

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09434

研究課題名(和文) 多臓器不全における骨髄前駆細胞の役割の解明

研究課題名(英文) Investigating the Role of Bone Marrow Progenitor Cells in Multiple Organ Failure

研究代表者

田畑 貴久 (Tabata, Takahisa)

滋賀医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：90278200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：多臓器不全は過大な侵襲によって生じる致死率の高い難治性の病態である。申請者らは、これまでの研究にて骨髄造血幹細胞が異常化することにより、多臓器不全を発症するとの仮説を考え、本研究を開始した。集中治療室入室患者におけるCD34陽性細胞中のInsulin mRNA発現率は、死亡群においては生存群に比しinsulin mRNAが検出率が高くなった。フローサイトメトリーにてCD34/Proinsulin/DCSTAMP共陽性の細胞を調査したところ、死亡群、多臓器不全群にて増加する傾向を認めた。これらの結果から、多臓器不全患者においては骨髄前駆細胞に異常が生じていることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多臓器不全発症のメカニズムには、様々な仮説が提唱され、多くの治療法が試みられてきたが、未だ死亡率を劇的に下げるような有効な治療法の開発には至っていない。多臓器不全の臓器不全と糖尿病合併症の間には、臓器不全進行の速さは異なるが、類似点が数多く存在し、共通の発症メカニズムが存在する可能性がある。糖尿病においては骨髄造血幹細胞に異常が生じていることが報告されているが、多臓器不全における骨髄造血幹細胞の異常については、申請者の知る限り本研究が初めての報告である。この成果により、多臓器不全の発症メカニズム、ひいては新たな治療法の開発につながり、多臓器不全の予後改善に貢献できるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Multiple organ Dysfunction Syndrome (MODS) is a highly lethal and intractable disease caused by invasive procedures such as sepsis, trauma, severe acute pancreatitis, and invasive surgeries. We hypothesized that abnormal bone marrow hematopoietic stem / progenitor cells may cause MODS, which results in a variety of organ dysfunctions. The expression rate of insulin mRNA in CD34-positive cells of patients admitted to the intensive care unit (ICU) was increased in the non-survivor group. And the expression of CD34/proinsulin/DCSTAMP co-positive cells by flow cytometry tended to increase in the non-survivor group and the MODS patients group. These results strongly suggests that abnormalities in bone marrow stem / progenitor cells occur in patients with MODS.

研究分野：救急医学

キーワード：多臓器不全 プロインスリン陽性細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多臓器不全は敗血症や外傷、重症急性膵炎、過大侵襲手術等、生体にとり過大な侵襲によって生じる致死率の高い難治性の病態である。多臓器不全発症のメカニズムには、様々な仮説が提唱され、多くの治療法が試みられてきた。しかし、未だ死亡率を劇的に下げるような有効な治療法の開発には至っておらず、多臓器不全のメカニズムの解明が急務である。

多臓器不全の臓器不全と糖尿病合併症の間には、臓器不全進行の速さは異なるが、類似点が数多く存在し、共通の発症メカニズムが存在する可能性がある。Kojima および分担研究者の松村らは糖尿病モデルマウスを使用した研究にて、Proinsulin 産生骨髄由来細胞(Proinsulin(PI)-producing bone marrow-derived cells; PI-BMDCs)が肝臓、脂肪、神経細胞に融合し、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  を発現していることを見出した。さらに、骨髄由来で各臓器にて機能している細胞が減少し、臓器機能不全を来すことが糖尿病合併症の原因となる可能性につき報告している。申請者らは PI-BMDCs の出現、骨髄由来の各臓器における機能細胞の減少が、糖尿病だけでなく多臓器不全患者においても存在するとの仮説を立て(図1)、現在まで研究を進めてきた。

申請者らは病理検体標本を用いた検討にて、糖尿病患者だけでなく、多臓器不全患者においても PI-BMDCs が肝臓、脂肪、腎臓、神経細胞において発現していることを見出した。また、肝臓における PI-BMDCs 陽性細胞数と死亡時の臓器不全数が相関することも明らかとした。次に集中治療室入室患者における血中 Insulin mRNA 量を前向きに測定したところ、血中 Insulin mRNA 上昇は多臓器不全発症の独立した危険因子であることを見いだした。PI-BMDCs が血液を介し臓器細胞に融合し、多臓器不全発症に関与していることを示唆するものと考えている。さらに血中 Insulin mRNA 増加患者の調査した

ところ、Insulin mRNA 増加群は骨髄造血幹細胞/前駆細胞のマーカとされる CD34mRNA が上昇しており、図1に示す骨髄由来細胞マーカ-の mRNA も上昇していた。

以上の結果から申請者は、過大侵襲により骨髄造血細胞は前駆細胞(あるいは造血幹細胞)の異常化によって PI-BMDCs を産生し、その結果;(1) PI-BMDCs の神経、臓器細胞への融合および TNF- $\alpha$  の産生(炎症の増強)(2)異常化することによる正常な骨髄由来細胞の減少(臓器機能低下)が重なり、多彩な臓器障害を呈する多臓器不全を発症するとの仮説を考えるに至った(図1)

### 2. 研究の目的

本研究においては骨髄造血前駆細胞の異常を検証し、その異常と臓器障害および死亡との関連につき調査を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 集中治療室入室患者における CD34 陽性細胞中の Insulin mRNA の発現の調査

滋賀医科大学集中治療室入室患者において、末梢血より CD34 陽性細胞を EasySep Human CD34 Positive Kit を用いて単離し、mRNA を抽出。cDNA を作成し冷凍保存した。その後、CD34 陽性細胞における骨髄由来細胞のマーカ- (図1 参照) の発現につき定量的 PCR 検査にて調査を行った。比較のため健常者においても同様の調査を行った。

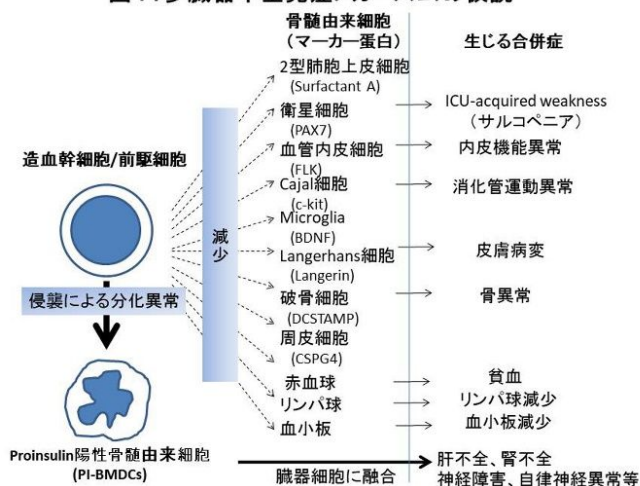
#### (2) 集中治療室入室患者における CD34 陽性細胞中の Proinsulin の発現の調査

滋賀医科大学集中治療室入室患者において、末梢血より単核球を抽出し、フローサイトメトリーによる調査を行った。識別に使用する抗体としては Proinsulin 抗体、CD34 抗体、細胞融合に必要であり骨髄由来細胞である破骨細胞も発現している DCSTAMP の抗体を使用した。また、以前の結果にて敗血症患者での insulin mRNA の出現率が高かったことから、敗血症患者を対象とした。

### 4. 研究成果

#### (1) 集中治療室入室患者における CD34 陽性細胞中の Insulin mRNA の発現の調査

図1: 多臓器不全発症メカニズムの仮説



申請者が考える多臓器不全発症のメカニズム。多くの合併症が一元的に説明できる。

集中治療室入室患者および健常者における CD34 陽性細胞中の Insulin mRNA 陽性率について検討を行った。いずれも糖尿病の既往の無い健常者(8名) 90日死亡群(8名) 非死亡群(14名)を対象とした。健常者においても1例(12.5%)において Insulin mRNA が検出された。集中治療室入室した患者の生存群(90日非死亡群)においては4例(28.5%) 死亡群においては3例(37.5%)にて Insulin mRNA が検出された(図2)。他の骨髄由来細胞のマーカー(SP-Aなど図1参照) TNF- $\alpha$  の発現を調査したが、Insulin mRNA と同様の傾向は認められなかった。CD34 陽性細胞に発現する骨髄由来細胞マーカーは様々あるが、Insulin の発現と重症化との間には相関関係がある可能性が考えられた。

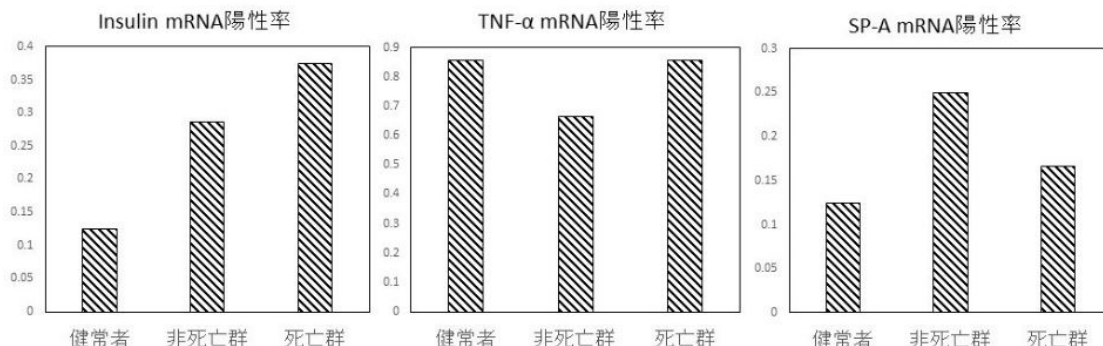


図2: CD34陽性細胞におけるmRNA発現の調査

CD34陽性細胞を単離し、mRNAを抽出。cDNAとした後に骨髄由来細胞のマーカー蛋白質のmRNA発現を調査した。Insulin mRNAは健常者に比して死亡群で陽性率が増加する傾向にあったが、他のマーカーに関しては、重症度との相関関係は認められなかった。

## (2) 集中治療室入室患者における CD34 陽性細胞中の Proinsulin の発現の調査

我々は今までの研究で、病理検体標本において Proinsulin 陽性細胞が、肝細胞、脂肪細胞に融合している像を観察してきた。そこで融合に必要とされる蛋白質である DCSTAMP と Proinsulin が併存している細胞が、臓器不全ひいては予後不良の原因となる可能性を考え、フローサイトメトリーによる調査を行ったところ、健常者においては、CD34 陽性、Proinsulin 陽性、DCSTAMP 共陽性の細胞はほぼ認めなかったが、重症患者においては増加する傾向にあった(図3)。この細胞が PI-BMDCs である可能性があると考えられた。

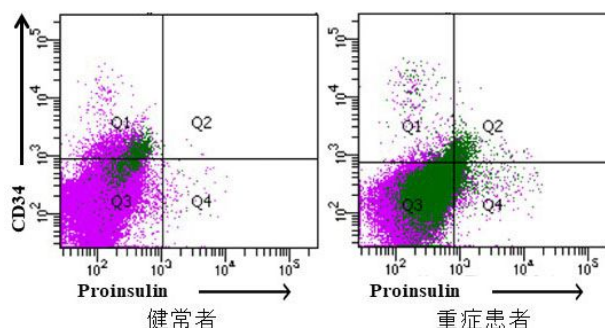


図3: フローサイトメトリーによるPI-BMDCsの検出

抗CD34抗体(縦軸)、抗Proinsulin抗体(横軸)、抗DCSTAMP抗体(緑色)による末梢血単核球細胞の染色像。健常者においてはほぼQ2領域に陽性細胞を認めないが、重症患者においては多数の共陽性細胞を認めた。

18名の集中治療室入室した敗血症患者の末梢血にて調査を行った。年齢の中央値は70歳(IQR 61 - 76)であり、男性が10名(55.5%)、SOFA scoreの中央値は10(IQR 6.75 - 13)であり、敗血症性ショックの症例は14例(77.8%)であった。90日死亡例は4例(22.2%)であり、2臓器不全の多臓器不全患者は16例(88.9%)であった。

集中治療室入室時に採血を行った調査においては、CD34、Proinsulin、DCSATMP共陽性の細胞の出現は90日死亡との関係を認めなかった。しかし、経過中の最大値にて検討を行うと、90日死亡、多臓器不全患者においては増加する傾向を認めた(図4)。このことから、造血前駆細胞の異常化は侵襲初期に生じるのではなく、重症状態が続いた後に生じ、臓器不全や死亡に関与する可能性が考えられた。

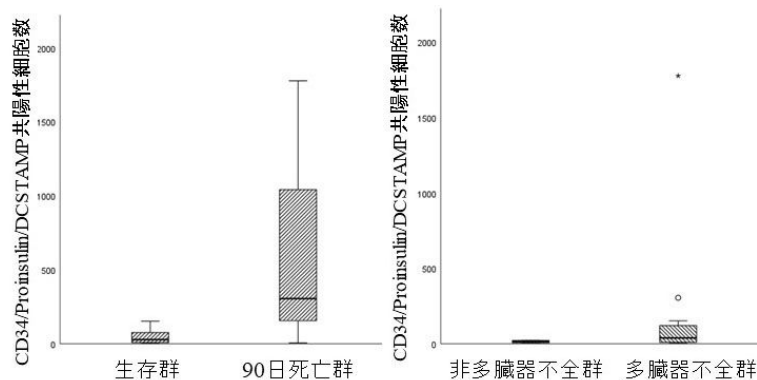


図4: PI-BMDCsの検出と多臓器不全、生命予後との関係

CD34/Proinsulin/DCSTAMP共陽性細胞をPI-BMDCsと考え、末梢血単核球中の個数を調査した。90日死亡、多臓器不全患者に置いて、末梢血中PI-BMDCsは増加する傾向にあった。

### 3)まとめ

研究期間中に Covid-19 の流行があり、臨床研究が行えない期間があり、いずれの検討においても統計学的な有意差を得るまで症例数を蓄積することが出来なかった。申請者らの仮説である「骨髄前駆細胞の異常化により多臓器不全を発症する」を証明するまでには至らないが、多臓器不全患者においては骨髄前駆細胞に異常が生じていることが本研究により発見できたと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田畑貴久
2. 発表標題 ICU入室患者における抹消血Proinsulin陽性細胞定量の検討
3. 学会等名 第47回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2019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	松村 一弘  (Matsumua Kazuhiro)  (50378486)	滋賀医科大学・医学部・非常勤講師   (14202)	
研究分担者	藤野 和典  (Fujino Kazunori)  (70402716)	滋賀医科大学・医学部・講師   (14202)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------