

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：32645

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15671

研究課題名(和文)敗血症におけるnucleophosminの動態と制御法の検討

研究課題名(英文)Dynamics of blood nucleophosmin in sepsis and correlation between NPM and prognostic factors

研究代表者

今泉 均 (IMAIZUMI, HITOSHI)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：70203304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：障害細胞から放出され臓器障害や予後を悪化させるDAMPsのうち、我々はNPMに着目し、血液中の動態と予後との関係を既存のDAMPsであるHMGB1とヒストンと比較検討した。ラット敗血症モデルでは血中HMGB1は4時間、ヒストンは8時間後から増加し12時間後をピークに漸減したが、血中にはNPMは増加しなかった。HMGB1とヒストンとの間に高い相関がみられた。敗血症性ショック患者の血中NPMは、非ショック患者に比べ有意に増加し、SOFA scoreとの相関は最も高かった。新定義Sepsis-3では臓器障害が重視されることから、NPMは敗血症の診断、治療における重要なパラメータとなりえる。

研究成果の概要(英文)：We focused on nucleophosmin (NPM) among DAMPs which are released from injured cells and exacerbate organ damage and prognosis and compared the relationship with existing DAMPs, HMGB 1 and histones with hemodynamics and prognosis. In the rat sepsis model, blood HMGB1 increased after 4 hours, histones increased after 8 hours and gradually peaked in 12 hours, but NPM did not increase in the blood. High correlation was observed between HMGB1 and histones. Blood NPM of patients with septic shock increased significantly compared to non-shocked patients and correlation with SOFA score was the highest among three DAMPs. NPM is an important parameter in the diagnosis and treatment of sepsis as organ dysfunction is emphasized in newly defined Sepsis-3.

研究分野：critical care, sepsis

キーワード：DAMPs nucleophosmin(NPM) HMGB 1 histones shock SOFA score

1. 研究開始当初の背景

(1) 全世界における敗血症の死亡頻度は心臓の鼓動の3心拍分である

世界の敗血症罹患患者数は年間約2700万人、そのうち約800万人が死亡する。3秒に1人が世界中のどこかで敗血症により死亡している計算になる。その数は心疾患や脳卒中による死亡者数を上回る。したがって、敗血症の効果的治療法の確立は急務である。

(2) 敗血症とDAMPs, PAMPs

敗血症の病態形成には病原微生物由来のPAMPs(病原体関連分子パターン: pathogen associated molecular patterns)や生体に存在するDAMPs(損傷関連分子パターン: damage associated molecular patterns)といった物質が重要な役割を担っていることが明らかとなってきた(1)。DAMPs は生体に対する危険信号(アラミン)として認識され、HMGB1(high mobility group box-1)やHistone蛋白、可溶性熱ショック蛋白(sHSP)、s100 蛋白質など核内に存在する蛋白質が知られている。DAMPs が過剰に産生放出されると、さらなる生体障害を引き起こし、敗血症や敗血症性ショックへと進展する敗血症の重症化と関連する(1)。

(3) DAMPとしてのヌクレオフォスミン (Nucleophosmin: NPM)

研究代表者らは、その中に核小体の細胞周期に必須な分子、NPMをLPS刺激細胞の培養上清とラット腹膜炎の腹水中に初めて検出した。さらにNPMはサイトカイン産生(TNF, IL-6など)を示し、NPMがアラミンの可能性を初めて示した(J Leukoc Biol 86;645,2009)(2)。

しかし、NPMの動態は未だ不明であり、また臨床における敗血症患者におけるNPMの炎症検査値、ショックの有無、重症度への影響に関する報告はない。

2. 研究の目的

敗血症の病態の進行に伴い、細胞の核から生命維持に必須なタンパク質が放出され、本

来の生命維持機能とは全く逆の、生体を死へと導く。よって、この核タンパク質の制御は、敗血症の病態亢進抑制に繋がる。最近、研究代表者等は、世界に先駆けてNPMをアラミンとしての可能性を証明してきた(2)。

したがって、本研究では、さらなる敗血症の病態解明を進めるために、動物実験でNPMの動態を実証するとともに、臨床検体において敗血症患者におけるDAMPsであるNPM濃度、HMGB-1蛋白濃度、Histone蛋白濃度と患者の炎症マーカー、ショックの有無、重症度との関係を検討する。最終的には、DAMPsを制御する敗血症の治療戦略を確立することにある。

3. 研究の方法

I. ラットの腹膜炎敗血症における血中DAMPs (NPM, HMGB-1蛋白, Histone蛋白)濃度の推移)ラットの腹膜炎敗血症モデルの作成

週齢8-10週のWister ratを用いて腹膜炎敗血症モデルを作成する。敗血症モデルは盲腸結紮穿孔(cecal ligation and puncture: CLP)により作成する。CLP作製時に頸静脈を露出してカテーテルを留置、頭頂部へ誘導し先端を閉塞させる。このカテーテルから採血と薬物の投与を行う。輸液は皮下に10ml/kgの細胞外液を投与する。CLP作製後、ラットはケージ内で自由な状態とし、水分のみ摂取できるようにする。

2) NPM濃度, HMGB-1蛋白濃度, Histone 3蛋白濃度の測定

CLP作製後に経時的に血液を1ml採取し、血清分離後凍結保存する。採血時期はCLP作成後、0, 4, 8, 12, 16, 20, 24時間とする。

測定項目はHMGB-1蛋白濃度とHistone 3蛋白濃度、NPM濃度は市販のELISAキットを用いて測定する(3)。いずれも検体数は3~4例とする。

II. 敗血症患者におけるNPM濃度と炎症マーカー、ショックの有無、重症度との関係

1) 敗血症、敗血症性ショック患者の検体

敗血症，敗血症性ショック患者21症例のICU入室時の凍結保存検体を用いた。

- 2) NPM濃度，HMGB-1蛋白濃度，Histone 3蛋白濃度の測定
測定項目はHMGB-1蛋白濃度とHistone 3蛋白濃度，NPM濃度を，市販のELISAキットを用いて測定した(3)。
- 3) 炎症マーカー，ショックの有無，重症度との相関
測定項目は炎症マーカー（CRP，PCT），ショックの有無，SOFAスコアとDAMPsとの相関を検討した。

4. 研究成果

1-1) ラットの腹膜炎敗血症モデルにおけるDAMPsの推移

図1，2，3にCLP作製後のそれぞれ血中HMGB-1蛋白濃度，Histone 3蛋白濃度，NPM濃度の経時的推移を示した。

血中HMGB-1蛋白濃度は4時間後に有意に増加し，血中Histone 3蛋白濃度は当初検出できなかったが8時間後から検出可能となり，共に12時間後にピークを迎えたが，測定値に大きなばらつきがあり，有意な増加ではなかった。一方，NPM濃度は有意な増加を認めなかった。

なお，本研究で作製したCLPラットは11例中7例が24時間以内に死亡したことから，36%の生存率となるモデルであることを確認した。

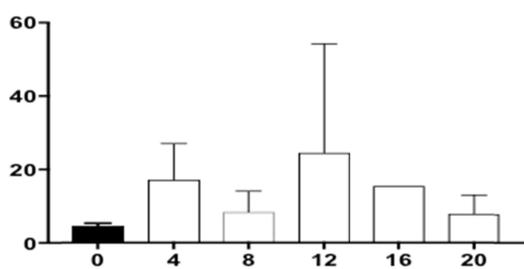


図1 CLP作製後のHMGB-1蛋白濃度の経時的推移：0hと4hの濃度に有意差あり
縦軸：HMGB-1蛋白濃度(ng/ml)
横軸：CLP作成後の時間(h)

Histone rat data

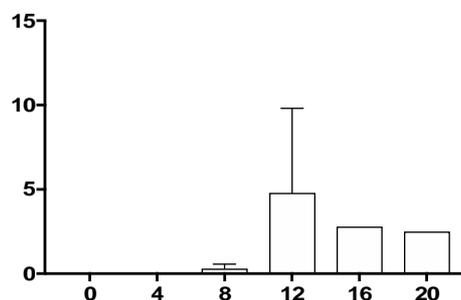


図2 CLP作製後のHistone 3蛋白濃度の推移：有意差なし
縦軸：Histone 3蛋白濃度(ng/ml)
横軸：CLP作成後の時間(h)

Nucleophosmin rat data

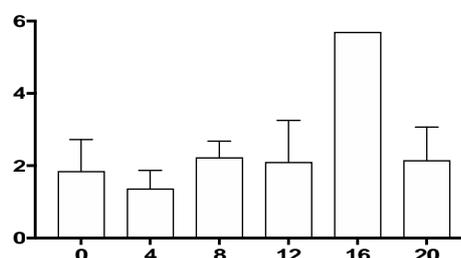


図3 CLP作製後のNPM濃度の推移：有意差なし
縦軸：NPM濃度(pg/ml)
横軸：CLP作成後の時間(h)

1-2) 血中HMGB-1蛋白濃度，Histone 3蛋白濃度，NPM濃度のうち，2濃度間の相関

HMGB1蛋白濃度とヒストン蛋白濃度は高い相関がみられ($R^2=0.8$)，NPM濃度とヒストン蛋白濃度との間にも弱い相関がみられた($r^2=0.4$)。しかし，NPM濃度とHMGB-1蛋白濃度との間には，相関関係を認めなかった。

これらのことからDAMPsとして作用するHMGB-1蛋白，Histone 3蛋白は，TNF-などの従来の炎症性サイトカインとは異なり，やや遅れて血中に出現することが明らかとなった。

前回のラットの腹膜炎敗血症モデル研究(2)の際にも，NPM濃度は腹水中には増加する

ものの、なぜラットの血中NPM濃度が有意な増加を示さないのかは不明である。

II. 敗血症患者におけるNPM濃度と炎症マーカー、ショックの有無、重症度との関係

敗血症、敗血症性ショック患者のICU入室時の凍結保存検体21検体を用いて、NPM濃度、HMGB-1蛋白濃度、Histone 3蛋白濃度と、炎症マーカー（CRP、PCT）、ショックの有無、重症度（SOFAスコア）との相関を検討した。

図5、6には炎症マーカーであるCRP、PCTとNPM濃度との相関を示した。

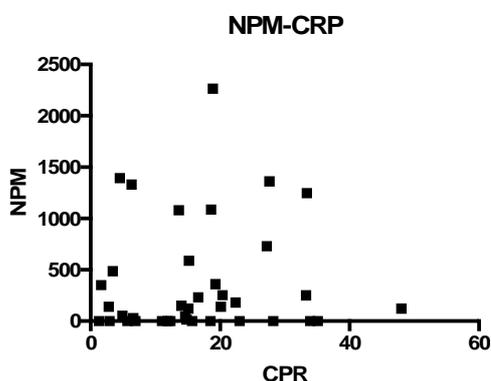


図5 CRP濃度とNPM濃度 (pg/ml) との関係

有意な相関はみられず

縦軸：NPM濃度 (pg/ml)

横軸：CRP濃度 (mg/dl)

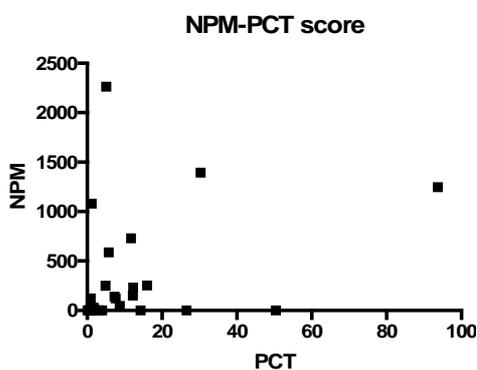


図6 PCT濃度とNPM濃度 (pg/ml) との関係

有意な相関はみられず

縦軸：NPM濃度 (pg/ml)

横軸：PCT濃度 (mg/dl)

図7にはショックの有無とNPM濃度を検討したところ、ショック群では有意にNPM濃度が高かった。

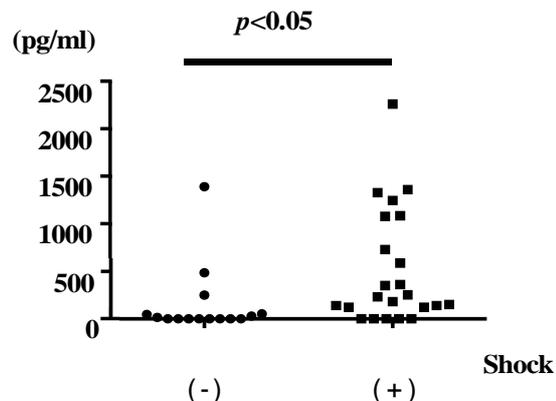


図7 ショックの有無とNPM濃度 (pg/ml) との関係

両群間に $p < 0.05$ で有意差あり

縦軸：NPM濃度 (pg/ml)

横軸：(-): ショック無, (+): ショック有

図8にはSOFAスコアとNPM濃度をプロットしたところ、SOFAスコアの増加に伴い、NPM濃度が増加していた。

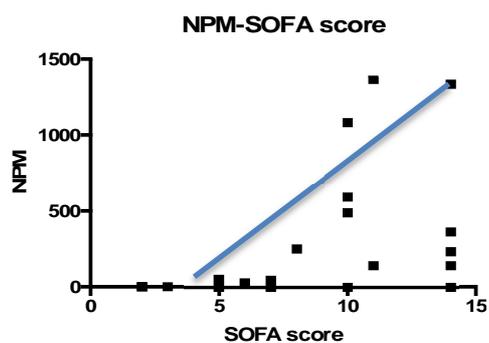


図8 SOFAスコアとNPM濃度 (pg/ml) との関係

$p = 0.0275$ で有意な相関がみられた

縦軸：NPM濃度 (pg/ml)

横軸：SOFAスコア (点)

以上のことから、本研究で得られたCLPによるラットの腹膜炎敗血症モデルでは、DAMPsであるHistone H3蛋白濃度や晩期致死のメディエータでもあるHMGB-1蛋白濃度は炎症性

サイトカイン放出よりも遅い phase で上昇することが明らかとなった。しかし、同じ DAMPs である NPM の血中濃度に関しては前回の報告同様 (2)、有意な増加を認めなかった。

臨床検体において、敗血症性ショックでは NPM 濃度は有意な増加し、また敗血症、敗血症性ショックでは NPM 濃度は SOFA スコアと有意な相関が得られた。

敗血症の新定義 Sepsis-3 では「敗血症は臓器障害を伴う感染症」と定義される。NPM 濃度は他の DAMPs に比べ、臓器障害とよく相関することから、敗血症の診断、治療における重要なパラメータとなりうる。また、DAMPs は発症数時間後から 12 時間後に増加するという治療可能なタイミングであるため、中和抗体投与、または除去など新しい治療のターゲットとして考えることができる。

< 引用文献 >

1. Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol* 2005;17:359-365.
2. Nawa Y, Kawahara K, Tancharoen S, et al: Nucleophosmin may act as an alarmin: implications for severe sepsis. *J Leukoc Biol* 2009; 86: 645-653.
3. Denk S, Perl M, Huber-Lang M: Damage- and Pathogen-Associated Molecular Patterns and Alarmins: Keys to Sepsis? *Eur Surg* 2012; 48:171-179.

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 : 特になし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

今泉 均 (IMAIZUMI , HITOSHI)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 70203304

(2) 研究分担者

升田 好樹 (MASUDA , YOSHIKI)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 10244328