

Compromised hostsにおける敗血症性ショック

— 貪食細胞機能強化に着目した新しい免疫賦活療法 —

木下 学, 中島正裕, 中島弘幸

防医大誌 (2022) 47 (1) : 49-59

要旨: Compromised hosts の敗血症性ショックは予後不良だが, 生体の貪食殺菌能の減弱と過剰な炎症性サイトカインによる多臓器傷害がその一因と考えられる。かつて, TNF 中和抗体などの抗サイトカイン療法が敗血症性ショックに試みられたが, 予後は改善できなかった。一般に貪食殺菌応答と炎症反応は連動するため, 炎症反応の抑制で貪食殺菌能がさらに減弱し菌の排除が出来なくなった可能性があった。これに対し, マクロファージの貪食殺菌能を増強させようとインターロイキン 18 による免疫賦活療法を試みたが, 時に生体に過剰な炎症反応を惹起し多臓器障害に陥る危険性があった。そこで, 貪食殺菌能を増強させ, 炎症反応は逆に抑えるような施策を考えた。炎症マーカーでもある CRP の活性部位を合成した合成 CRP は, マクロファージの貪食能を増強したが, 貪食時に TNF などの炎症性サイトカインも産生され, 合成 CRP を用いた致死的大腸菌感染の救命率は 50% に留まった。一方, 極微量の LPS の反復接種による LPS プレコンディショニングは貪食殺菌能の顕著な増強と共に TNF など炎症性サイトカインの産生が強く抑制され, 致死的大腸菌感染を 100% 救命できた。LPS プレコンディショニングには癌転移抑制効果や抗マalaria 感染効果, 抑うつ改善効果なども実験的に認められている。今後は臨床で使えるような安全な LPS プレコンディショニングの導入を目指す。

索引用語: Compromised hosts / 敗血症性ショック / 抗サイトカイン療法 / 免疫賦活療法 / 貪食細胞機能 / インターロイキン 18 / 合成 CRP / LPS プレコンディショニング

緒 言

かつて, 1980年代後半にサイトカインが集中治療の臨床現場に華々しく登場したが¹⁾, これらサイトカインの代表的存在である Tumor necrosis factor (TNF) は, 当初, その名称通りの癌組織への傷害因子と考えられていた。TNF には同じ受容体を持つ TNF- α と β があるが, TNF- β がリンフォトキシン α と同一であることが明らかになったため²⁾, 本稿では TNF- α を TNF として, リンフォトキシン α である TNF- β と区別する。その後, 研究が進むにつれ, TNF は生命活動に必須の重要な情報伝達因子であることが次第に明らかになって来た³⁾。

例えば, マクロファージのような貪食細胞は, 細菌などを貪食する際に TNF のような炎症性サイトカインを産生し, これがオートクリン作用によって自らをさらに活性化して貪食処理をより効率化する⁴⁾。このように細菌貪食能と炎症性サイトカイン産生能は連動しているため, immunomodulation を治療として考えた場合, 全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome; SIRS) を念頭にした炎症反応の抑制は貪食能を減弱し, 逆に compromised host を念頭にした貪食能の賦活化は炎症反応を増強するといったジレンマに陥ってしまう。実際の病態はさらに複雑で, 治療に難渋する

sepsis（敗血症）のような重症感染症例では、炎症性サイトカインが過剰に血中に放出されてサイトカインストームのような状態に陥っている一方で、貪食細胞の細菌貪食能はこれとは相関せず逆に減弱していることが多い（図1）。私たちはimmunomodulation therapyとして、敗血症時の炎症性サイトカインの制御や⁵⁾、compromised hostsでの貪食能の亢進など^{6,7)}、個々の病態に適した治療施策を研究してきたが、実際の臨床に通用するimmunomodulation therapyとは、感染起炎菌の排除に必須な貪食能を増強しながら過剰な炎症反応を抑制するといった一見、生体防御システムの原則に相反するような免疫応答の制御が求められるのではないかと考える。

1. 敗血症性ショックとサイトカインストーム：抗サイトカイン療法の挫折

サイトカインに関する知見が徐々に蓄積されてきた1990年代初頭にかけて、敗血症性ショックに代表されるサイトカインストームの状態では、TNFのような炎症性サイトカインの過剰産生が臓器傷害をもたらすことが明らかになってきた^{8,9)}。これを背景に、炎症性サイトカインを抑制することで敗血症性ショックの予後が改善するのではないかという考えが登場し¹⁰⁾、当時の最先端技術であったモノクローナル抗体作製技術を使ってTNFの中和抗体を作製して、敗血症性ショック症例を対象とした大規模な臨床治験が行われた¹¹⁾。しかし、残念なことにTNFを阻害しても敗血症性ショックの予後は改善しない結果に終わった¹¹⁾。TNFは

本来、感染をはじめとする生体防御に必須のサイトカインであり¹²⁾、たとえ重篤な感染病態であってもこの重要なサイトカインを阻害することは、一時的にはショック病態を離脱できたとしても、最終的な感染起炎菌の排除には繋がらなかったであろう。敗血症性ショックの患者では、生体の免疫応答は基本的には正常で、重度侵襲によりこれが一時的な麻痺状態に陥っているだけではないだろうか。

奇しくも、後にこのTNF中和抗体は、関節リウマチやクローン病、ベーチェット病など免疫応答の異常が原因と考えられる疾患、すなわち自己免疫疾患において、画期的な治療薬として注目されるようになったが^{13,14)}、それらは敗血症のショック病態とはおよそかけ離れたものであった¹⁵⁾。もっとも、TNF中和抗体が使われた最初のきっかけは、敗血症性ショックに陥った若いクローン病患者に対して、わずかな望みをこの治験薬（TNF中和抗体）に託して投与したところ、劇的に効いたことが端緒であった¹⁶⁾。

2. 敗血症時の急性肺障害と活性化好中球の制御：好中球エラスターゼ阻害剤の開発

過剰な炎症性サイトカインは肺や腎臓を標的臓器とすることが多く、とくに肺障害は急性呼吸不全（acute respiratory distress syndrome; ARDS）の状態に陥ると予後が著しく不良となるため、炎症性サイトカインを制御する試みが治療施策として当初、検討された^{17,18)}。しかし、ARDSでは炎症性サイトカインが直接、肺組織を傷害するというよりはむしろ、炎症性サイト

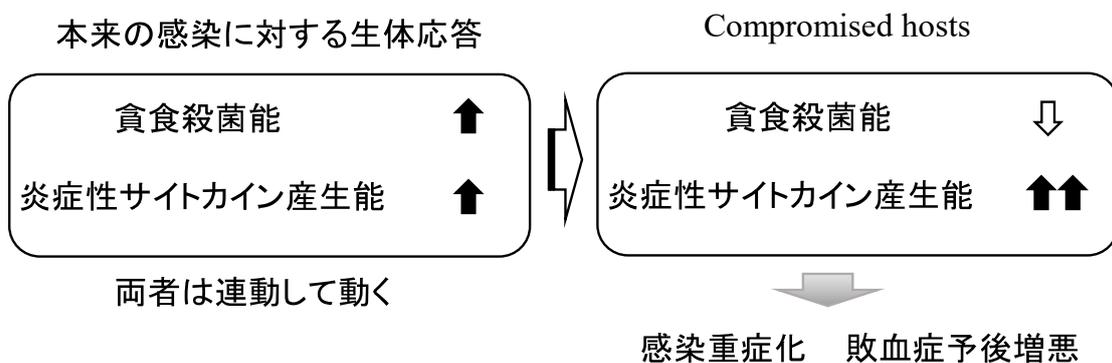


図1. マクロファージの貪食殺菌能と炎症性サイトカイン産生

カインによって過剰に活性化した好中球が肺に集積し、これが産生する好中球エラスターゼなどで肺組織が傷害されることが病態発症の原因であることが分かってきた^{19,21)}。当時、抗サイトカイン療法が無効であることを臨床治験で身に染みて感じていた著者らは、肺傷害に対する、より直接的なメディエーターとして好中球エラスターゼに注目し、その阻害薬の開発へと進んでいった^{5,22)}。活性化好中球が産生する直接的な組織傷害メディエーターの制御は、急性肺障害の予防には顕著な効果があったと認識しているが^{23,24)}、すでにARDSを合併した敗血症患者の予後には劇的な改善効果は認められなかったとの報告もある²⁵⁾。やはり、メディエーターの制御のみで重症感染症の予後を効果的に改善することは難しく、重度侵襲生体が陥っている減弱した貪食殺菌能の賦活化が治療の鍵を握るとの考えに至った。

昨今の新型コロナ肺炎の重症型でもサイトカインストームの病態を呈することが注目されている²⁶⁾。このような病態では、過剰な炎症性サイトカインにより活性化した好中球が肺で臓器傷害をもたらすことが懸念され、これを阻害するために好中球エラスターゼ阻害薬も一部で注目されているが²⁷⁻²⁹⁾、このような治療は病態を一時的に改善するに過ぎないと考えられ、根本的なSARS-CoV-2に対する抗ウイルス剤の開発が急がれる。

3. 重度侵襲後の貪食殺菌能の減弱とその賦活化策：インターロイキン18の頻回投与

Compromised hostsとは感染抵抗性が減弱した生体を指すが、その最も根本的な原因は貪食細胞の貪食殺菌能の減弱にあると考える⁶⁾。重症熱傷や外科手術といった重度の侵襲を被ってcompromised hostsの状態にある生体では、IFN- γ が司る細胞性免疫能が減弱し^{7,30)}、貪食殺菌能が著しく低下することで感染予後が不良となることを私たちは報告してきた^{7,31)}。さらに、このような重度侵襲では細胞性免疫のみならず、液性免疫³²⁾や好中球免疫³¹⁾なども同時に減弱するといった、いわば複合免疫不全の状態に陥ることも分かってきた⁶⁾(図2)。サイトカインをベースとした免疫学の研究が進むにつ

れ、細胞性免疫はTh1応答に、液性免疫はTh2応答に誘導されるが、このTh1、Th2両応答は互いに拮抗関係にあることが明らかになってきた³³⁾(図3)。そのため、侵襲後に減弱した細胞性免疫を賦活化しようとTh1サイトカインで刺激すると、Th2応答が抑制されてしまい、液性免疫、すなわち抗体産生がさらに減弱される危険性が出てくる³⁴⁾。逆もまた然りで、Th2サイトカインによる液性免疫の賦活化はTh1応答による細胞性免疫への影響が懸念された。そこで、私たちはTh1、Th2両応答を同時に活性化できるような新しいサイトカインがないか検討を始めた。インターロイキン18(IL-18)は1995年に本邦で発見されたサイトカインで、細菌感染時にはTh1応答を活性化するが、アトピーやアレルギー疾患など非感染時にはTh2応答を活性化するというユニークな特徴を有していた^{35,36)}。私たちはこのIL-18に着目した。マウスにIL-18を単回投与し、その後大腸菌を感染させるとTh1サイトカインのようにTh1反応が増強しTh2反応と抗体産生は抑制されたが、興味深いことにIL-18を頻回投与すると(ここでは3回投与)、感染時でもTh1反応のみならずTh2反応やこれに続く抗体産生も同時に増強できることを見出した³⁷⁾(図3)。さらにIL-18の頻回投与で、好中球機能が活性化できることも分かってきた³¹⁾。そこで、熱傷後の免疫能が減弱したマウスにIL-18を頻回投与したところ、熱傷後の細胞性免疫不全や液性免疫不全、好中球免疫不全の病態をいずれも改善し、熱傷後の大腸菌感染や緑膿菌感染、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)感染の予後を改善させることができた^{6,7,31,32)}(図2)。

4. 細胞性免疫の過剰活性化による多臓器傷害の危険性：免疫賦活療法のピットホール

IL-18の頻回投与による強力な細胞性免疫の賦活化は貪食能を亢進させると共に、IFN- γ に関連する一連の炎症性サイトカインの産生を誘導した^{6,7,32)}。重症熱傷のような重度侵襲では、このIFN- γ 産生が著しく減少していたため、IL-18の頻回投与が感染時に適切なIFN- γ 産生を促すことで細胞性免疫不全が改善し、減弱していた貪食細胞機能が回復して感染予

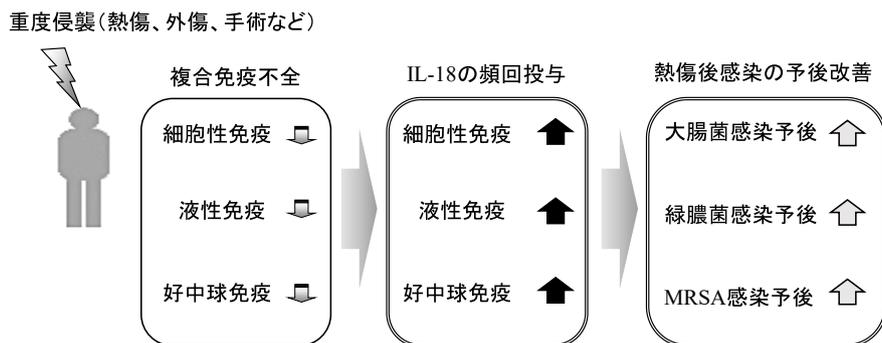


図2. 重度侵襲後の複合免疫不全病態とIL-18療法による賦活化

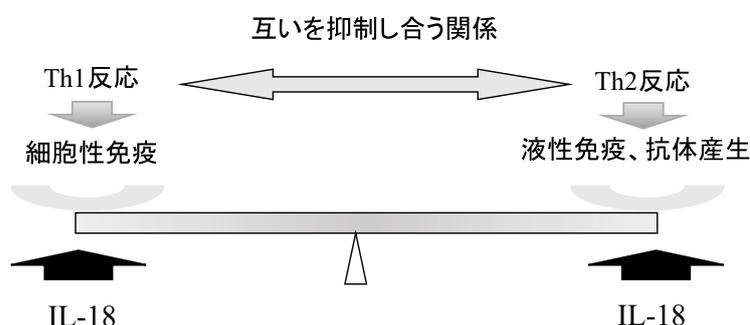


図3. IL-18による感染時のTh1,Th2反応の賦活化

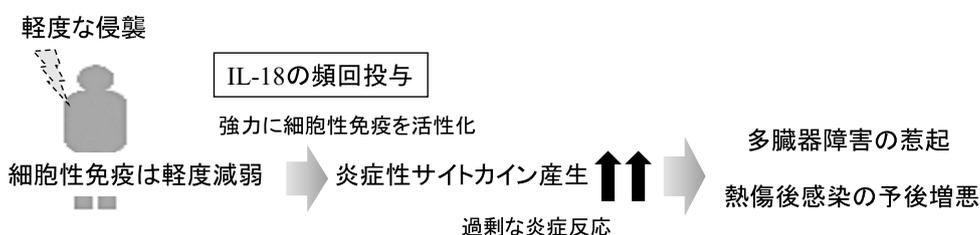


図4. IL-18投与による過剰な炎症反応と多臓器障害の惹起, 感染予後増悪

後は向上した⁷⁾。しかし、このIFN- γ 産生不全は侵襲の程度とよく相関する。軽度な侵襲ではIFN- γ 産生不全も軽度であるが、これに対して強力なIL-18療法を行うと必要以上にIFN- γ などの炎症性サイトカインが感染時に産生されてしまう。すなわち、生体にとって過剰な炎症反応が誘導されることになり、この結果、サイトカインストームのような状態から多臓器不全が惹起され、感染予後は逆に増悪してしまった^{6,7)}(図4)。このように免疫応答を単純に活性化するような免疫賦活化療法では、複雑な病態を呈する重症感染症に対する治療候補にはならないと考えられた。

ニボルマブ(商品名: オプシーボ)に代表されるような免疫チェックポイント阻害薬(PD-1/PD-L1阻害剤)は、免疫系のブレーキングシステムを阻害する薬で抑制された免疫応答を活性化する^{38,39)}。一部の癌患者では、このPD-1/PD-L1経路のブレーキングシステムが過剰に働いて抗腫瘍活性が減弱しており、そのような場合にはPD-1/PD-L1阻害剤が劇的な抗腫瘍効果を発揮することは今や周知の事実である^{38,39)}。しかしながら、免疫システムがある程度維持されている患者へのPD-1/PD-L1阻害剤の使用は、感染併発の際に上記のような過剰な炎症反応が惹起される危険性があることを十分に注意

すべきと考える。

5. ケタミンによるマクロファージの TNF 産生抑制がもたらす貪食能の減弱

前述したようにマクロファージのような貪食細胞では通常、TNF産生と貪食能が相関する。臨床で汎用される麻酔薬のケタミンには、マクロファージからのTNF産生を抑制する作用があることが知られているが^{40,41}、ケタミンで麻酔したマウスでは、TNFの産生抑制と共に、肝臓のマクロファージ、すなわちクッパー細胞の貪食能が減弱していた⁴² (図5)。TNF阻害剤を用いた場合でも同様に貪食能は減弱した⁴²。ケタミン投与マウスは、グラム陰性菌の毒素成分であるLPS (lipopolysaccharide) の投与で作製したLPSショックには耐性があり予後が改善したが、殺菌貪食が必要となるグラム陰性菌自体による敗血症性ショックの予後は改善できなかった⁴² (図5)。このようなLPS血症と菌血症によるショック病態での予後の相違はTNF阻害剤を用いた場合でも同様に再現できたが、これはTNFの阻害によりクッパー細胞の貪食殺菌能が減弱したことが原因であった⁴²。このような現象は、かつての敗血症性

ショックに対するTNF中和抗体の臨床治験を想起させる。そこで、私たちはIL-18投与のようにIFN- γ 産生、すなわち炎症反応を増強することで貪食殺菌能を増強するのではなく、直接的に貪食細胞に作用して貪食能を増強させる施策がないか検討した。

6. 合成CRP療法によるマクロファージの貪食能亢進効果

マクロファージの貪食にはオプソニン作用に深く関与するFc γ 受容体(とくにFc γ receptor I)の果たす役割が大きい⁴³。そこで、Fc γ 受容体に結合する蛋白であるC反応性蛋白(C-reactive protein; CRP)に着目した⁴⁴。CRPは1930年にTillettらにより発見された蛋白で、CRPのCは肺炎球菌の細胞壁にあるC多糖類に由来している⁴⁵。CRPは炎症に反応する急性期蛋白として主に肝細胞で産生され、臨床では炎症マーカーとして今日に至るまで汎用されている^{46,47}。CRPは分子量が約115kDの5個のサブユニットが輪状に結合した5量体として体内で存在しているが^{46,47} (図6)、私たちはCRPの活性部位である10個のアミノ酸からなるペプチドを合成して作製した合成CRPを実験に用

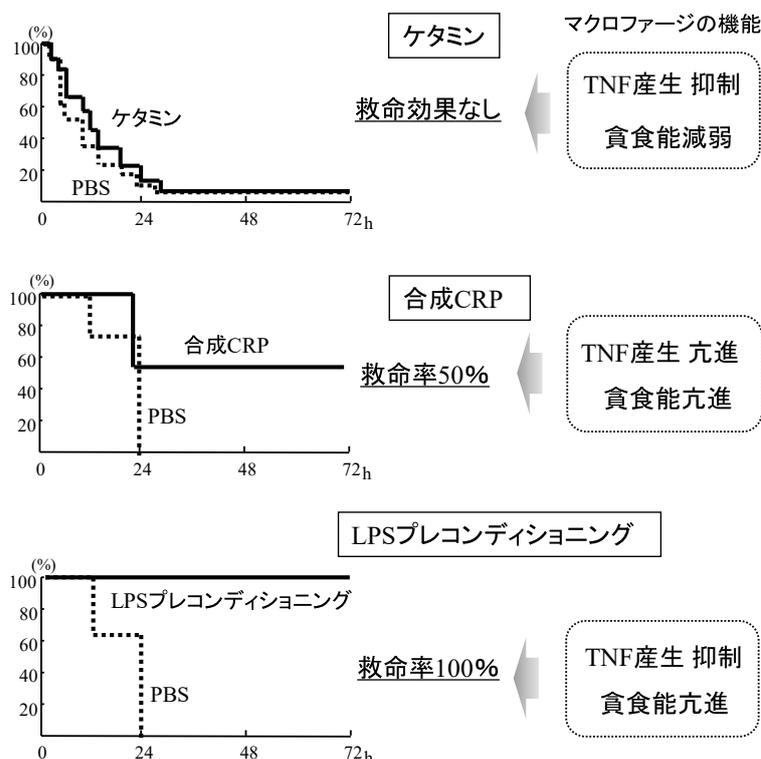


図5. TNF産生の抑制と貪食能亢進が感染予後に与える影響

いた(図6)。この合成CRPは本来のCRPとほぼ同様の生理活性があるとされる⁴⁸⁾。合成CRPでクッパー細胞を刺激したところ、貪食能の明らかな増強を認めたが、異物を貪食した細胞では自身も活性化するためかTNF産生も亢進していた^{49,50)}(図5)。致死量の大腸菌投与による菌血症マウスに対して、合成CRPを投与したところ50%の救命効果が得られたが⁴⁹⁾(図5)、この時の大腸菌接種後の血中TNF値の推移は、有意ではないものの合成CRP投与で上昇する傾向にあった。興味深いことに、マクロファージが細菌を貪食する必要のないLPS血症では、合成CRPの投与で血中TNF値上昇の抑制と予後の改善が認められ、CRPが抗炎症効果も併せ持つことが分かった^{49,50)}。シュワルツマン反応はLPSショックの典型的な実験モデルであるが⁵¹⁾、合成CRPの投与で、劇的なTNF産生の抑制と生存率の改善が認められている⁴⁹⁾。ヒトの末梢血単核球を合成CRPで刺激しても、TNFの産生抑制をはじめとする抗炎症効果が確認されている⁵²⁾。しかしながら、合成CRPによるマクロファージの貪食能の活性化はTNF産生亢進を伴うもので、これが致死感染からの生存率を50%に留めていると考えられた。そこで今度は、100%の生存率を目指すべく、貪食能を維持しながらTNF産生を顕著に抑制する施策について考えた。

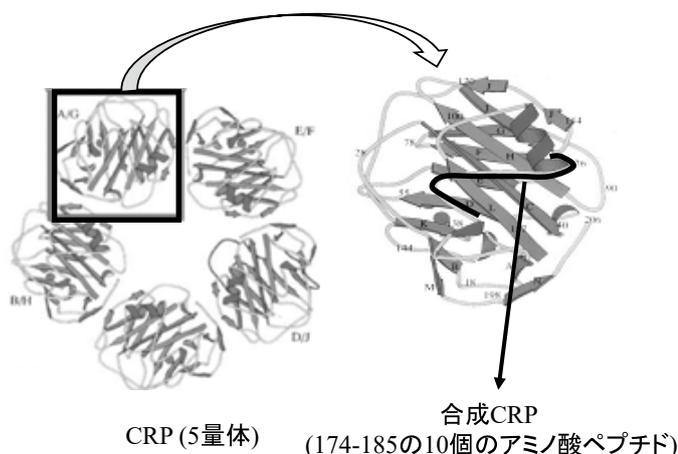


図6. CRPと合成CRP

7. 肝での組織固着型マクロファージと骨髄由来マクロファージ：貪食能とTNF産生能の特徴的な相違

マクロファージには貪食能とTNFなどサイトカインの産生能という2つの大きな機能があるが、実際には両者が連動しあって外来異物を効率よく処理している⁵³⁾。異物処理の中心臓器である肝臓にはクッパー細胞が大量に存在し(生体の全マクロファージの80-90%)、門脈から流入する細菌をはじめとする異物を処理すると共に、敗血症の際には過剰に活性化したクッパー細胞から大量のTNFが産生されると考えられていた⁵⁴⁾。そのクッパー細胞を除去する薬剤として、かつて希土類金属の1つである塩化ガドリニウム($GdCl_3$)が盛んに使われていた⁵⁵⁻⁵⁷⁾。しかしながら、 $GdCl_3$ でクッパー細胞を除去したはずのマウスにLPSを投与しても、クッパー細胞が出すLPS投与1時間後の血中TNFのピーク値は逆に上昇し、さらに $GdCl_3$ 処理したマウスの肝臓からはマクロファージ、すなわちクッパー細胞で採取でき、しかもこれら細胞では活性酸素の産生能は減少するもののTNF産生能は逆に増加する現象が認められた⁵⁸⁾。これがきっかけでさらに研究を進めると、肝臓には旺盛な貪食能を有して活性酸素を産生する肝固有のマクロファージと、骨髄からやって来て肝臓に留まった高いTNF産生能を有するマクロファージの2種類が存在することが分かってきた⁵⁹⁾(図7)。投与された $GdCl_3$ は肝臓で貪食能が旺盛な肝固有のマクロファージ、すなわちクッパー細胞に取り込まれ、これをアポトーシスさせるが、貪食能が比較的弱い骨髄由来の肝マクロファージは $GdCl_3$ を取り込んでアポトーシスするのではなく、逆に活性化して盛んにTNFなどの炎症性サイトカインを産生していたのであった⁵⁹⁾。合成CRPが結合する $Fc\gamma$ 受容体は貪食能が旺盛な肝固有マクロファージに強発現しており、合成CRPはこの細胞集団を刺激し貪食能を亢進させると共に貪食時にTNFを産生させていた⁵⁰⁾。しかし、一方で、合成CRPは $Fc\gamma$ 受容体があまり発現していない骨髄由来のマクロファージにも作用してLPSによるTNF産生能を抑制していることが分かった⁵⁰⁾。

8. LPS プレコンディショニングによる貪食能亢進と炎症性サイトカイン抑制

LPSトレランスという現象は古くから知られているが、これは少量のLPSであらかじめ生体や細胞を刺激しておく、次に大量のLPSで刺激しても生体や細胞はこれに反応しなくなるというもので、その最大の特徴はマクロファージにおけるTNFの顕著な産生抑制にあると考えられていた^{60,61}。私たちは以前より、LPSトレランスの強力な抗炎症作用に着目していたが、おそらくはマクロファージの貪食殺菌能の減弱を伴うため、敗血症の治療には適さないものと考えていた。しかしながら、前述のように、マクロファージに組織固着型と骨髄由来型の2つがあり、これらの貪食能とサイトカイン産生能に違いが認められたことから⁵⁹、LPSトレランスによるTNF産生能と貪食殺菌能に注目し検討してみた⁶²。LPSトレランスはマウスの生体がほとんど反応しない極微量のLPS (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を3日間連続投与して導入し、その後に致死量のLPSもしくは大腸菌を投与した。致死的なLPS血症ではLPSトレランスの導入で、予想通り血中TNF値の劇的な上昇抑制と100%の生存率を認めたが、マクロファージの貪食殺菌が必須の致死的大腸菌血症でもTNFの上昇抑制と共に100%の生存率を認めた⁶² (図7)。確

認のため、大腸菌投与24時間後の肝での生菌数を調べたが、LPSトレランスで肝での菌クリアランスが劇的に増強していた (図8)。そこで、肝臓からマクロファージを含む単核球を採取して機能を調べたところ、興味深いことに、LPSトレランスによりTNF産生能の抑制だけでなく貪食殺菌能の著明な増強が認められた。細胞内のATPレベルも著増して活性状態にあると考えられたことから、これはLPSトレランス(寛容)ではなく、むしろLPSによるプレコンディショニングと称すべき状態で、trained innate immunityの一つと考えられた。興味深いことに、肝臓では組織固着型のマクロファージがほぼ消失し、代わりに骨髄由来型のマクロファージが増加していて、これらは顕著な貪食殺菌能を獲得する一方で、TNF産生は著しく抑制されていた⁶² (図7)。現在は、臨床応用にも耐えられる安全なLPSプレコンディショニングの導入を目指して研究を重ねている。

9. LPS プレコンディショニングの癌転移抑制効果や抗マラリア感染効果、抑うつ改善効果

LPSプレコンディショニングは重症感染症の回避に極めて魅力的であるだけでなく、マウスの大腸癌の肝転移モデルにおいて、Natural Killer T (NKT) 細胞やNK細胞の抗腫瘍活性を

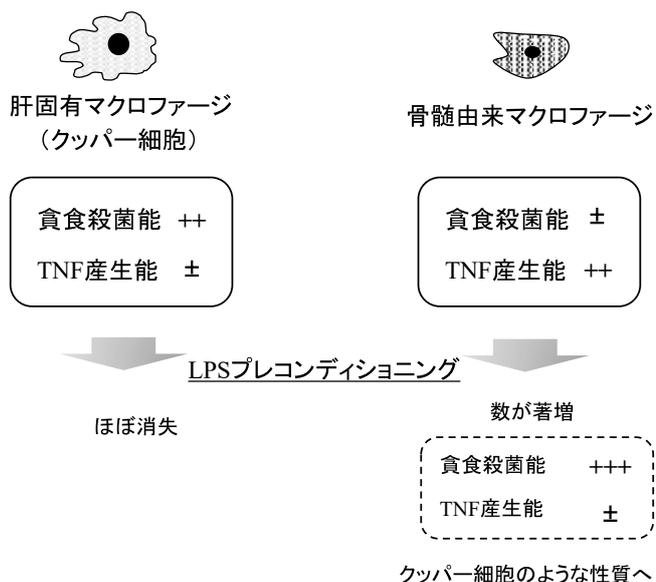
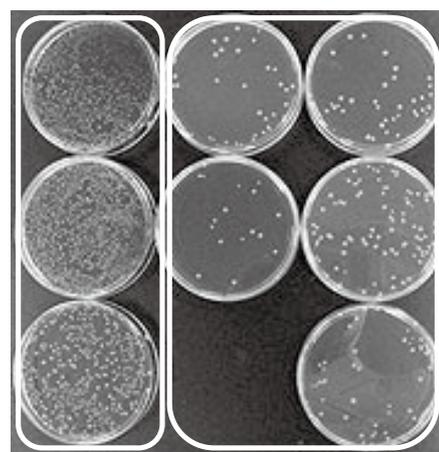


図7. 肝固有マクロファージと骨髄由来マクロファージ、LPSプレコンディショニングがこれらに与える影響



対照群 LPSプレコンディショニング

LPSプレコンディショニングにより大腸菌投与後の肝での生菌数が著減した。

図8. LPSプレコンディショニングによる菌クリアランスの増強

増強することで、肝転移を抑制し予後の延長効果が認められた⁶³⁾。NKT細胞やNK細胞では抗腫瘍活性を担うパーフォリンやグランザイムBの産生はLPSプレコンディショニングで増強されたが、炎症性サイトカインであるIFN- γ の産生は抑制されており、同じ細胞性免疫でも抗腫瘍活性の応答と炎症応答でLPSプレコンディショニング時の反応の相違が示唆された⁶³⁾。このようなLPSプレコンディショニング時の反応の相違は、マクロファージにおける貪食殺菌能の応答と炎症応答の相違と類似していると考えられる。

また、LPSプレコンディショニングにおける肝でのマクロファージの貪食能増強は、細菌のみならず、マラリアが寄生した赤血球に対しても認められ、マウスのマラリア感染でも予後の改善効果が認められた⁶⁴⁾。さらに、LPSプレコンディショニングは神経系の高次機能に対しても抑うつ改善効果が認められた。LPSプレコンディショニングを施したマウスでは、LPS血症時の脳内の炎症に関連する遺伝子の発現が抑えられ、うつ様行動に対する改善効果が認められた⁶⁵⁾。

おわりに

重症感染症では、貪食殺菌能を増強しながら、炎症反応を抑制するような治療が望ましい。とくに、治療に難渋する compromised hosts の重症感染病態では、貪食殺菌能の減弱と過剰な炎症反応が認められるため、このような貪食能亢進と炎症抑制といった治療施策が著効すると考えられる。しかし、これらは生体防御システムの原則からみると一見、相反する現象のように思われる。私たちは、炎症反応の抑制や貪食殺菌能の増強に関するいろいろな免疫賦活療法を研究してきたが、ほとんどの場合で貪食殺菌能の増強と炎症反応の抑制を同時に誘導することは困難なように思われた。しかし、LPSプレコンディショニングはマクロファージの貪食殺菌能を増強すると共に炎症性サイトカインの産生を抑制する効果があり、compromised hosts を含めた重症感染症に対する極めて魅力的な治療施策になるのではないかと期待される。

文 献

- 1) Brown JM, Grosso MA, Harken AH.: Cytokines, sepsis and the surgeon. *Surgery, gynecology & obstetrics*. 169: 568-575, 1989.
- 2) Ruddle NH: Tumor necrosis factor (TNF-alpha) and lymphotoxin (TNF-beta). *Current opinion in immunology*. 4: 327-332, 1992.
- 3) Vassalli P: The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annual review of immunology*. 10: 411-452, 1992.
- 4) Corradin SB, Buchmüller-Rouiller Y, Mauël J.: Phagocytosis enhances murine macrophage activation by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *European journal of immunology*. 21: 2553-2558, 1991.
- 5) Kinoshita M, Ono S, Mochizuki H.: Neutrophils mediate acute lung injury in rabbits: role of neutrophil elastase. *European surgical research Europäische chirurgische Forschung*. 32: 337-346, 2000.
- 6) Kinoshita M, Miyazaki H, Ono S, et al.: Immunoenhancing therapy with interleukin-18 against bacterial infection in immunocompromised hosts after severe surgical stress. *J Leukoc Biol*. 93: 689-698, 2013.
- 7) Kinoshita M, Seki S, Ono S, et al.: Paradoxical effect of IL-18 therapy on the severe and mild Escherichia coli infections in burn-injured mice. *Annals of surgery*. 240: 313-320, 2004.
- 8) Selby P, Hobbs S, Viner C, et al.: Tumour necrosis factor in man: clinical and biological observations. *British journal of cancer*. 56: 803-808, 1987.
- 9) Cannon JG, Tompkins RG, Gelfand JA, et al.: Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. *The Journal of infectious diseases*. 161: 79-84, 1990.
- 10) Dinarello CA: Proinflammatory cytokines. *Chest*. 118: 503-508, 2000.
- 11) Abraham E, Wunderink R, Silverman H, et al.: Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome. A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. TNF-alpha MAb Sepsis Study Group. *JAMA*. 273: 934-941, 1995.
- 12) Havell EA: Evidence that tumor necrosis factor has an important role in antibacterial resistance. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 143: 2894-2899, 1989.
- 13) Takeda T: [Treatment strategy of elderly rheumatoid arthritis]. *Nihon Rinsho Men'eki Gakkai kaishi = Japanese journal of clinical immunology*. 39: 497-504, 2016.
- 14) Maini SR: Infliximab treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 30: 329-347, vii. 2004.
- 15) Monaco C, Nanchahal J, Taylor P, et al.: Anti-TNF therapy: past, present and future. *International immunology*. 27: 55-62, 2015.
- 16) Derkx B, Taminau J, Radema S, et al.: Tumour-necrosis-factor antibody treatment in Crohn's disease. *Lancet (London, England)*. 342: 173-174, 1993.
- 17) St John RC, Dorinsky PM.: Immunologic therapy for ARDS, septic shock, and multiple-organ failure. *Chest*. 103: 932-943, 1993.

- 18) Welbourn CR, Young Y.: Endotoxin, septic shock and acute lung injury: neutrophils, macrophages and inflammatory mediators. *The British journal of surgery*. **79**: 998-1003, 1992.
- 19) Kinoshita M, Ono S, Mochizuki H.: Neutrophil-related inflammatory mediators in septic acute respiratory distress syndrome. *J Intens Care Med*. **17**: 308-316, 2002.
- 20) Kawabata K, Hagio T, Matsuoka S.: The role of neutrophil elastase in acute lung injury. *European journal of pharmacology*. **451**: 1-10, 2002.
- 21) Polverino E, Rosales-Mayor E, Dale GE, et al.: The Role of Neutrophil Elastase Inhibitors in Lung Diseases. *Chest*. **152**: 249-262, 2017.
- 22) Tamakuma S, Ogawa M, Aikawa N, et al.: Relationship between neutrophil elastase and acute lung injury in humans. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. **17**: 271-279, 2004.
- 23) Ono S, Tsujimoto H, Hiraki S, et al.: Effects of neutrophil elastase inhibitor on progression of acute lung injury following esophagectomy. *World journal of surgery*. **31**: 1996-2001, 2007.
- 24) Aikawa N, Kawasaki Y.: Clinical utility of the neutrophil elastase inhibitor sivelestat for the treatment of acute respiratory distress syndrome. *Therapeutics and clinical risk management*. **10**: 621-629, 2014.
- 25) Zeiher BG, Artigas A, Vincent JL, et al.: Neutrophil elastase inhibition in acute lung injury: results of the STRIVE study. *Critical care medicine*. **32**: 1695-1702, 2004.
- 26) Fajgenbaum DC, June CH.: Cytokine Storm. *The New England journal of medicine*. **383**: 2255-2273, 2020.
- 27) Laforge M, Elbim C, Frère C, et al.: Tissue damage from neutrophil-induced oxidative stress in COVID-19. *Nature reviews Immunology*. **20**: 515-516, 2020.
- 28) Sahebnaasagh A, Saghafi F, Safdari M, et al.: Neutrophil elastase inhibitor (sivelestat) may be a promising therapeutic option for management of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome or disseminated intravascular coagulation in COVID-19. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*. **45**: 1515-1519, 2020.
- 29) Mohamed MMA, El-Shimy IA, Hadi MA.: Neutrophil Elastase Inhibitors: A potential prophylactic treatment option for SARS-CoV-2-induced respiratory complications? *Critical care (London, England)*. **24**: 311, 2020.
- 30) Hiraki S, Ono S, Kinoshita M, et al.: Interleukin-18 restores immune suppression in patients with nonseptic surgery, but not with sepsis. *American journal of surgery*. **193**: 676-680, 2007.
- 31) Kinoshita M, Miyazaki H, Ono S, et al.: Enhancement of neutrophil function by interleukin-18 therapy protects burn-injured mice from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. **79**: 2670-2680, 2011.
- 32) Kinoshita M, Shinomiya N, Ono S, et al.: Restoration of natural IgM production from liver B cells by exogenous IL-18 improves the survival of burn-injured mice infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. **177**: 4627-4635, 2006.
- 33) Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, et al.: Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. **136**: 2348-2357, 1986.
- 34) Göebel A, Kavanagh E, Lyons A, et al.: Injury induces deficient interleukin-12 production, but interleukin-12 therapy after injury restores resistance to infection. *Annals of surgery*. **231**: 253-261, 2000.
- 35) Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, et al.: Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annual review of immunology*. **19**: 423-474, 2001.
- 36) Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, et al.: Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature*. **378**: 88-91, 1995.
- 37) Kinoshita M, Kuranaga N, Matsumoto A, et al.: Multiple interleukin-18 injections promote both mouse Th1 and Th2 responses after sublethal *Escherichia coli* infection. *Clin Exp Immunol*. **143**: 41-49, 2006.
- 38) Hamanishi J, Konishi I.: [Targeting the PD-1/PD-L1 immune checkpoint signal - a new treatment strategy for cancer]. *Gan to kagaku ryoho Cancer & chemotherapy*. **41**: 1071-1076, 2014.
- 39) Mahoney KM, Freeman GJ, McDermott DF.: The Next Immune-Checkpoint Inhibitors: PD-1/PD-L1 Blockade in Melanoma. *Clinical therapeutics*. **37**: 764-782, 2015.
- 40) Taniguchi T, Takemoto Y, Kanakura H, et al.: The dose-related effects of ketamine on mortality and cytokine responses to endotoxin-induced shock in rats. *Anesthesia and analgesia*. **97**: 1769-1772, 2003.
- 41) Shaked G, Czeiger D, Dukhno O, et al.: Ketamine improves survival and suppresses IL-6 and TNFalpha production in a model of Gram-negative bacterial sepsis in rats. *Resuscitation*. **62**: 237-242, 2004.
- 42) Takahashi T, Kinoshita M, Shono S, et al.: The effect of ketamine anesthesia on the immune function of mice with postoperative septicemia. *Anesthesia and analgesia*. **111**: 1051-1058, 2010.
- 43) Aderem A, Underhill DM.: Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual review of immunology*. **17**: 593-623, 1999.
- 44) Tron K, Manolov DE, Röcker C, et al.: C-reactive protein specifically binds to Fc gamma receptor type I on a macrophage-like cell line. *European journal of immunology*. **38**: 1414-1422, 2008.
- 45) Tillett W, Francis T.: Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med*. **47**: 561-571, 1930.
- 46) Black S, Kushner I, Samols D.: C-reactive Protein. *The Journal of biological chemistry*. **279**: 48487-48490, 2004.
- 47) Du Clos TW.: Function of C-reactive protein. *Annals of medicine*. **32**: 274-278, 2000.
- 48) Thomassen MJ, Meeker DP, Deodhar SD, et al.: Activation of human monocytes and alveolar macrophages by a synthetic peptide of C-reactive protein. *Journal of immunotherapy with emphasis on tumor immunology : official journal of the Society for Biological Therapy*. **13**: 1-6, 1993.
- 49) Inatsu A, Kinoshita M, Nakashima H, et al.: Novel mechanism of C-reactive protein for enhancing

- mouse liver innate immunity. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **49**: 2044-2054, 2009.
- 50) Kinoshita M, Ito S, Ishikiriya T, et al.: The Efficacy of Posttreatment with Synthetic C-Reactive Protein in Murine Bacterial Peritonitis via Activation of Fc γ RI-Expressing Kupffer Cells. *Journal of innate immunity*. **13**: 306-318, 2021.
- 51) Kinoshita M, Nakashima M, Nakashima H, et al.: Immune Mechanisms Underlying Susceptibility to Endotoxin Shock in Aged Hosts: Implication in Age-Augmented Generalized Shwartzman Reaction. *International journal of molecular sciences*. **20**: 2019.
- 52) Sato A, Nakashima H, Kinoshita M, et al.: The effect of synthetic C-reactive protein on the in vitro immune response of human PBMCs stimulated with bacterial reagents. *Inflammation*. **36**: 781-792, 2013.
- 53) Wu MY, Lu JH.: Autophagy and Macrophage Functions: Inflammatory Response and Phagocytosis. *Cells*. **9**: 2019.
- 54) Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL.: Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. **26**: 1175-1186, 2006.
- 55) Rai RM, Yang SQ, McClain C, et al.: Kupffer cell depletion by gadolinium chloride enhances liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *The American journal of physiology*. **270**: G909-918, 1996.
- 56) Andrés D, Sánchez-Reus I, Bautista M, et al.: Depletion of Kupffer cell function by gadolinium chloride attenuates thioacetamide-induced hepatotoxicity. Expression of metallothionein and HSP70. *Biochemical pharmacology*. **66**: 917-926, 2003.
- 57) He Q, Kim J, Sharma RP.: Fumonisin B1 hepatotoxicity in mice is attenuated by depletion of Kupffer cells by gadolinium chloride. *Toxicology*. **207**: 137-147, 2005.
- 58) Kinoshita M, Uchida T, Nakashima H, et al.: Opposite effects of enhanced tumor necrosis factor- α production from Kupffer cells by gadolinium chloride on liver injury/mortality in endotoxemia of normal and partially hepatectomized mice. *Shock (Augusta, Ga)*. **23**: 65-72, 2005.
- 59) Kinoshita M, Uchida T, Sato A, et al.: Characterization of two F4/80-positive Kupffer cell subsets by their function and phenotype in mice. *Journal of hepatology*. **53**: 903-910, 2010.
- 60) Biswas SK, Lopez-Collazo E.: Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends in immunology*. **30**: 475-487, 2009.
- 61) Ho PC, Tsui YC, Feng X, et al.: NF- κ B-mediated degradation of the coactivator RIP140 regulates inflammatory responses and contributes to endotoxin tolerance. *Nature immunology*. **13**: 379-386, 2012.
- 62) Kinoshita M, Miyazaki H, Nakashima H, et al.: In vivo Lipopolysaccharide Tolerance Recruits CD11b+ Macrophages to the Liver with Enhanced Bactericidal Activity and Low Tumor Necrosis Factor-Releasing Capability, Resulting in Drastic Resistance to Lethal Septicemia. *Journal of innate immunity*. **9**: 493-510, 2017.
- 63) Nishikawa M, Kinoshita M, Morimoto Y, et al.: Lipopolysaccharide preconditioning reduces liver metastasis of Colon26 cells by enhancing antitumor activity of natural killer cells and natural killer T cells in murine liver. *Journal of gastroenterology and hepatology*. **36**: 1889-1898, 2021.
- 64) Ono T, Yamaguchi Y, Nakashima H, et al.: Lipopolysaccharide preconditioning augments phagocytosis of malaria-parasitized red blood cells by bone marrow-derived macrophages in the liver, thereby increasing the murine survival after Plasmodium yoelii infection. *Infect Immun*. 2021; *in press*.
- 65) Koga M, Toda H, Kinoshita M, et al.: Investigation of the impact of preconditioning with lipopolysaccharide on inflammation-induced gene expression in the brain and depression-like behavior in male mice. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. **103**: 109978, 2020.

Septic shock in compromised hosts

– Innovative trained innate immunotherapy focusing on functional activation of immunocompromised macrophages –

Manabu KINOSHITA, Masahiro NAKASHIMA and Hiroyuki NAKASHIMA

J. Natl. Def. Med. Coll. (2022) 47 (1) : 49–59

Abstract: Septic shock in immunocompromised patients shows high mortality, resulting from the impaired bactericidal activity of phagocytes and proinflammatory cytokine storm causing multiorgan dysfunctions. Inhibition of proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF), in septic shock has not been able to improve patient outcomes, as it cannot enhance/restore phagocyte functions. We therefore investigated the effect of immune-enhancing therapy using interleukin-18 for immunocompromised hosts in order to augment the bactericidal activity of macrophages. However, such immune-enhancing therapy sometimes caused an exaggerated inflammatory response to infection, followed by multiorgan dysfunctions under mild to moderate immunocompromised conditions. Therefore, we attempted to directly augment phagocytosis in macrophages. Synthetic C-reactive protein (CRP) was able to directly activate phagocytosis via the Fc γ receptor on macrophages. However, the phagocytosing macrophages produced potent proinflammatory cytokines, including TNF, so synthetic CRP did not drastically reduce these proinflammatory cytokine production in murine sepsis. We therefore focused on lipopolysaccharide (LPS) preconditioning, which induces substantial depletion of the proinflammatory cytokine response to LPS. LPS preconditioning strongly augmented the bactericidal activity of macrophages without enhancing the proinflammatory response, achieving a 100% survival rate in our model of lethal murine sepsis. It may therefore be an attractive therapeutic tool for managing sepsis in immune-compromised hosts.

Key words: compromised hosts / septic shock / neutralizing therapy of proinflammatory cytokines / immuno-modulation therapy / phagocytic function / interleukin-18 / synthetic CRP / LPS preconditioning