

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (医学)	氏名	HO MINH VAN
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 ①・2 項該当		
論文題目 Sera from Septic Patients Contain the Inhibiting Activity of the Extracellular ATP-Dependent Inflammasome Pathway (敗血症患者の血清には細胞外 ATP 依存性インフラマソーム経路の活性抑制物質が含まれる)			
論文審査担当者			
主査教授	大毛宏喜	印	
審査委員教授	秀道広		
審査委員准教授	横崎典哉		
〔論文審査の結果の要旨〕 敗血症は感染に起因する全身性炎症により、多臓器不全、死亡を含む重篤な転機をもたらす。この原因として、血管内皮障害、代謝異常、病原微生物に起因する分子に対する過剰な高度炎症・免疫反応が重要な機序として提唱されている。敗血症に起因する免疫抑制状態は、自然・獲得免疫の双方が抑制された状態であり、多くの研究の対象となっている。 自然免疫により惹起される炎症反応は病原体排除を促進するが、マクロファージから炎症促進性・炎症抑制性のサイトカインが過剰に産生されることにより、過度の炎症が引き起こされる。Tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF $\alpha$ )、interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、IL-6 などの一次性炎症性サイトカインは過剰な急性炎症を惹起し、細胞障害あるいは細胞死の原因となる。次に、障害された組織と細胞死は damage-associated molecular patterns (DAMPs) を放出し、それにより活性化されたインフラマソームが炎症を促進、あるいは抑制する。その機序は不明だが、敗血症の場合にも DAMPs は関連している。DAMPs は nucleotide oligomerization domain-like receptor (NLR) インフラマソームを刺激し、caspase-1 が活性化され、IL-1 $\beta$ の前駆体をプロセッシングして活性型 IL-1 $\beta$ が生成される。NLR のうち NLRP3 は特に adenosine triphosphate (ATP)、crystalline substances、nucleic acids 及び hyaluronan を含む様々な DAMPs に特に感受性が高い。本研究の目的は、敗血症患者の血清を用いて、DAMPs やインフラマソームによる自然免疫反応変化の性質を検出し、敗血症により起こる免疫抑制状態の機序を解明することである。 THP-1 ヒト急性単球性白血病細胞から採取されたマクロファージを各 DAMPs、患者血清を加えて培養した。敗血症あるいは外傷による重症患者の血清を高度救命救急センター・ICU に入室時に採取した。血清上澄み液のサイトカインを定量し、細胞溶解液から細胞内シグナルメディエーターを分析した。 結果として、敗血症患者の入院時血清は、マクロファージからの in vitro での IL-1 $\beta$ 産生を抑制した。しかしながら、外傷患者や健康者ではそのような事象は見られなかった。このことにより、敗血症血清は、炎症促進・抑制性のサイトカインが双方ともに増加しているにも関わらず、炎症抑制性の働きが優勢であることが示唆された。特に、敗血症患者のうち非生存群の血清では、細胞外の adenosine triphosphate (ATP) に反応して IL-1 $\beta$ 産生が強く抑制された。この効果は day3 で最も強く、day7 まで持続していた。しかし、THP-1 マクロファージが敗血症患者の生存群の血清により処理された場合にはこの効果は観察されなかった。以上より、敗血症患者の血清には固有の炎症抑制作用があり特に細胞外 ATP への反応を抑制する因子を含んでいることが仮説として提唱され、その機序として①敗血症血清の ATPase による ATP 加水分解、②P2X <sub>7</sub> の抑制、③NLRP3 インフラマソームの抑制が推測された。 次に、細胞外 ATP による IL-1 $\beta$ 産生低下の機序を解明するための実験を行った。結果として、敗血症患者の血清での ATPase の活性は非常に低く、また、敗血症患者の非生存群の血清では P2X <sub>7</sub> が活性化していた。加えて、細胞溶解は ATP 依存性インフラマソームの経路を経て細胞質メディエーターが分泌されることで起こる。敗血症患者血清 (day 1) では、ATP シグナルに必須である inositol 1, 4, 5-triphosphate と			

cytosolic calcium が低下していた。また、day7 血清で処理された細胞内では、活性化 caspase-1 が低下していた。

以上の結果を踏まえると、細胞外 ATP に起因する NLRP3 と caspase-1 の活性化は、敗血症患者の血清に存在する物質により抑制されることが示唆された。この抑制効果は、非生存群の患者血清でより強く明確であり、遷延する免疫抑制状態と患者予後不良に明らかに関連していた。

本研究の結果より、敗血症患者血清は、NLRP3 経路の上流あるいは炎症促進経路の上流を抑制することで、細胞外 ATP を介したマクロファージによる IL-1 $\beta$  の産生を抑制した。この抑制効果は敗血症患者の非生存群では入院後 day3 で最も強く、day7 まで持続していた。これらの結果から、敗血症による免疫抑制状態の新しい機序が示唆され、自然・獲得免疫の持続的な抑制は敗血症患者の後期死亡の原因であるという仮説が部分的に支持された。結論として、敗血症患者の血清に存在する因子は細胞外 ATP 依存性の免疫反応を持続的に抑制することで臨床的予後の悪化につながる。

以上の結果から、本論文は敗血症患者の免疫抑制状態の原因となる血清中物質による自然免疫反応抑制の機序の解明における有用性を証明し、救急集中治療医学の進歩に寄与しうるものである。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。

## 最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	HO MINH VAN
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 Sera from Septic Patients Contain the Inhibiting Activity of the Extracellular ATP-Dependent Inflammasome Pathway (敗血症患者の血清には細胞外 ATP 依存性インフラマソーム経路の活性抑制物質が含まれる)			
最終試験担当者 主査 教授 大毛 宏喜 印 審査委員 教授 秀 道 広 審査委員 准教授 横 崎 典 哉			
〔最終試験の結果の要旨〕  判 定 合 格  上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成30年8月2日の第75回研究科発表会（医学）および平成30年8月9日の本委員会において最終試験をおこない、主として次の諮問をおこなった。  1 敗血症患者における“immunopalarysis”の臨床的な同定の可否（バイオマーカーなど） 2 本研究で得られた知見を基にした、敗血症あるいは敗血症による immunopalarysis の患者の予後を改善する具体的な方策 3 本研究で対象とした因子のうち、敗血症の予後因子となりうるもの 4 敗血症に対する透析治療において、免疫抑制効果を除去することの効果  これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容および関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。			