

## 【要約】

T cell autophagy plays a protective role through inhibition of apoptosis in a murine sepsis model

(マウス敗血症モデルにおいて T 細胞オートファジーは  
アポトーシス抑制を介して生体保護的役割を担う)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：織田 成人教授)

大網 毅彦

## 目的

敗血症は救急集中治療領域で今なお死亡率の高い疾患であるが、近年の集中治療の進歩やガイドラインの整備によって徐々に治療成績は向上している。しかし、敗血症急性期を乗り越えた後に免疫麻痺の病態に陥ることによって、感染症の併発から長期予後の悪化につながる事が報告されている。敗血症では  $CD4^+$  T 細胞をはじめとした免疫担当細胞のアポトーシスによる免疫麻痺が知られているが、いまだ免疫麻痺に対する画期的な治療は確立されていない。一方で、アポトーシス（I型プログラム細胞死）と異なるタイプのプログラム細胞死を惹起し得るオートファジー（II型プログラム細胞死）の関与は十分に解明されていない。そこで、盲腸結紮穿孔（CLP）敗血症モデルを用いて免疫麻痺とオートファジーの関連を明らかにする。

## 方法

T 細胞のオートファジーが敗血症の免疫麻痺の病態にどのように関与しているかを解析するために、T 細胞特異的にオートファジーを欠損させた *Atg5* コンディショナルノックアウトマウス ( $CD4\text{-Cre}/Atg5^{ff}$ ) を作成した。 $CD4\text{-Cre}/Atg5^{ff}$  マウスとコントロール群マウスに対して、結紮した盲腸に 23G 針で 2 穴の侵襲を加えた CLP 手術を施して腹膜炎敗血症モデルとした。術後 24 時間における脾臓リンパ球数やリンパ球分画の推移、AnnexinV 染色によるアポトーシス活性を flow cytometry で測定し、両群の  $CD4^+$  T 細胞のアポトーシス関連遺伝子発現を解析した。また、術後 24 時間で採取した  $CD4^+$  T 細胞に対して抗 CD3 抗体・抗 CD28 抗体刺激によるサイトカイン産生能を評価した。さらに、両群の生存率を経時的に比較した。

## 結果

術後 24 時間で  $CD4\text{-Cre}/Atg5^{ff}$  の  $CD4^+$  T 細胞の割合は低下し (Fig. 1), さらに単開腹 (Sham) 群と比べて CLP 群でわずかに割合が低下していた。B 細胞では各群のアポトーシス活性に差を認めなかったが、 $CD4\text{-Cre}/Atg5^{ff}$  マウスの CLP 群で  $CD4^+$  T 細胞のアポトーシス活性が有意に亢進していた (Fig. 2A, B)。 $CD4\text{-Cre}/Atg5^{ff}$  マウスの CLP 群でアポトーシス関連遺伝子である *BIM*・*PDCD1* の発現が亢進する一方、アポトーシス抑制遺伝子である *BCL2* の発現は有意

に低下していた (Fig. 3). さらに,  $CD4^+$ T 細胞の IL-10 産生は CLP 群の  $CD4\text{-Cre}/Atg5^{ff}$  マウスで有意に上昇していた (Fig. 4). そして, 生存率は CLP 群の  $CD4\text{-Cre}/Atg5^{ff}$  マウスで有意に低下していた ( $p=0.016$ ) (Fig. 5).

### 考察

敗血症の病態で T 細胞のオートファジーはアポトーシスとのクロストークを介してプログラム細胞死を抑制しており, 生体保護的に働いている可能性が示唆された. オートファジーを抑制することによりアポトーシスが亢進していたことから, オートファジー機構活性化による免疫麻痺の改善を企図した敗血症治療への応用が期待される.

### 結論

T 細胞のオートファジーを抑制することにより, 敗血症の病態でアポトーシスが亢進し, 生存率が低下した.

### 【Figure legend】

#### Fig. 1

$CD4\text{-Cre}/Atg5^{ff}$  マウスとコントロールマウスの術後 24 時間における  $CD4^+$ T 細胞と  $CD8^+$ T 細胞の割合. 脾臓リンパ球を抗  $CD4^+$ /PE 抗体および抗  $CD8^+$ /APC 抗体で染色し, flow cytometry で解析した.

#### Fig. 2A

$CD4\text{-Cre}/Atg5^{ff}$  マウスとコントロールマウスの術後 24 時間における  $CD4^+$ T 細胞と  $CD8^+$ T 細胞の AnnexinV 陽性細胞の割合及び PI (Propidium Iodide)陽性細胞数の割合. 脾臓リンパ球を抗  $CD4^+$ /PE 抗体および抗  $CD8^+$ /APC 抗体, AnnexinV, PI で染色し, flow cytometry で解析した. データは平均および標準偏差で表した.

#### Fig. 2B

$CD4\text{-Cre}/Atg5^{ff}$  マウスとコントロールマウスの術後 6 時間, 24 時間における各リンパ球分画の AnnexinV 陽性細胞の割合及び PI 陽性細胞数の割合. 脾臓リンパ球を抗  $CD4^+$ /PE 抗体および抗  $CD8^+$ /APC 抗体, 抗 B220/APC 抗体で染色し, flow cytometry で解析した. データは平均および標準偏差で表した. 実験に使用したマウ

スは 8-10 匹であった。#  $p < 0.05$  を統計学的な有意差とした。

Fig. 3

CD4-Cre/Atg5<sup>ff</sup> マウスとコントロールマウスの術後 24 時間における CD4<sup>+</sup>T 細胞のアポトーシス関連遺伝子発現。データは平均および標準偏差で表した。実験に使用したマウスは 8-10 匹であった。#  $p < 0.05$  を統計学的な有意差とした。

Fig. 4

CD4-Cre/Atg5<sup>ff</sup> マウスとコントロールマウスの術後 24 時間における CD4<sup>+</sup>T 細胞のサイトカイン産生能の評価。各群の CD4<sup>+</sup>T 細胞を抗 CD3 抗体・抗 CD28 抗体で 24 時間刺激し、リンパ球上清中の IL-2 (Interleukin-2)・IFN- $\gamma$  (Interferon-gamma)・IL-10 濃度を ELISA (Enzyme Linked Immuno Solvent Assay) で測定した。データは平均および標準偏差で表した。実験に使用したマウスは 8-10 匹であった。#  $p < 0.05$  を統計学的な有意差とした。

Fig. 5

CLP 手術を施行した CD4-Cre/Atg5<sup>ff</sup> マウスとコントロールマウスの生存率の比較。12 時間おきにマウスの生存を確認し、両群の生存率を log-rank test で検定した。#  $p < 0.05$  を統計学的な有意差とした。