

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K15762

研究課題名(和文)低温ショック蛋白RBM3から展開する低温による炎症制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of inflammation control mechanism with hypothermia initiated by cold shock protein RBM3

研究代表者

田崎 修 (TASAKI, Osamu)

長崎大学・病院(医学系)・教授

研究者番号：90346221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においては、侵襲モデルにおける自然免疫系の関与、低温によるRBM3発現と自然免疫受容体発現の関連、を主に探索した。の侵襲モデルとしては、マウスの盲腸結紮穿刺モデル(CLP)および、体表面積20%のIII度熱傷モデル(Burn)を作成した。感染性侵襲モデル(CLP)、および非感染性侵襲モデル(Burn)において、自然免疫受容体および下流のシグナル分子群のmRNAは、特徴的な反応パターンを示すことを明らかにした。においては、低温モデルの早期(3時間後)において、低温ショック蛋白(RBM3、CIRP)、および自然免疫受容体の遺伝子発現が有意に上昇していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、感染性モデルと非感染性モデルにおける自然免疫受容体の遺伝子発現が特徴的なパターンを示すことを明らかにした。救急・集中治療領域における重症患者においては熱発を示すことが多いが、本結果は、遺伝子の発現パターンを解析することにより感染性が非感染性の発熱かを鑑別することができる可能性を示している。

低温ショック蛋白(CSP)については、低温モデルの急性期にCSPの遺伝子発現が有意に上昇すること、自然免疫受容体および下流のシグナル分子群のmRNAの中に上昇するものがあること、および臓器により発現の程度が異なることを明らかにした。今後、蛋白の発現を解明することによりCSPの役割が明らかとなる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we mainly investigated involvement of innate immune system in invasive model, relationship between RBM3 expression by hypothermia and innate immune receptor expression. As an invasion model of , a mouse cecal ligation and puncture model (CLP) and a III degree burn model (Burn) with a body surface area of 20% were prepared. In the infectious invasion model (CLP) and the non-infectious invasion model (Burn), it was revealed that mRNAs of innate immune receptors and downstream signaling molecules show a characteristic reaction pattern. In , we also showed that gene expression of cold shock proteins(RBM3, CIRP) and innate immune receptors were significantly increased in an acute phase(3 hours later) of hypothermia model.

研究分野：救急医学

キーワード：自然免疫受容体 低温ショック蛋白

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

低温の医学的利用は、古くは民間療法レベルで患部の冷却に始まり、心臓外科手術では 1950 年代から低体温で手術を行うことで開心術が発展し、2002 年には心肺停止蘇生後の低体温療法が神経学的予後を改善することがランダム化比較試験で報告された(The Hypothermia after Cardiac Arrest Study Group:2002,N Engl J Med.)。我々も重症頭部外傷に対する低体温療法の神経学的予後の改善について多施設研究で報告してきた(Shiozaki et al:2003, J Neurosurg.)。

低温ショック蛋白 Cold-shock protein: CSP である RNA-binding motif protein 3: RBM3 は低温によって発現する RNA 結合タンパク質で mRNA の転写、翻訳を制御する。Daryl らはマイクロアレイを用いて冬眠中のリスで RBM3 が顕著に発現していることを報告した(Daryl et al:2005,Physiol Genomics.)。2015 年にはマウス神経変性疾患モデルを用いて RBM3 がシナプス形成不全に関与していることが報告された(Peretti et al:2015, Nature)。

低体温がなぜ神経保護に有効であるかについては既知の細胞活動や代謝を抑制するという視点でのアプローチのみで理解されてきたが、本研究では RBM3 に着目して、低温により発現する蛋白や、活性化する生体反応などの能動的な炎症制御メカニズムがあるという仮説に基づいて研究をすすめた。我々は、侵襲早期の炎症反応メカニズムとして自然免疫系が重要な役割を担っていると考えており、自然免疫系において温度も重要な外部刺激であることから、RBM3 の自然免疫への関与に着目して研究を開始するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は低温ショック蛋白: RBM3 による炎症制御メカニズムを明らかにすることであった。自然免疫系と RBM3 に着目して以下の研究を進めた。

- (1) 侵襲モデルにおける自然免疫系の関与
- (2) 低体温による RBM3 発現と自然免疫受容体発現の関連

## 3. 研究の方法

- (1) 侵襲モデルにおける自然免疫系の関与

侵襲モデルとしては、感染性炎症モデルとしてマウスの盲腸結紮穿刺モデル(Cecal Ligation and puncture: CLP)を、非感染性炎症モデルとして体表面積 20%の III 度熱傷モデル(Burn)を作成した。C57BL/6 マウスを Sham、CLP、Burn の 3 群に分け、受傷 6、12、24 時間後に全血より total RNA を抽出した。Rps18 を内部コントロールとして、定量 RT-PCR により自然免疫受容体(TLR2, TLR4, TLR9, NLRP3, RIG-I)と下流のシグナル分子(MyD88, TRIF, IRF-3, IRF-7, Caspase-1)の遺伝子発現を測定した。また、遺伝子発現のパターンを比較するため、判別分析を行った。

- (2) 低体温による RBM3 発現と自然免疫受容体発現の関連

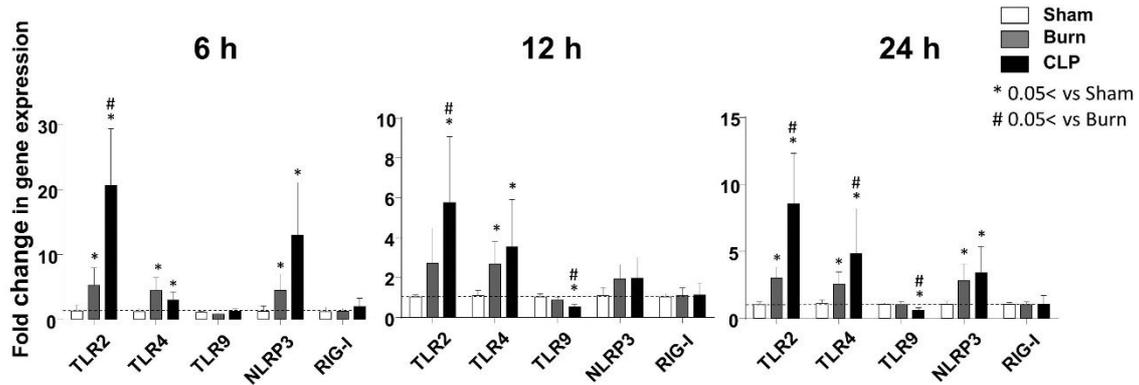
マウスを全身麻酔下に冷却マットにて 16~18℃ で 60 分間冷却した後に、室温で正常な体温まで戻し 3、24 時間後にマウスを安楽死させた(低体温モデル)。コントロール群は同様に全身麻酔下に保温マットで 37℃ に体温コントロールを行った。血液は心腔内採血し、組織は脳および心臓をサンプリングした。血液、組織より total RNA を抽出して逆転写後、PCR 施行し、Rps18 を内部コントロールとして mRNA を定量化した。定量 RT-PCR により低温ショック蛋白 RBM3、および cold-inducible RNA-binding protein(CIRP)の mRNA 発現を測定した。さらに、RBM3 の自然免疫系を介した炎症制御への関与を調べるために、自然免疫受容体と下流のシグナル分子群をターゲットに遺伝子発現を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 侵襲モデルの開発と自然免疫系の関与

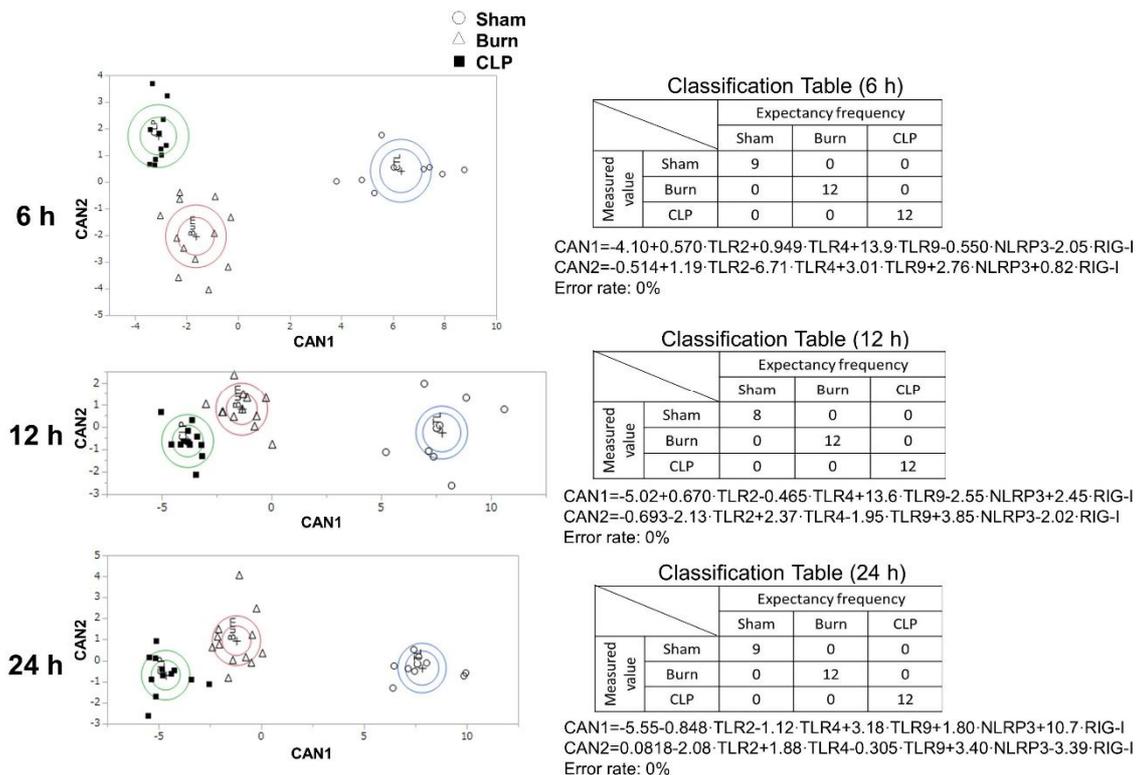
TLR2 と TLR4 の遺伝子発現は、CLP および Burn において受傷 6 時間以降、Sham に比較して有意に増加していた (図 1)。TLR9 の遺伝子発現は、CLP で受傷後 12 時間と 24 時間において、Sham および Burn に比較して有意に減少していた。NLRP3 の遺伝子発現は、CLP と Burn で、受傷後 6 時間と 24 時間において増加していた。

図 1. 侵襲モデルにおける自然免疫系受容体の遺伝子発現



判別分析では、各グループが受傷後 6 時間より特徴的な遺伝子発現パターンを示した。各グループは明瞭に判別され、判別の過誤率はすべての時間で 0%であった (図 2)。本結果は、感染性の炎症と非感染性の炎症では、自然免疫系が異なる反応パターンを示すことを示唆している。本研究成果は、2017 年の米国外傷学会で口演し、論文発表した (Tajima, et al. *J Trauma Acute Care Surg.* 2018;84:583-589.)

図 2. 遺伝子の発現パターンによる判別分析



また、シグナル分子群の遺伝子発現を含めた解析においては、TLR2, TLR4, NLRP3, MyD88 の発現は CLP, Burn において 3 時間後から有意に上昇した。CLP において TLR9 は 12, 24 時間後で

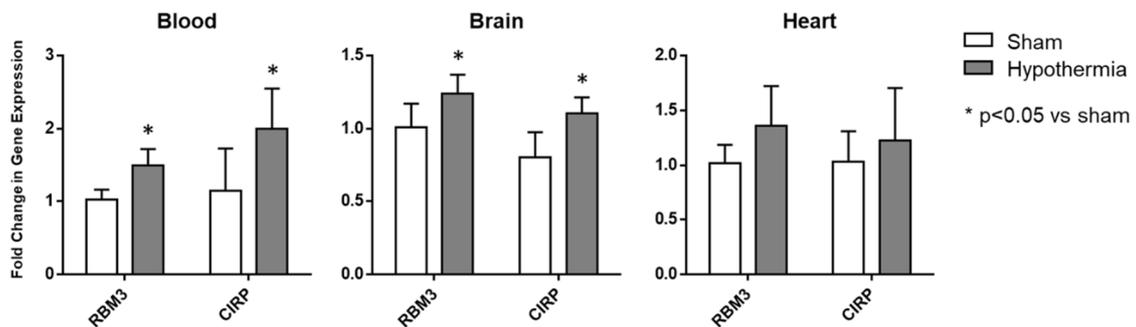
Sham, Burn より有意に低下、IRF-7 は有意に上昇した。3 時間後から各群で特徴的な遺伝子発現パターンを示し、判別分析では 3 時間後で判別過誤率 6.06%、6 時間後からは 0% で各病態を判別できた。本研究成果は、感染および組織損傷において、病態特異的な自然免疫受容体の発現パターンに加え、その下流のシグナル分子の遺伝子発現パターンにおいても受傷早期から特徴的な変化が現れることを示している。ただ、本モデルにおける低体温の影響については、研究期間中に明らかにすることはできなかった。

(2) 低体温による RBM3 発現と、自然免疫受容体発現の関連

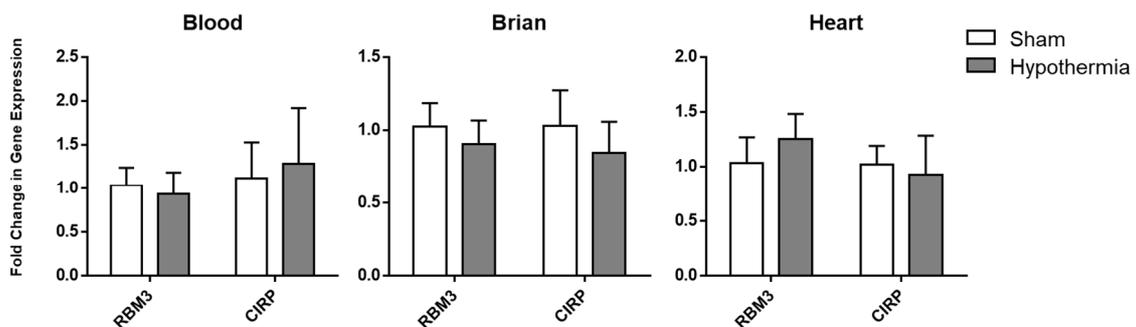
図 3 に低体温モデルにおける低温ショック蛋白の血液、および各臓器における遺伝子発現を示す。3 時間後の血液、脳において、低温ショック蛋白 RBM3、CIRP の mRNA は、いずれにおいても有意に上昇していた。また、心臓でも上昇していたが有意差は認めなかった (図 3a)。一方、24 時間後においては、血液、脳、心臓のいずれも、Sham と比較して、RBM3、CIRP の mRNA 発現に有意差は認めなかった (図 3b)。

図 3 低体温モデルにおける低温ショック蛋白の遺伝子発現

a: 3 時間後



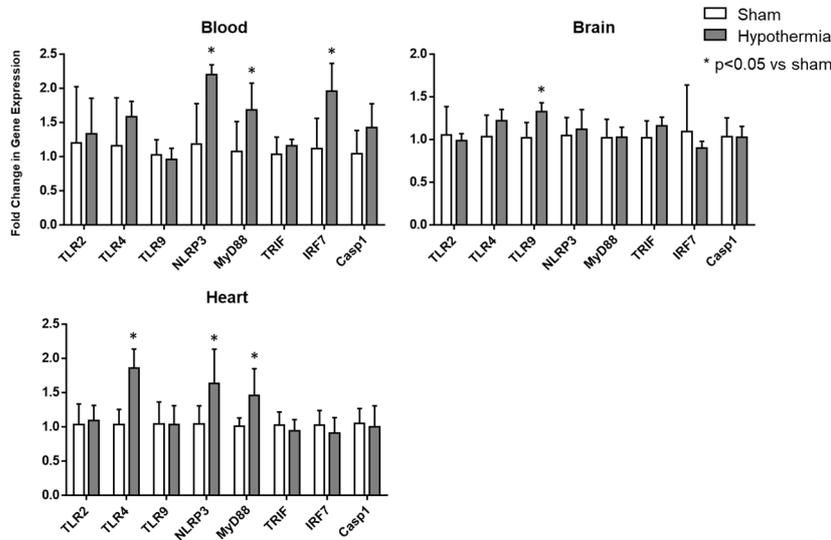
b: 24 時間後



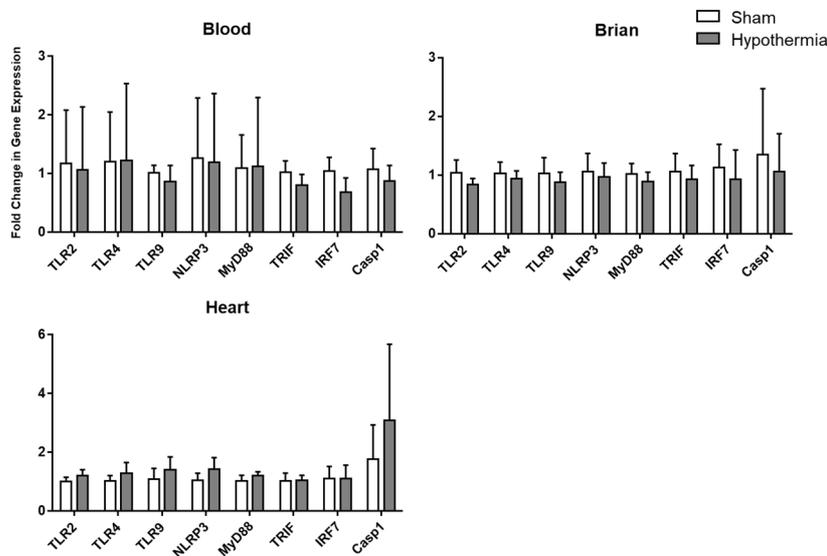
また、RBM3 の自然免疫系を介した炎症制御への関与を調べるために、自然免疫受容体 (TLR2、TLR4、TLR9、NLRP3) と下流のシグナル分子群 (Myd88、TRIF、IRF7、Casp1) をターゲットに遺伝子発現を測定した。結果を図 4 に示す。低体温後 3 時間では、血液においては NLRP3、MyD88、IRF7、脳では TLR9 のみ、心臓では TLR4、NLRP3、MyD88 が有意な上昇を示した (図 4a)。一方、24 時間後においては、血液、脳、心臓のいずれも、sham と比較して、自然免疫受容体と下流のシグナル分子群の mRNA 発現に有意差は認めなかった (図 4b)。

図4 低体温モデルにおける自然免疫受容体およびシグナル分子群の遺伝子発現

a:3時間後



b:24時間後



本研究では、16~18 で 60 分間の低体温後、3 時間後には、低温ショック蛋白 RBM3、CIRP の上昇を認めたが、24 時間後にはいずれも上昇を認めず、低温ショック蛋白の mRNA 発現は、低体温後早期に発現するものと考えられた。ただ、今回は mRNA しか測定していないため、蛋白レベルでは 24 時間後にも上昇していた可能性が考えられた。また、本研究では 3 時間後と 24 時間後のみの測定なので、発現のピークは捉えられておらず、さらなる経時的な測定が必要である。

自然免疫系の mRNA の発現は臓器ごとに発現する分子が異なっており、臓器によって低温ショック蛋白の働きが異なる可能性が考えられたが、低温ショック蛋白と自然免疫系の関係あるいは、低体温の自然免疫系への直接の影響を確認するには蛋白の発現を測定する必要がある。

低体温による低温ショック蛋白の発現と、自然免疫系の関係をより詳細に調べるには、さらに長時間の低温暴露や、経時的な mRNA 発現を調べる必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tajima Goro, Tokunaga Ayako, Umehara Takahiro, Ikematsu Kazuya, Miyamoto Junya, Sato Shuntaro, Tasaki Osamu	4. 巻 84
2. 論文標題 Early diagnosis using canonical discriminant analysis of innate immune receptor gene expression profiles in a murine infectious or sterile systemic inflammation model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Trauma and Acute Care Surgery	6. 最初と最後の頁 583 ~ 589
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/TA.0000000000001789	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hayakawa Koichi, Tasaki Osamu, Iwamura Hiromu, Wada Daiki, Saitou Fukuki, Iba Jiro, Yoshiya Kazuhisa, Ikegawa Hitoshi, Shiozaki Tadahiko, Nakamori Yasushi, Fujimi Satoshi, Shimazu Takeshi, Kuwagata Yasuyuki	4. 巻 6
2. 論文標題 Relationship between Intracranial Pressure or Cerebral Perfusion Pressure and Prognosis in Patients with Severe Traumatic Brain Injury Treated with Mild Hypothermia	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Trauma & Treatment	6. 最初と最後の頁 1 ~ 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4172/2167-1222.1000380	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 井山 慶大、猪熊 孝実、佐藤 俊太郎、山野 修平、田島 吾郎、平尾 朋仁、田崎 修	4. 巻 28
2. 論文標題 D-dimerを用いた外傷後静脈血栓塞栓症の新たなスクリーニング基準に関する検討	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本救急医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 134 ~ 144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 福島 達也、宮本 俊之、田口 憲士、土居 満、岩尾 敦彦、田崎 修	4. 巻 41
2. 論文標題 汚染創への対応 四肢開放創へのデブリドマン治療	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 救急医学	6. 最初と最後の頁 1407 ~ 1412
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Eri Uemura, Goro Tajima, Naoya Matsumoto, Ayako Tokunaga, Miyuki Miura, Takehiko Murase, Kazuya Ikematsu, Osamu Tasaki.
2. 発表標題 THE EXPRESSION OF REPULSIVE GUIDANCE MOLECULE A (RGMA) AFTER TRAUMATIC BRAIN INJURY: THE TIME-COURSE GENE EXPRESSION CHANGES IN THE MURINE CONTROLLED CORTICAL IMPACT MODEL
3. 学会等名 79th Annual Meeting of AAST and Clinical Congress of Acute Care Surgery (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Goro Tajima, Eri Uemura, Ayako Tokunaga, Miyuki Miura, Takahiro Umehara, Kazuya Ikematsu, Osamu Tasaki.
2. 発表標題 PATTERN-BASED ANALYSIS OF GENE EXPRESSION PROFILE BY CANONICAL DISCRIMINANT ANALYSIS COULD IDENTIFY THE PATHOPHYSIOLOGY REGARDLESS OF THE SEVERITY
3. 学会等名 79th Annual Meeting of AAST and Clinical Congress of Acute Care Surgery (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田島 吾郎、徳永 彩子、梅原 敬弘、池松 和哉、田崎 修
2. 発表標題 全身性炎症における自然免疫システムの遺伝子発現パターンによる病態判別
3. 学会等名 第47回日本救急医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Goro Tajima, Ayako Tokunaga, Takahiro Umehara, Kazuya Ikematsu, Osamu Tasaki
2. 発表標題 Novel Method to Discriminate the Pathophysiology of Inflammation by Patterns of Innate Immune System
3. 学会等名 Society of Critical Care Medicine 48th Critical Care Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田島 吾郎、徳永 彩子、梅原 敬弘、池松 和哉、田崎 修
2. 発表標題 マウス広範囲熱傷モデルにおける急性期の自然免疫受容体発現変化
3. 学会等名 第44回日本熱傷学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田島 吾郎、徳永 彩子、梅原 敬弘、池松 和哉、田崎 修
2. 発表標題 組織損傷における全身性炎症の自然免疫受容体発現パターン
3. 学会等名 第32回日本外傷学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田島 吾郎、徳永 彩子、梅原 敬弘、池松 和哉、田崎 修
2. 発表標題 全身性炎症における自然免疫受容体発現パターンの経時変化
3. 学会等名 第46回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Goro Tajima, Ayako Tokunaga, Takahiro Umehara, Kazuya Ikematsu, Osamu Tasaki
2. 発表標題 EARLY DIAGNOSIS USING CANONICAL DISCRIMINANT ANALYSIS OF INNATE IMMUNE RECEPTOR GENE EXPRESSION PROFILE IN INFECTIOUS OR STERILE SYSTEMIC INFLAMMATION
3. 学会等名 76th Annual Meeting of the American Association for the Surgery of Trauma and Clinical Congress of Acute Care Surgery (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田島 吾郎、徳永 彩子、梅原 敬弘、池松 和哉、田崎 修
2. 発表標題 全身性炎症における自然免疫受容体発現パターンによる早期病態判別法
3. 学会等名 日本救急医学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 井山 慶大、猪熊 孝実、池田 聡司、高橋 健介、山野 修平、田島 吾郎、平尾 朋仁、野崎 義宏、山下 和範、前村 浩二、田崎 修
2. 発表標題 外傷後静脈血栓塞栓症の新規予防法に関する検討
3. 学会等名 日本救急医学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮本 俊之、福島 達也、田口 憲士、尾崎 誠、田崎 修
2. 発表標題 DCO:Damage Control Orthopaedics 長崎大学病院におけるDamage Control Orthopaedics(DCO)の実際
3. 学会等名 日本外傷学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 野崎 義宏、山下 和範、猪熊 孝実、山野 修平、田島 吾郎、平尾 朋仁、高橋 健介、松本 直也、村橋 志門、田崎 修
2. 発表標題 当センターにおける頸髄損傷患者の気管切開適応に関する検討
3. 学会等名 日本外傷学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tajima G, Umehara T, Ikematsu K, Tasaki O
2. 発表標題 Infection diagnosis in systemic inflammation by innate immune expression pattern
3. 学会等名 75th Annual meeting of the American association for the surgery of trauma and clinical congress of acute care surgery (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 田島 吾郎、梅原 敬弘、池松 和哉、田崎 修
2. 発表標題 全身性炎症における自然免疫受容体発現パターンによる感染症診断法
3. 学会等名 日本救急医学会総会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田島 吾郎  (TAJIMA Goro)  (00437427)	長崎大学・病院 (医学系)・助教   (17301)	
研究分担者	山野 修平  (YMANO Shuhei)  (60570538)	長崎大学・病院 (医学系)・助教   (17301)	
研究分担者	梅原 敬弘  (UMEHARA Takahiro)  (60617421)	長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・助教   (17301)	

