

主論文

Spred2-Deficiency Protects Mice from Polymicrobial Septic Seritonitis by Enhancing Inflammation and Bacterial Clearance

(Spred2 欠損マウスは炎症反応の増強および細菌排除能の亢進を示し、多種細菌性敗血症性腹膜炎に抵抗性を有する)

[緒言]

敗血症による死亡は依然として多く、米国では年間 100-200 万人と推計されている。医療の発展に関わらず、敗血症による死亡率(30-50%)は過去 30 年間でほとんど改善していない。敗血症の病態は補体系や線維素溶解系、サイトカインなどが複雑に関与し、炎症応答や凝固異常、多臓器不全などを引き起こす。敗血症における細胞内シグナル伝達経路の関与について、これまで我々は敗血症モデルマウスを用い、STAT やその **negative regulator** である SOCS の重要性を示してきた。今回、同様の敗血症モデルを用い、代表的な細胞伝達経路である MAPK 経路の関わりを、その **negative regulator** である Spred2 のノックアウトマウスを使用し解析を行った。

[材料と方法]

試薬

FITC または PE 標識されたモノクローナル抗体はいずれも BioLegend 社または BD Biosciences 社から市販されているものを使用した。

動物実験

C57BL/6J 系の Spred2 ノックアウトマウス(以下 KO)を作製した。これらのマウスの細胞から得られた細胞は Spred2 の発現が無いことを TaqMan RT-qPCR にて確認した。野生型(以下 WT)、KO いずれもオスのマウス(10-12 週齢)を用いた。

敗血症モデルマウスの作製

盲腸結紮穿孔術(Cecal ligation and puncture、以下 CLP)を用いた。以下、簡単に CLP の施術法を述べる。まず、マウスをケタミンとペントバルビタールで麻酔し、腹壁正中を約 1cm 切開する。盲腸を同定し、盲端から約 1cm の部位を絹糸にて結紮する。その後結紮された 1cm 長の盲腸の中央部を 18 ないし 22 ゲージ針を用いて穿孔させ、腹壁を外科用クリップにて閉創する。術後 1ml の温生食を皮下注したが、抗生物質の投与は行っていない。

生存率評価の実験では 18 ゲージ針を用い、術後 10 日目まで観察した。これ以外の実験では 22 ゲージ針を用い、24 時間後にサンプルを回収した。

細菌量の測定

CLP 術後 24 時間経過したマウスの腹腔洗浄液および血清を連続希釈し、TSA 培地上で 37°C overnight 培養した。目視にて確認できる好気性細菌コロニーを数え、希釈前の細菌量を推定した。

マクロファージおよび好中球の分離

CLP を施行していないナイーブマウスの腹腔を洗浄し、得られた細胞を 10 万個ずつプレートにて 1 時間培養した。1 時間後にプレートに接着している細胞は約 96% が F4/80 陽性で、マクロファージと考えられた。また、腹腔に 1ml の 4% チオグリコレート (以下 TG) を注入し、16 時間後に腹腔細胞を回収した後、マクロファージと好中球はフローサイトメトリー (以下 FCM) でそれぞれ F4/80、Ly6G 陽性細胞として分離された。

マクロファージの活性化

マクロファージの産生するサイトカインおよびケモカインを測定するため、上述の方法にて分離された接着マクロファージを 100ng/ml の LPS にて刺激した。24 時間後、培養上清を回収した。また MAPK 阻害薬である U0126 を用いた実験では、LPS に加えて 5 μ M U0126 を加えた。

貪食能

マクロファージおよび好中球の貪食能の測定はバイオパーティクル (Alexa Fluor 488 標識された大腸菌の死菌) (Thermo Fisher Scientific K.K 社) (以下 BP) を用いた。マクロファージないし好中球 10 万個を同数の BP と 1 時間培養し、細胞内の蛍光強度を FCM にて定量した。

活性酸素の測定

活性酸素 (reactive oxygen species、以下 ROS) の測定は TG 刺激後 16 時間の腹腔細胞を 100ng/ml の LPS で 4 時間刺激した後、10 μ l の CellROX green reagent (5 μ M, Thermo Fisher Scientific 社) にて染色した。これらも蛍光色素であり、FCM にて蛍光強度を測定し定量化した。

フローサイトメトリー

得られた細胞を抗 CD16/32 抗体にて Fc ブロックし、FITC あるいは PE 標識抗体にて染色した。蛍光強度は MAQSQuant analyzer (Miltenyi Biotec 社) にて測定した。全ての実験でコンペンセーションを施行した。

サイトカイン濃度の測定

サイトカインおよびケモカイン濃度の測定はサンドウィッチ ELISA 法にて行った。

統計的手法

全ての実験は 2 回以上繰り返して行われた。データ解析は GraphPad Prism (GraphPad Software 社)を用いた。Student t 検定およびカプランマイヤー生存曲線法を用いた。全ての解析において $p < 0.05$ を統計学的有意差ありと判定した。

[結果]

KO では CLP による自然免疫応答が増強される

18 ゲージ針にて CLP を施術された WT および KO の生存率について、WT では 10 日目での生存率が 19%であったのに対し、KO では 56%と有意に高かった。22 ゲージ針 CLP24 時間後の全ての腹腔細胞をカウントしたところ、KO では WT の 1.3-1.4 倍の細胞数であった。次に、腹水中のサイトカインを ELISA 法にて測定した。IL-6, CXCL1, CCL2 については KO が有意に高値を示した。血清についても類似した結果が得られた。さらに、CLP24 時間後の腹水の細菌量を測定したところ、KO において有意に細菌量が少なかった。

KO マクロファージはより強いサイトカイン産生能を有する

ナイーブの腹腔細胞を回収し、LPS 刺激によりサイトカイン産生を促し、培養上清のサイトカイン濃度を測定した。KO マクロファージは IL-6, CXCL1 および CCL2 の産生能が有意に高かった。さらに、このサイトカイン産生能が MAPK 経路の亢進の結果であることを示すため、MAPK 阻害薬である U0126 にて産生が減弱することを確認した。

KO マクロファージはより強い細菌貪食能を有する

KO において細菌量が少なかった原因を調べた。ナイーブマウスから回収したマクロファージを BP と共培養したところ、KO マクロファージは有意に貪食能が高値であった。TG 刺激 16 時間における腹腔細胞を回収し、マクロファージと好中球それぞれの貪食能を測定したが、この実験では有意な貪食能の差は認められなかった。なお、ROS 産生についても調べたが、WT と KO の間に優位な差は見られなかった。

KO マクロファージは補体レセプター (以下 CR1/2) を高発現している

貪食能に関連した分子をいくつかピックアップし、KO マクロファージにおける発現を調べた。検討した CR64, I-A/I-E (MHC class II), CR1/2, TLR4 のうち、CR1/2 のみが LPS 刺激された KO マクロファージで高発現を示した。ナイーブマクロファージでは CR1/2 の発現に差は認められなかった。次に、CR1/2 の発現が MAPK 経路の亢進の結果であることを示すため、U0126 で MAPK 経路を阻害したところ、CR1/2 の発現が減弱した。

KOにおける炎症応答亢進はCR1/2高発現に依存している

CLP 施行の 2 時間前に、抗 CR1/2 抗体 (中和抗体) を腹腔内投与した。これにより腹腔内洗浄液中のサイトカイン濃度は有意に減少し、同時に腹腔内細胞数も減少した。また、細菌量が有意に増加した。これらの結果は、KO における炎症応答 (サイトカイン濃度、細胞数、細菌量) はいずれも CR1/2 の高発現に依存していることを強く示唆している。

[考察]

我々は以前、LPS 肺炎モデルにおいて、Spred2 KO マウスが有意に多くのサイトカインを分泌することを示しており、さらにアセトアミノフェン肝炎モデルにおいても KO において同様に多くのサイトカインがクッパー細胞や NK 細胞から分泌されることを示している。サイトカインやケモカインは敗血症など細菌に対する自然免疫において重要な役割を有しており、KO が敗血症に抵抗性を示すという仮説を立てた。本論文において、KO は WT に比し、CLP による敗血症に有意に抵抗性を示すことを確認した。この抵抗性は主として炎症細胞浸潤の多さ、貪食能の亢進によると考えられた。MAPK 経路により発現が調節されている CR1/2 は、少なくとも部分的には貪食能亢進に寄与していると思われる。

CR1 および CR2 は同じ *Cr2* 遺伝子にコードされたスプライシングの異なる産物で、CR2 は B 細胞と濾胞樹状細胞に、CR1 はマクロファージや赤血球など様々な細胞に発現している。CR1 は C3b と、CR2 は C3d と結合し、自然免疫・獲得免疫において、貪食や補体調節など重要な役割を果たしていることが報告されている。さらに最近、CR1/2 欠損マウスに肺炎球菌を感染させたところ、欠損マウスは有意に死亡率が高いことが報告された。これらの結果は我々が示した CR1/2 高発現、および貪食能亢進や細菌量減少に合致する報告である。

MAPK 経路は自然免疫・獲得免疫において最も重要な細胞内シグナル伝達経路の 1 つであり、MAPK 経路の阻害により様々な免疫学的調節不全が起こると報告されている。今回我々の実験では KO マクロファージにおける炎症細胞増多、CR1/2 高発現は MAPK 経路阻害薬である U0126 により抑制され、これらが MAPK 経路の下流に存在することが強く示唆された。

[結論]

Spred2 KO マウスでは、マクロファージ上の CR1/2 の発現が亢進し、その結果 WT に比して炎症細胞増加、サイトカイン産生亢進、細菌量の減少が起こっていると考えられた。さらに CR1/2 は MAPK 経路の下流に位置することを示し、Spred2 が敗血症において重要な役割を果たすことを確認した。