0.28%と比較して、C5aRの発現が有意に増えていた。また、iNKT細胞においても、有意差はないものの同様の傾向がみられた。また、

細胞マーカーとして、 $CD4^+CD127^{lo}CD25^+$ であらわされるリンパ球がFoxP3⁺Tregであるとされる。リンパ球に占めるFoxP3⁺Tregの割合を確認したところ、対象群との差はみられなかったが、C5aRの発現について確認したところ、感染群において、有意な増加がみられた (Fig. 4).

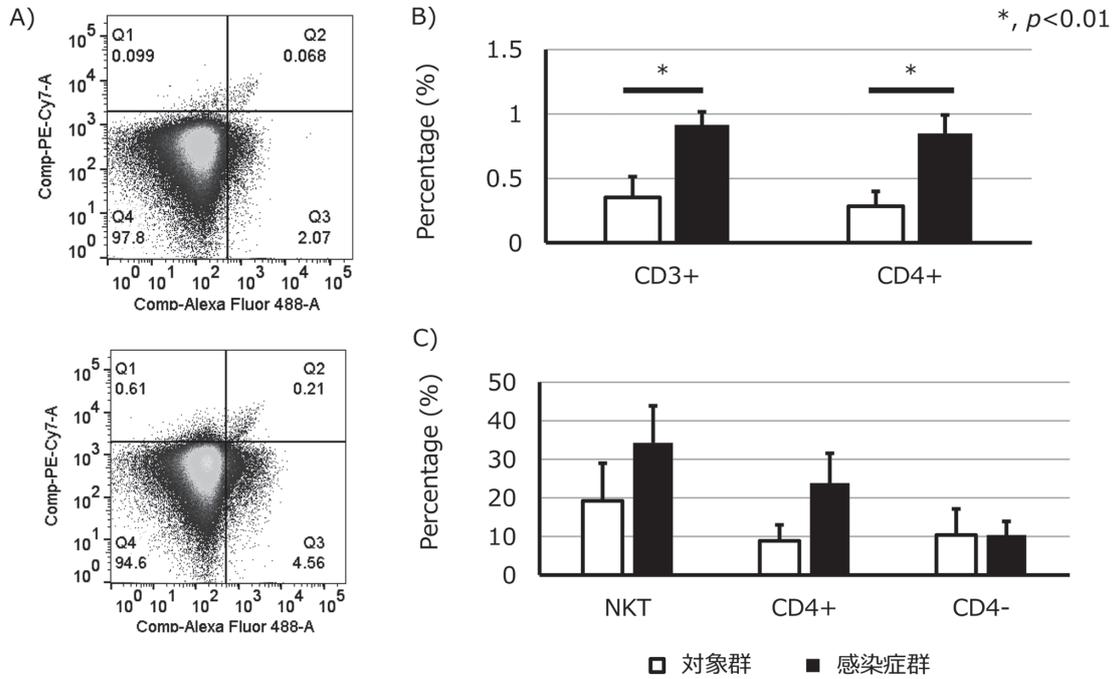


Fig. 3. C5aRの発現率を確認した. A) PE-Cy7陽性のゲート (Q1+Q2) は、C5aRが発現しているサブセットを示す. 対象群 (上段) と感染症群 (下段). B) CD3⁺細胞 (T細胞), CD4⁺細胞における、C5aR陽性率に関する対象群と感染症群を比較したところ、感染症群とので有意な増加がみられた. C) iNKTと、iNKT細胞中のCD4⁺, CD4⁻のサブセットのそれぞれにおけるC5aR陽性率を確認したところ、感染症群でC5aRの発現は増加していた.

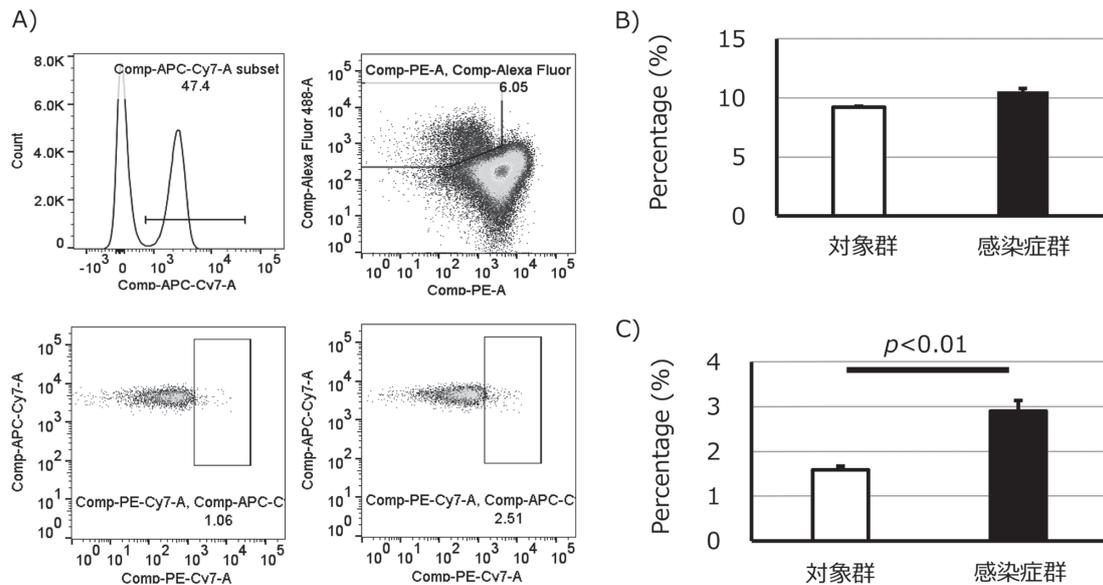


Fig. 4. FoxP3⁺Tregの割合とC5aR発現率を確認した. A) 左上はCD4⁺のサブセット, 右上のゲート内はCD127^{lo}CD25⁺のサブセット (FoxP3⁺Treg). 下段はC5aR⁺のサブセット. 左下が対象群, 右下が感染症群. B) Treg細胞は対象群と感染症群との比較で増加がみられなかった. C) Treg細胞において、感染症群でC5aRの発現は有意に増加していた.

考察

今回、敗血症を疑う感染症患者の末梢血中のリンパ球を用いて、フローサイトメトリーにより、CD3⁺サブセットのT細胞、CD19⁻CD4⁺サブセットのCD4陽性T細胞、CD4⁺CD129^{lo}CD25⁺のサブセットのFoxP3⁺Treg細胞を検出、解析した。また、 α -galactosylceramideを結合させたCD1d tetramerを用いて*i*NKT細胞を検出、解析した。リンパ球に占める、各細胞の割合が減少しているかどうか確認したが、感染群と対象群との間に差はみられなかった。特に、従来の報告では、敗血症症例において、末梢血中の*i*NKT細胞は減少し、FoxP3⁺Treg細胞は増加することが報告されている^{9,10)}。差が見られなかった理由としては、検討した症例数が少なかったこと、細胞の保存状態が解析に適さなかった可能性があること、などが原因として考えられた。よって、改善点として、保存についての条件を見直したり、検体採取後に保存を行わず、直接解析すること、そのほか症例を増やすこと、などが考えられた。

また、C5a受容体の一つであるC5aRの発現について、各細胞群における解析を行った。T細胞、CD4陽性T細胞、FoxP3⁺Treg細胞などにおいて、感染群で有意にC5aRが増加していた。特に、マウスにおいては、感染により、NKT細胞に占めるC5aRが増加するとの報告があるが、残念ながら、NKT細胞においては、有意な差をもった増加は認められなかった。これは、検出されたNKT細胞数が少なかったことも、原因の一つと考えられた。NKT細胞は、C5aRを介してTRLや炎症性サイトカインの産生を制御するとされる⁷⁾。そのほか、FoxP3⁺Tregをはじめとした免疫細胞における、C5aRの役割も解明していくことも必要と考えられた。

炎症性および抑制性のサイトカインをbead-based immunoassayにより測定したところ、感染において、IL-6群が高い傾向がみられた。NKT細胞を含めた各免疫細胞においてIFN γ が産生されるが、血清中の濃度としてあまり上昇がみられなかった。そのほかの炎症性サイトカインおよび抑制性サイトカインにおいても、数 pg/mLと、かなり濃度が低かったが、感染群で上昇がみられ、これは従来の報告と同様と考えられた。

以上のまとめとして、NKT細胞やTreg細胞など、敗血症において重要な役割を果たす細胞において、C5aRを解析したところ、T細胞やCD4細胞だけではなく、Treg細胞もC5aRの発現が上昇していた。今後、各種免疫細胞の敗血症の病態に果たす役割を解析していくことが重要であると考えられた。

参考文献

- 1) Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315: 801-10.
- 2) Wenzel RP. Treating sepsis. *N Engl J Med* 2002; 347: 966-7.
- 3) Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003; 348: 138-50.
- 4) Grailer JJ, Fattahi F, Dick RS, Zetoune FS, Ward PA. Cutting edge: critical role for C5aRs in the development of septic lymphopenia in mice. *J Immunol* 2015; 194: 868-72.
- 5) Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 776-87.
- 6) Sarma JV, Ward PA. New developments in C5a receptor signaling. *Cell Health Cytoskeleton* 2012; 4: 73-82.
- 7) Fusakio ME, Mohammed JP, Laumonier Y, Hoebe K, Kohl J, Mattner J. C5a regulates NKT and NK cell functions in sepsis. *J Immunol* 2011; 187: 5805-12.
- 8) Tatura R, Zeschning M, Hansen W, Steinmann J, Vidigal PG, Hutzler M, et al. Relevance of Foxp3(+) regulatory T cells for early and late phases of murine sepsis. *Immunology* 2015; 146: 144-56.
- 9) Gogos C, Kotsaki A, Pelekanou A, Giannikopoulos G, Vaki I, Maravitsa P, et al. Early alterations of the innate and adaptive immune statuses in sepsis according to the type of underlying infection. *Crit Care* 2010; 14: R96.
- 10) Venet F, Pachot A, Debard AL, Bohe J, Bienvenu J, Lepape A, et al. Increased percentage of CD4+CD25+ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4+CD25- lymphocytes. *Crit Care Med* 2004; 32: 2329-31.

研究成果リスト

学会発表

- 1) 樽本憲人, 酒井 純, 石 良介, 筋野恵介, 山口敏行, 前崎繁文. 敗血症患者のリンパ球におけるC5a受容体の発現に関する解析, 第90回日本感染症学会総会・学術講演会, 平成28年4月, 仙台