

令和元年6月14日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11424

研究課題名(和文)重症敗血症におけるCRPの役割と治療効果

研究課題名(英文)The effect for C-reactive protein (CRP) for sever sepsis

研究代表者

横室 茂樹 (YOKOMURO, Shigeki)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30267223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性マーカーとして広く使用されているC-reactive protein (CRP)は、近年、様々な生体防御反応を担っていることが報告されている。本研究の目的は、敗血症に対する合成CRPの投与の抗炎症性作用から臓器不全ならびに予後改善効果を有することを明らかにすることである。実験の結果、合成CRP投与群において、有意な生存率の改善が観察され、合成CRP投与による生存率の改善は容量依存であることが明らかになった。CRP投与による治療効果をELISA(IL6とTNFα)で検討したが、CRP治療による顕著な変化は見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで重症敗血症診療において集中治療管理技術の進歩や新規抗菌薬開発が一定の効果を上げてきたことは自明である。しかし、急速な高齢化に伴う罹患率の上昇、依然として高い致死率を勘案すると、今後、さらなる社会問題となることは間違いない。侵襲学において、多彩な生理活性を有する血清蛋白であるCRPに着目した本研究は、これまでになく学術的に極めて独創的である。本研究の成果は、重症敗血症の炎症性生体反応メカニズムの解明においてブレイクスルーとなる可能性があり、将来的に臨床応用により在院期間短縮、医療費削減などへの寄与が期待される。

研究成果の概要(英文)：C-reactive protein (CRP), named from its capacity to precipitate the somatic C-polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae*, is well known as an acute-phase protein. Synthetic CRP has been recently developed and it was revealed that CRP is closely involved in the innate immunity system. Synthetic CRP treatment stimulates macrophages to phagocytize microbes. This project goal is to test the CRP treatment experts protective effects in sepsis. Sepsis was induced by cecum ligation and puncture (CLP) in male C57BL/6J under anesthesia. CRP (250, 500ug/mouse/day, IP) was initiated after CLP. As a result of that CRP dose-dependently improved survival of septic male C57BL/6J. Although CRP effect for survival of sepsis mouse model, plasma level of IL6 and TNF were not reduced compared with CLP. And then, we did not obvious the protective effect of CRP is due to reduction in bacteria.

研究分野：癌

キーワード：敗血症 C-reactive protein (CRP)

1. 研究開始当初の背景

敗血症は、年間約 3000 万人が罹患し、世界でもっとも致死率の高い疾患である。急速な高齢化を反映して入院患者数は 10 年間で 2 倍以上に膨れ上がり、米国における重症敗血症に関する医療費は、年間 167 億ドルと試算されている (Global Sepsis Alliance)。本邦の死亡原因の上位を占める悪性新生物、肺炎も高頻度に敗血症を併存し死に至ることを考慮すると、いかに有効な新規敗血症治療法の開発が急務であることがわかる。にもかかわらず敗血症領域への公的研究費の分配が少ないことも米国では問題視されている。感染などの侵襲を受けた生体では、恒常性を維持するために合目的な生体防御反応を起こす。しかし、過度な侵襲においては、マクロファージなどの免疫担当細胞から産生される過剰な炎症性サイトカインが SIRS(systemic inflammatory response syndrome)から免疫抑制状態(compensatory IRS: CARs)を引き起こし、組織障害から多臓器不全、死に至らしめる。重症敗血症の病態は、分子生物学の進歩とともに徐々に解明されつつあるが、いまだ不十分であり、重症敗血症に対する治療および予防には生体防御反応のさらなる解明およびその制御が不可避である。

重症敗血症治療においては、侵襲後早期の過剰な炎症性生体反応を制御し、その後の免疫抑制状態への移行を如何に回避するかが最大のキーポイントとなる。

C-reactive protein (CRP)は、1930 年に肺炎球菌の C 多糖体と結合することで発見され、組織傷害などにより単球・マクロファージからの IL-6 産生が刺激となり肝細胞から産生される急性相反応蛋白の 1 つである。血清 CRP 値は炎症マーカーとして広く臨床使用されているが、その生体内における役割については不明な点が多い。CRP は、補体の活性化やオプソニン活性の増強を介して貪食細胞による細菌排除を誘導することが報告されており(Mortensen RF, et al. *J Leukoc Biol* 2000)、生体防御反応の一部を担っていることが推察されている。また、研究分担者である木下学は、CRP の抗炎症性作用に注目し、*in vitro*において末梢血単核球の lipopolysaccharide (LPS)などの病原体関連分子パターン(PAMPs)刺激による炎症性サイトカイン産生を合成 CRP 投与が直接的に抑制させることを報告している(Sato A, et al. *Inflammation* 2013)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、重症敗血症の主病態である過剰な炎症性生体反応に合成 CRP の投与がその抗炎症性作用から臓器不全ならびに予後改善効果を有することを明らかにすることであり、そのための具体的な研究アプローチとして、①マウス敗血症(Cecal ligation and puncture; CLP)モデルを作成し、血中および障害臓器(肝・腎・腸)の炎症性サイトカイン発現、アポトーシス(および関連蛋白)、生存率を検討し、合成 CRP 投与の効果を検討する。

3. 研究の方法

[マウス敗血症モデル]

雄性 C57BL/6J マウス。マウスは通常の SPF(specific pathogen free)環境下で飼育し、12 時間の昼夜間隔、室温制御は $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度は $50\% \pm 10\%$ 、自由摂餌摂水条件のもとで飼育した。実験は「日本医科大学 動物実験ガイドライン」に準拠した。CLP モデルの作成は、麻酔下で腹側中心部の皮膚および腹壁を切開、盲腸を引き出し、引き出した盲腸を結紮、盲腸の結紮部に 23 針を 1 穿孔、盲腸を腹腔内に戻し、生理食塩水を 1ml 腹腔内投与後に、腹壁および皮膚の切開部を縫合した。合成 CRP は術直後に 250 μg および 500 μg を 1 回、腹腔内投与した。コントロール群には、同量の PBS を投与している。

[血中サイトカイン IL-6、TNF、IL-10 の測定]

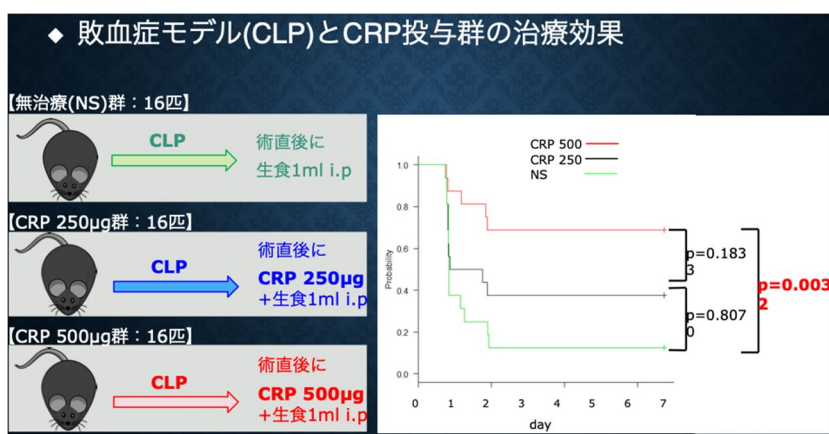
敗血症モデルにおいて CLP 作成 16 時間後に犠死させ血液を採取した。4、3000rpm、45 分間の条件で遠心分離した後、上清を -80°C のディープフリーザーで測定まで保管した。収集した検体は、ELISA 測定 kit: Mouse IL-6 Duo Set ELISA (DY406-05, R and D SYSTEMS)、Mouse IL-10 Duo Set ELISA (DY417-05, R and D SYSTEMS) Mouse TNF (DY410-05, R and D SYSTEMS) を用いてサンドウィッチ酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay

(ELISA))で行った。抗体を結合させた個体ウェルに希釈検体を加え、検体中のサイトカインを抗体と特異的に結合させた。次にペルオキシダーゼ標識抗体を加えて、抗原抗体複合体(サンドウィッチ)を形成させた。この複合体に発色剤を加えて発色させた。発色停止後、450 nm における吸光度を用いて、Sunrise™ マイクロプレートリーダー (TECAN) で血中の IL-6 及び TNF を測定した。

4. 研究成果

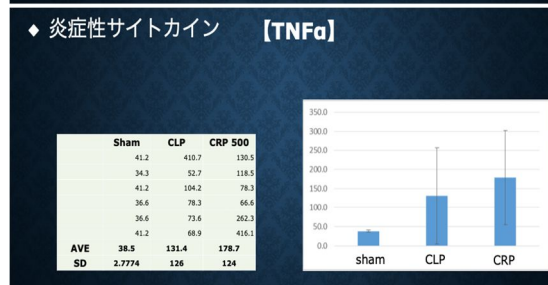
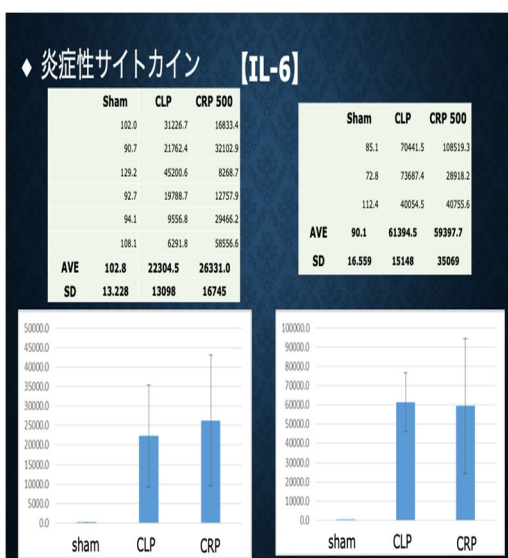
1. 合成 CRP の敗血症モデルマウスに対する効果の検討

生存率は、コントロール群に比べて、合成 CRP 投与群において、有意な生存率の改善が観察された。また、合成 CRP 投与による生存率の改善は容量依存であることが明らかになった。



2. 血中サイトカイン IL-6、IL-10、TNF の検討

CLP 作成 16 時間後に採取した血液サンプルを用いて血中サイトカイン IL-6、IL-10、TNF を計測した。結果、血中サイトカイン IL-6、IL-10、TNF の発現量が Sham 群に比べて CLP 群において、Vehicle 群と合成 CRP 投与群で共に増加していた。



5. 主な発表論文等

〔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)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：松田明久
ローマ字氏名：MATSUDA Akihisa

所属研究機関名：日本医科大学
部局名：医学部
職名：病院講師
研究者番号(8桁)：00366741

研究分担者氏名：宮下正夫
ローマ字氏名：MIYASHITA Masao

所属研究機関名：日本医科大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号(8桁)：70299847

研究分担者氏名：山田真吏奈
ローマ字氏名：YAMADA Marina

所属研究機関名：日本医科大学
部局名：医学部
職名：講師
研究者番号(8桁)：70508621

研究分担者氏名：木下学
ローマ字氏名：KINOSHITA Manabu

所属研究機関名：防衛医科大学校
部局名：医学部
職名：准教授

研究者番号(8桁): 70531391

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 関口久美子

ローマ字氏名: SEKIGUCHI Kumiko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。