

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 元 年 6 月 1 3 日現在

機関番号： 1 3 7 0 1

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2016 ~ 2018

課題番号： 1 6 K 1 9 3 0 9

研究課題名 (和文) 発熱疾患鑑別 好中球表面抗原CD64・CD35・CD49d 測定の有用性

研究課題名 (英文) Febrile disease differentiation. Usefulness of neutrophil surface antigen CD64, CD35, CD49d measurement.

研究代表者

臼井 太郎 (Usui, Taro)

岐阜大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号： 1 0 5 8 5 2 5 1

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 2,900,000 円

研究成果の概要 (和文) : 発熱患者の発現遺伝子をマイクロアレイで解析するため、健常者、発熱患者から mRNA 採取の方法を検討し、Paxgeneを用いた方法が最も安定していた。しかし健常者間のマイクロアレイ比較でも結果はかなり差があり、発熱疾患の診断をそろえて解析する必要があった。一方、脂肪組織のマクロファージ分画に対する sphingosine 1-phosphate (S1P) の影響を検討し、各種 S1P シグナル作動薬を用いて、マウスの腹腔内マクロファージ、脾臓の炎症惹起性マクロファージマーカー CD11a の発現を、フローサイトメトリー、免疫染色で検討した結果、S1P 受容体 2 の阻害は炎症抑制性に働く可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発熱は、一般内科外来において患者が訴える最も多い症状の1つである。精査のために多くの血液検査や画像診断、さらには入院精査が必要となる。発熱患者の鑑別診断は、その原因が患者によって多種多様で、時に診断に時間と労力を要するのが現状である。本研究では、上記疾患を迅速に鑑別するマーカーとして、これまで十分な検討がなされておらず、短時間で測定可能な白血球の各種細胞表面マーカーを測定することにより、新規指標となることを実証し、臨床現場で応用することを目指した。本研究結果が、他の同様の研究の参考となればと考える。

研究成果の概要 (英文) : In order to analyze the expression genes of fever patients by microarray, we examined the method of collecting mRNA from healthy people and fever patients, and the method using Paxgene was the most stable. However, the results of the comparison of microarrays among healthy persons also differed considerably, and it was necessary to analyze and analyze the diagnosis of fever disease.

On the other hand, the effect of sphingosine 1-phosphate (S1P) on the macrophage fraction of adipose tissue was examined. The expression of inflammation-induced macrophage marker CD11a in mouse peritoneal macrophages and spleen was examined by flow cytometry and immunostaining using various S1P signal agonists, and as a result, inhibition of S1P receptor 2 works to suppress inflammation. The possibility was suggested.

研究分野： 免疫学

キーワード： 発熱疾患 好中球細胞表面マーカー S1P

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19（共通）

1. 研究開始当初の背景

発熱は、一般内科外来において患者が訴える最も多い症状の1つである。発熱と同時に食欲不振や倦怠感、筋肉痛、関節痛、頭痛など不快な症状を伴うことが多く、さらに発熱が1週間以上続く場合は生活や仕事に支障が生じ、精査のために多くの血液検査や画像診断、さらには入院精査が必要となる。発熱患者の鑑別診断は、その原因が患者によって多種多様で、時に診断に時間と労力を要するのが現状である。一方で発熱疾患の中には急激に悪化して、致死的な経過を辿るものもあるため、迅速な原因究明が求められているが、現状では主治医の経験的に頼った判断に依って診断がなされている。発熱原因の3大疾患である感染症・膠原病・悪性腫瘍を迅速に鑑別するマーカーとして、これまで発熱疾患では十分な検討がなされておらず、短時間で測定可能な白血球の各種細胞表面マーカーを測定することにより、新規指標となることを実証し、臨床現場で応用することを目指す目的で研究を開始した。

一方当研究室は梶田准教授を中心として、sphingosine 1-phosphate (S1P)の脂肪細胞に対する影響を検討している。S1Pは sphingosine から生成され、5種類の受容体 (S1pr1-5)を介して作用し、細胞の増殖、遊走、分化、アポトーシスなど様々な活動に関与している。そして発癌、循環、炎症、免疫といった分野で研究されているが、肥満、糖尿病の分野での検討は少ない。梶田らは、S1pr2 欠損マウスが対照よりも体重が少なく、高脂肪食負荷によりこの体重差がなくなるが、それでも耐糖能、インスリン感受性は対照より改善していること、脂肪細胞サイズは対照よりも小型化していることを見出した。そして培養前脂肪細胞 (3T3-L1, 3T3-F442A)を用いて、S1Pは総体としては前脂肪細胞の増殖を促進し、脂肪細胞への分化を抑制する。S1pr1/3を抑制するVPC23019を用いた検討で、S1pr1/3は増殖を促進し、分化を抑制する。S1pr2を抑制するJTE013を用いた検討で、S1pr2は増殖を抑制し、分化を促進するという結論を得た (Kitada Y, Kajita K et al, Endocrinology 2016, 157: 1839-1851)。その後VPC23019、JTE013あるいはS1pr1作動薬SEW2871をマウスに投与する実験を行った。ここでこれらの薬剤が体重、脂肪組織、耐糖能、インスリン感受性に及ぼす影響につき検討したが、同時に脂肪組織へのマクロファージの浸潤についても検討した。

肥満によるインスリン抵抗性発現の機序として、近年脂肪組織での炎症が注目されている。肥満により肥大化した脂肪細胞からマクロファージの遊走促進物質、炎症惹起物質が産生されることにより、マクロファージの浸潤、炎症抑制性マクロファージ(M2マクロファージ)から炎症促進性(M1マクロファージ)への転換がおこり、これにより脂肪組織のリモデリングが起こることが、インスリン抵抗性の成立に関与しているとされている。高脂肪食を負荷したS1pr2欠損マウスでは脂肪組織の炎症が改善していることが示された。ここで、この炎症の改善がS1Pシグナルの脂肪細胞への影響のみで説明できるのか、という点が問題になった。S1Pは様々な細胞に作用しており、免疫系にも影響を及ぼしている。S1Pシグナルの調節を臨床応用した最初の薬剤であるフィンゴリモドは免疫抑制剤としての効果を期待されていることを考えても、S1Pシグナルが脂肪組織に浸潤するマクロファージの方にも作用している可能性は十分あるため、この点についても検討した。

2. 研究の目的

(1)末梢血好中球に発現したCD64は有用な感染症マーカーであると報告されている。またCD35は好中球では補体に覆われた粒子の貪食を媒介し、感染症で発現が増加する。更にCD49dは好中球の細胞間相互作用に関係する。今回発熱患者における好中球のCD65、CD35、CD49dをフローサイトメトリーで測定し、これが発熱疾患の診断に応用できないかを検討する。

(2)S1Pシグナルの調節が脂肪組織以外のマクロファージの機能に影響するか否かを解明する。

3. 研究の方法

(1)健康人、発熱患者から採血を行い、好中球におけるCD64、CD35の発現をフローサイトメトリーで測定する。

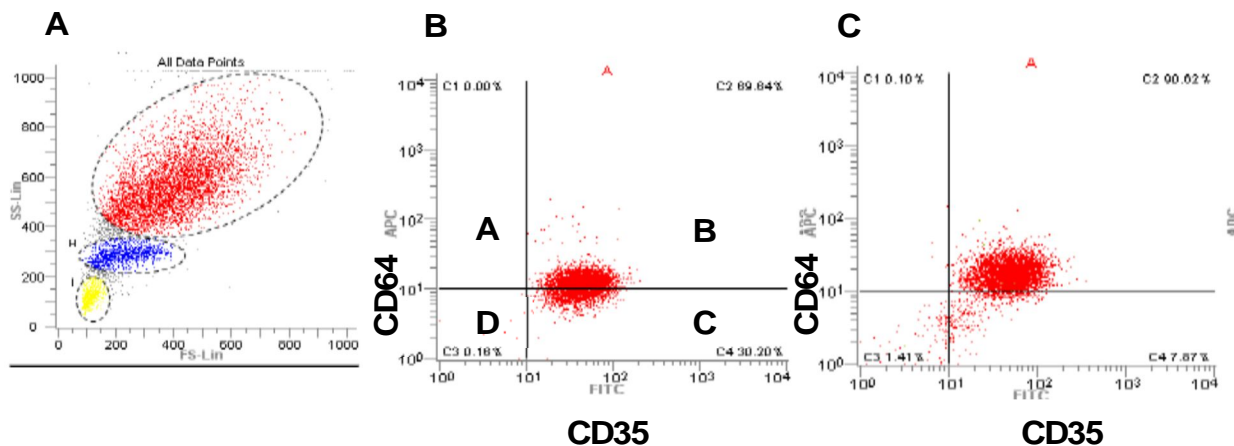
(2)健康人、発熱患者の白血球からmRNAを採取し、マイクロアレイでmRNAの発現の差を検

討する。

(3) C57 マウスあるいは ob/ob マウスに S1pr2 阻害薬 JTE013 あるいは S1pr1 作動薬 SEW2871 を投与し、脂肪組織の M1 マクロファージの浸潤を抗 CD11c の発現で検討する。合わせてそれぞれのマウスの腹腔内洗浄液における CD11c の発現をフローサイトメトリーで測定する。

4. 研究成果

(1) 発熱患者の好中球の CD64、CD35、CD49d の発現



(Fig. 1)

Fig. 1 に当大学の倫理委員会の承認を得た後（承認番号：2018-022）健康人から採取した血液での FCM の結果を示す。A に示すように、末梢血から赤で示した好中球の分画の CD64、CD35 の発現をみると、B に示すように、CD64 のみ発現(A)する集団は極めて少なく、CD64、CD35 共に発現(B)、CD35 のみ発現(C)する細胞群はそれぞれ連続した集団として存在していた。A : B : C : D の比率は、 0 ± 0 , 82.1 ± 4.0 , 17.4 ± 4.1 , 0.5 ± 0.2 (n=6)であったが、健康人の中にも C のように殆どが CD64、CD35 共に発現する集団にはいってしまった者もいた。発熱疾患を有する患者ではこれらの発現が上昇しており、そのパターンから何らかの情報がえられるのではないかと期待していたのであるが、これらのマーカーを用いたのでは健康人との有意な差を出すことが困難と考えられた。実際に少数の発熱したボランティアで検討しても健康者と差はなかった。CD49d を用いた検討でもほぼ同等であった。

(2) 発熱患者の白血球の遺伝子発現

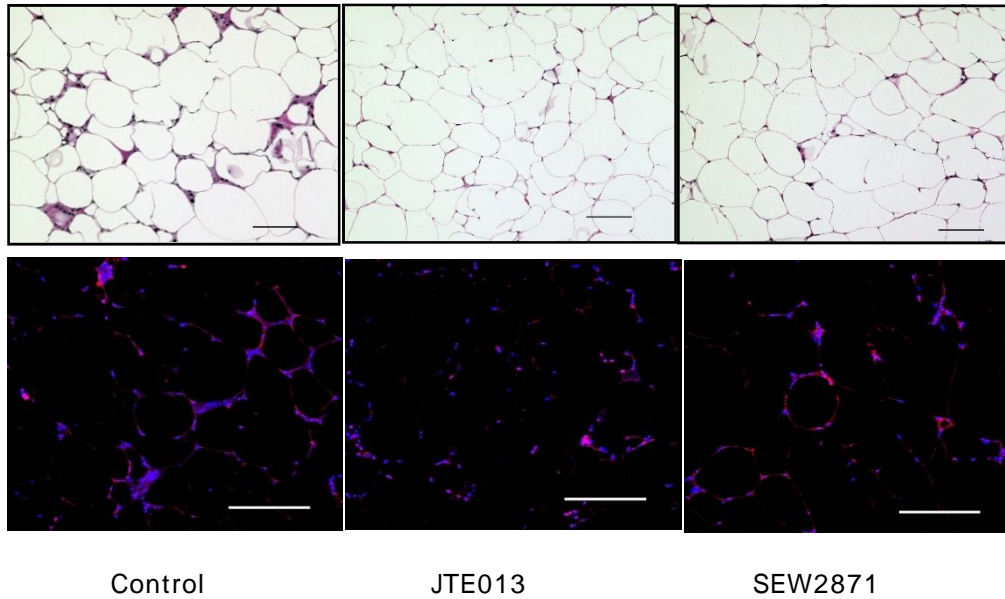
そこで別の細胞表面マーカーを用いてこの検討を行うこととした。その方法として、発熱患者の白血球から RNA を採取し、健康者あるいは別の原因の発熱患者との間でマイクロアレイを行い、候補となるマーカーを探すことを試みた。当大学の倫理委員会の承認を得た後（承認番号：2018-022）健康者から mRNA を採取することを試みた。しかしパーコール、溶血など様々な方法で mRNA 抽出を試みたが、臨床の場で、誰でも簡便に実行できて、かつマイクロアレイによる検討が可能な高品質の mRNA を得るのは困難である。現在 Paxgene を用いて抽出のための最適な条件を検討している。

(3) S1P シグナルの腹腔内 M1 マクロファージの分布への影響

遺伝的肥満マウス(ob/ob マウス)と通常マウス(C57/BL マウス)に JTE013、あるいは SEW2871 を 40 mg/kg 含む餌を投与し、体重への影響を見たところ、C57/BL マウスでは影響はなかったが、ob/ob マウスでは、対照に比べ、JTE013、SEW2871 投与いずれも同程度に体重増加を抑制した。耐糖能も対照に比べ、JTE013、SEW2871 投与いずれも同程度に耐糖能を改善した。

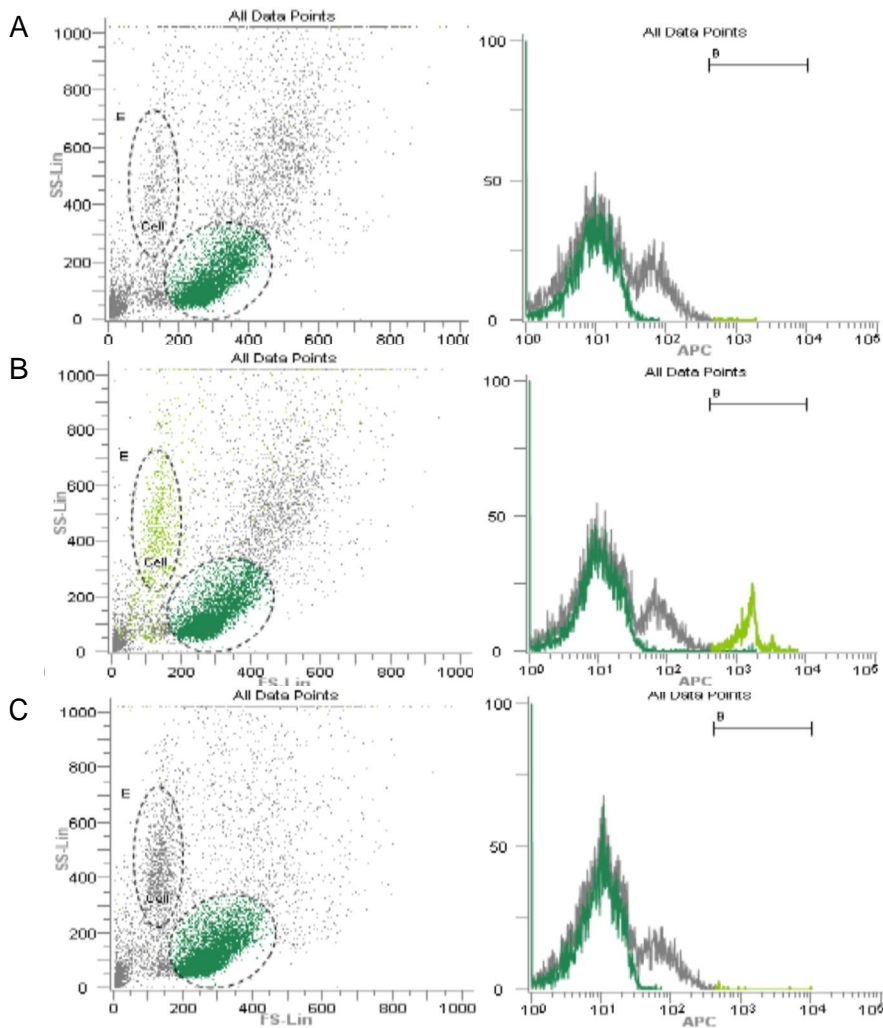
これらのマウスの脂肪組織をみると、Fig. 2 上段に示したように、JTE013、SEW2871 の投与により、脂肪細胞の大きさは縮小した。Fig. 2 下段に示したように、Control で認められた炎症性マクロファージの浸潤は、JTE013、SEW2871 の投与により殆ど認められなかった。

これらの薬剤の投与により、マクロファージへの直接の影響の有無をみる目的で、マウスの腹腔洗浄液におけるマクロファージの M1、M2 の分布を検討した。



(Fig. 2)

対照 ob/ob マウスの腹腔内洗浄液中の細胞における M1 マクロファージの分布をフローサイトメトリーで検討した。Fig. 3A に示すように、抗 CD11c 抗体で標識しなかった対照に比べ、抗 CD11c 抗体で標識した Fig. 3B 左では黄緑で示された CD11c 陽性な細胞群のピークが認められた。この細胞群が JTE013 投与マウスでは Fig. 3C に示したように消失している。これは JTE013 投与によって M1 マクロファージそのものが減少していることを示している。



(Fig. 3)

結果として、JTE013 投与による脂肪細胞の M1 マクロファージの浸潤の低下は、S1pr2 シグナル遮断の効果が脂肪細胞のみならず、マクロファージに直接作用した結果であるとも考えられた。

結論として、(1) 好中球細胞表面マーカーによる発熱疾患の診断には、適切なマーカーの設定が必要と考えられた。(2) S1pr2 のシグナル阻害による肥満マウスの耐糖能改善には脂肪細胞への影響だけでなくマクロファージへの直接作用も関与していると考えられた。

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

なし

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8 桁) :

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：梶田和男
ローマ字氏名：Kazuo Kajita

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。