

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K18350

研究課題名(和文)多臓器不全におけるサイトケラチン7(CK7)陽性細胞の役割の解明

研究課題名(英文)The role of cytokeratin 7 (CK7)-positive cells in multiple organ failure.

研究代表者

加藤 文崇 (Kato, Fumitaka)

滋賀医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：30837315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：多臓器不全は、生体にとり過大な侵襲によって生じる死亡率の高い難治性の病態である。申請者は、多臓器不全患者においてはサイトケラチン7(CK7)陽性の管腔形成が生じていることを見出し、この現象と多臓器不全と関係性につき調査を行った。ヒトの病理検体標本を用いて、肝臓、膵臓、腎臓におけるCK7陽性細胞を検討した所、多臓器不全患者においてはそのすべての臓器においてCK7陽性の管腔形成を認め、その数は患者の臓器不全数に応じて増加していることが明らかとなった。本研究の結果により、CK7陽性の管腔形成は、多臓器不全患者に出現する臓器を超えた変化であり、臓器機能不全に関連する可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多臓器不全とCK7陽性管腔形成との関連を調査し、肝臓、膵臓、腎臓における多臓器CK7陽性細胞、およびCK7陽性管腔構造形成が、今まで明らかとされていなかった多臓器に共通した多臓器不全発症のメカニズムとなる可能性が示唆された。この発見により肝不全、膵不全、腎不全の発症メカニズムの解明のみならず、CK7陽性細胞をターゲットにした新たな治療法開発の可能性が広がることが考えられる。そして今までいかなる治療法にても改善していなかった多臓器不全の予後を改善する可能性もあるのではないかと考えている。

研究成果の概要(英文)：Multiple organ dysfunction syndrome (MODS) is an intractable condition with a high mortality rate caused by excessive invasion of the body. The applicant found that cytokeratin 7 (CK7)-positive ductal formation occurs in patients with MODS and investigated the relationship between this phenomenon and multiple organ failure. Using human pathology specimens, we examined CK7-positive cells in the liver, pancreas, and kidney, and found that CK7-positive ductal formation was observed in all organs in patients with MODS, and that the number of CK7-positive cells increased with the number of organ failures in the patients. The results of this study suggest that CK7-positive ductal formation is a trans-organ change that appears in patients with MODS and may be related to organ dysfunction.

研究分野：敗血症

キーワード：敗血症

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、敗血症や重症外傷、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死亡率の高い難治性の病態である。現在までに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てきた。生理活性因子（酸化ストレス、DAMPs、PAMPs等）の増加により引き起こされる臓器細胞障害といった、細胞レベルの障害についての多くの仮説が提唱され、仮説に基づく治療法が試みられてきたが、未だ死亡率を劇的に下げようような有効な治療法の開発には至っていない。

申請者は、多臓器不全患者にて生じる直接ビリルビン優位の高ビリルビン血症に着目し研究を行ってきた。多臓器不全患者の病理検体標本を観察し、胆管上皮マーカーとされる抗CK7抗体にて免疫染色を行ったところ、多臓器不全患者においては、肝臓の門脈領域に、細胆管反応（Ductal reaction）と呼ばれる細胆管の増生、およびその周囲の線維化が認められることを観察した。さらに増生胆管内に胆汁の結晶である胆汁栓が多数存在することを見出した。胆汁栓の存在は、増生した細胆管が総胆管への交通を有していないことを示唆しており、直接ビリルビン優位の高ビリルビン血症の原因となりうると思われる。さらに、他の臓器（腎臓、膵臓）においてもCK7陽性の管腔を形成する細胞群が存在することを見出し、肝臓で観察された総胆管への交通を持たない細胆管と同様に、腎臓においては尿細管様の管腔が集合管への交通を持たず、膵臓においては膵管様の管腔が、主膵管への交通を持たず、周囲の線維化を誘導している可能性がある。

以上の予備的検討から、CK7陽性の管腔形成は多臓器にわたる共通の多臓器不全時の臓器構造の変化である可能性が高く、肝臓、腎臓、膵臓における臓器不全の原因となりうるとの仮説を考え本研究を立案するに至った。

2. 研究の目的

本研究では多臓器不全において、病理検体標本における各臓器におけるCK7陽性細胞の発現と多臓器不全の関係性について調査を行うことにより、CK7陽性細胞の多臓器不全への関与を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 病理検体標本におけるCK7陽性細胞の臓器発現の調査

1) 滋賀医科大学において死亡後24時間以内に病理解剖が行われた症例の肝臓、膵臓、腎臓の標本に対し、抗CK7抗体を用いた免疫染色（DAB-nickel法）を行い、CK7陽性細胞（CK7陽性管腔形成物）を染色した。染色されたCK7陽性細胞面積をImageJ Fiji softwareを用い計測し、肝臓においては染色されたCK7陽性管状構造物数と最終採血時の総ビリルビン値との相関関係を調査した。

2) 肝臓、膵臓のCK7陽性細胞の染色面積と死亡24時間前の臓器不全数との比較を行った。臓器不全の定義はSequential organ failure assessment score: SOFA scoreの臓器毎subscoreにおいて2点以上をその臓器の臓器不全とし、6つのsubscoreに対して臓器不全数を計測とした（最小0、最大6）。

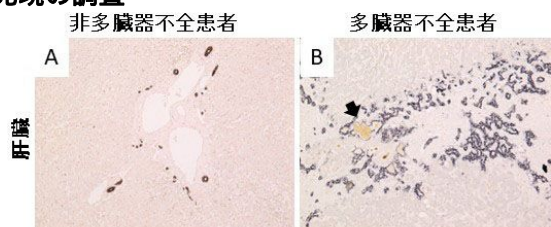
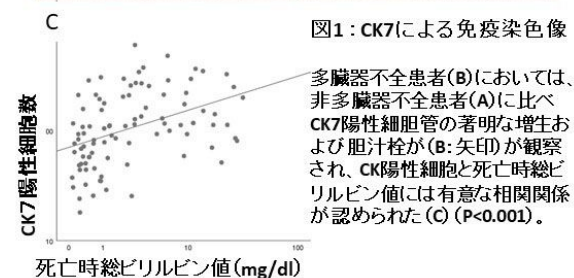


図1: CK7による免疫染色像



4. 研究成果

(1) 病理検体標本におけるCK7陽性細胞の臓器発現の調査

a) 肝臓におけるCK7陽性細胞の発現の調査

滋賀医科大学にて病理解剖が行われた症例において、肝臓におけるCK7陽性細胞の検討を行った。抗CK7抗体による免疫染色の結果、非多臓器不全患者においては、胆管などに染色されるのみであったが、多臓器不全患者においては、門脈領域に細胆管反応を多数認める傾向にあった（図1A, B）。次に病理検体113例のうち、肝硬変患者、標本不良（壊死等）15例を除いた98症

例を対象とし、肝臓標本に CK7 の免疫染色を行った。患者背景は年齢の中央値が 67 才、男性 60 例(61.2%)であり、担癌患者が 44 例(44.9%)であった。2 臓器不全以上を多臓器不全と考え、CK7 陽性細胞面積を比較したところ、非多臓器不全患者の中央値が 1% (Q1-Q3; 0.72 - 1.6)

であったのに対し、多臓器不全患者においては、2.35% (1.47 - 3.97) と増加していた (P<0.001)。さらにビリルビン値と CK7 陽性細胞面積との関係について調査を行ったところ、有意な正の相関関係が確認できた (p<0.001) (図 1C)。肝臓の臓器不全と CK7 陽性管状構造物とは密接な関係があることが示唆された。

b) 膵臓における CK7 陽性細胞の発現の調査

次に膵臓における CK7 陽性細胞の検討を行った。抗 CK7 抗体による免疫染色の結果、非多臓器不全患者においては、膵管に染色されるのみであったが、多臓器不全患者においては、肝臓にて認められたような細胆管反応様の多くの管状構造物を認めたを多数認める傾向にあった (図 2)。これらを細膵管反応と考え、肝臓と同様に定量化を試みた。病理検体 113 例のうち、急性膵炎患者、慢性膵炎患者、標本不良 (壊死等) 例を除いた 48 症例を対象とし、膵臓標本に CK7 の免疫染色を行った。患者背景は年齢の中央値が 65 才、男性 30 例(62.5%)であり、担癌患者が 21 例(43.7%)であった。2 臓器不全以上を多臓器不全と考え、CK7 陽性細胞面積を比較したところ、非多臓器不全患者の中央値が 3.65% (Q1-Q3; 2.93 - 4.60) であったのに対し、多臓器不全患者においては、6.48% (4.39 - 9.35) と増加していた (P=0.004) (表 2)。

c) 腎臓における CK7 陽性細胞の発現の調査

肝臓、膵臓と同様に腎臓においても CK7 陽性の検討を行った。多臓器不全患者において CK7 陽性の尿細管が増加する傾向が認められており、現在も検討を継続している状況である。

2) 肝臓、膵臓の CK7 陽性細胞の染色面積と死亡 24 時間前の臓器不全数との比較

CK7 陽性細胞管状構造物と多臓器不全の関係性をより明らかとするため、CK7 陽性細胞と臓器不全数との関係につき調査を行った。

肝臓、膵臓の両者において、CK7 陽性細胞面積と臓器不全数の間に正の相関関係を認めた。(図 3)

表1: 肝臓におけるCK7抗体による免疫染色を行った患者背景

	非多臓器不全患者	多臓器不全患者	P-Value
n	25	73	
Age	68.00 [57.00, 75.00]	67.00 [54.00, 78.00]	0.807
Sex (%)	19 (76.0)	41 (56.2)	0.098
BMI	20.69 [17.16, 23.52]	21.50 [18.47, 24.30]	0.364
SOFA score	2.00 [1.00, 4.00]	12.00 [9.00, 18.00]	<0.001
CRE (mg/dL)	1.07 [0.79, 1.79]	1.90 [1.06, 2.97]	0.008
TBIL (mg/dL)	0.39 [0.24, 0.63]	2.52 [0.80, 8.57]	<0.001
Platelets(μL)	170.00 [140.00, 241.50]	67.00 [33.00, 137.00]	<0.001
Number of organ failure	0.00 [0.00, 1.00]	4.00 [3.00, 6.00]	<0.001
CK7陽性細胞面積(%)	1.00 [0.72, 1.60]	2.35 [1.47, 3.97]	<0.001

多臓器不全患者(2臓器不全以上)においては、CK7陽性細胞面積が優位に多くなった

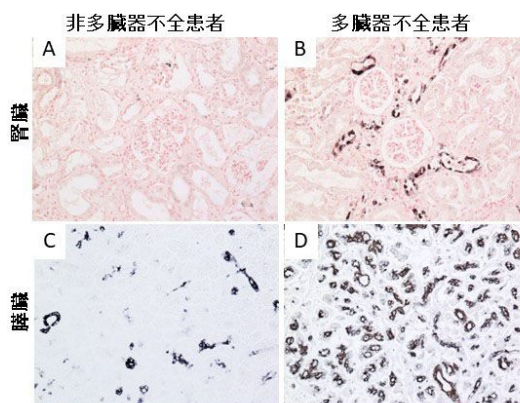


図2: 腎臓、膵臓における抗CK7抗体による免疫染色像
多臓器不全患者(B, D)においては、非多臓器不全患者(A, C)に比べCK7陽性の管腔様構造物が増加している。腎臓においては、CK7陽性尿細管様構造物が(B)、膵臓においてはCK7陽性膵管様構造物の増加が(D)観察される。

表2: 膵臓におけるCK7抗体による免疫染色を行った患者背景

	非多臓器不全患者	多臓器不全患者	P-Value
n	12	36	
Age	62.50 [49.25, 73.00]	68.00 [56.25, 80.00]	0.238
Sex (%)	10 (83.3)	20 (55.6)	0.167
BMI	20.75 [16.70, 23.12]	19.85 [16.86, 23.30]	0.924
SOFA score	2.00 [0.00, 4.00]	12.00 [8.75, 15.50]	<0.001
CRE (mg/dL)	1.00 [0.84, 1.79]	2.72 [0.77, 3.52]	0.038
TBIL (mg/dL)	0.40 [0.23, 0.62]	1.17 [0.52, 6.04]	0.005
Platelets(μL)	167.00 [110.75, 265.00]	74.00 [39.25, 160.00]	0.014
Number of organ failure	1.00 [0.00, 1.00]	4.00 [3.00, 5.00]	<0.001
CK7陽性細胞面積(%)	3.65 [2.93, 4.60]	6.48 [4.39, 9.35]	0.004

多臓器不全患者(2臓器不全以上)においては、CK7陽性細胞面積が優位に多くなった

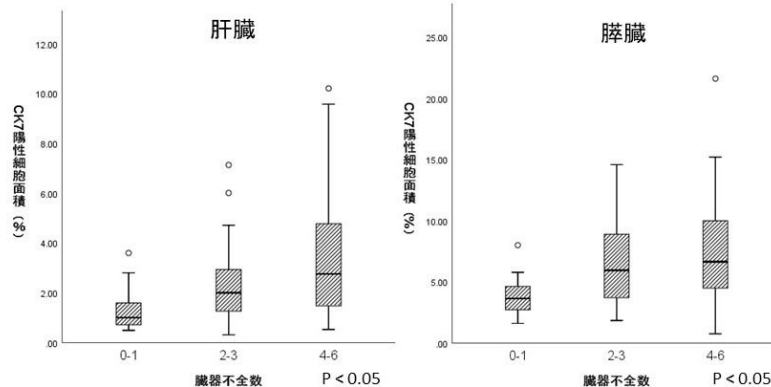


図3: 肝臓、膵臓におけるCK7陽性細胞面積と臓器不全数との関連
肝臓、膵臓の両者にて、病理検体標本におけるCK7陽性細胞面積と臓器不全数の間には正の相関関係があり、両者において統計学的有意であった。

3)まとめ

検討はまだ不十分ではあるが、これらの結果から考えると、臓器不全と CK7 陽性細胞の臓器発現には関連があり、多臓器の臓器不全に合併して生じることが明らかとなった。本申請の仮説である、CK7 陽性の管腔形成は多臓器にわたる共通の多臓器不全時の臓器構造の変化であり、肝臓、腎臓、膵臓における臓器不全の原因となりうるとの仮説を支持する結果が得られたと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤文崇
2. 発表標題 敗血症患者における血清ビリルビン値と予後の関係
3. 学会等名 第49回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤文崇
2. 発表標題 臓器不全患者における高ビリルビン血症と細胆管反応の関係
3. 学会等名 第46回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤文崇
2. 発表標題 CK7 陽性膵管様構造は臓器不全患者において増加する。(病理検体標本における検討)
3. 学会等名 第47回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------