

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592125

研究課題名(和文) 好中球の転写因子 C/EBP β に着目した敗血症性急性肺損傷の病態解析研究課題名(英文) Role of C/EBP β , a transcription factor in neutrophils, in the pathogenesis of septic acute lung injury

研究代表者

志馬 伸朗 (SHIME NOBUAKI)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：00260795

研究成果の概要(和文)：敗血症時の好中球の過剰産生における転写因子 C/EBP β の役割を解析した。敗血症時の好中球造血では C/EBP β の発現がすべての分化段階において上昇しており、これが敗血症時の好中球の造血亢進に関与していることが示唆された。敗血症性急性肺損傷病態における過剰な炎症反応の病態解明からその制御に繋がる新しい知見を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of C/EBP β in neutrophilia during sepsis. The expressions of C/EBP β were activated in all maturation steps from immature cells to mature neutrophils. These activated C/EBP β s might contribute to biphasic granulopoiesis during sepsis. These data may help to clarify the pathogenesis and possibility of therapeutic intervention for controlling systemic inflammation during sepsis-induced acute lung injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：集中治療医学

1. 研究開始当初の背景

敗血症性急性肺損傷は、救急・集中治療を受ける重症患者において頻発する致死的な臓器不全病態である。本病態には、微生物による感染症そのものを原因とした臓器障害に加えて、感染に対する宿主の免疫応答反応と、これにより惹起される局所及び全身性の炎症反応が関与している。炎症反応を適切に制御することで、病態の改善につながる可能性が指摘されてきたが、これまでに臨床的に有効性の確立された薬物的治療法は存在しないことは大きな問題となっていた。

感染ストレス病態における免疫反応の主体となるのは好中球である。好中球の動態に注目すると、その分化・成熟と増殖がいくつかの転写因子により巧妙に調節されていることが解明されてきた。特に転写因子 C/EBP β は感染時の好中球の造血亢進において重要な役割を果たすことが指摘されてきた。しかし、転写因子 C/EBP β が好中球造血のどの分化段階で作用するのかということや、好中球の機能の獲得にも関与するのかということについては、依然として未解明であった。このような背景から、転写因子 C/EBP β と感染症時の

好中球動態との関連性をさらに詳しく説明することで、感染病態での炎症反応、ひいては敗血症性急性肺損傷病態を制御する一つの介入手段につながるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

敗血症性急性肺損傷病態での好中球における転写因子 C/EBP \cdot の役割を評価すること

3. 研究の方法

まず、敗血症時の好中球の造血過程について詳細に検討を行うため、好中球の造血過程を5つの分化段階に分けて解析することができるフローサイトメトリーの染色法を考案した。この染色法の妥当性は、5つに分けられた各細胞集団の形態観察や顆粒タンパク質の発現で確認された。敗血症病態の観察のため、マウスを用いてカンジダ血症モデルを作成し、好中球造血が亢進する様子を分化段階別に調べた。具体的には、5つの細胞集団の細胞数の経時的变化、細胞周期の変化、mRNAレベルおよびタンパクレベルでの転写因子C/EBP \cdot の発現の変化を調べた。

次に、C/EBP \cdot の役割をさらに明確にするため、C/EBP \cdot のノックアウトマウス、及びノックアウトマウス由来の骨髓細胞を移植したマウスを用いた敗血症病態の検討に着手した。本実験は途中段階であるが、敗血症や敗血症性肺障害に対して C/EBP \cdot をターゲットにした治療法を考案過程において必要な研究であり、継続中である。

4. 研究成果

カンジダ血症モデルマウスを用いた好中球造血の細胞数の変化から、敗血症時に好中球造血が亢進する過程には1)前駆細胞レベルの未分化な細胞集団から徐々に分化した細胞が産生されるメカニズムと、2)骨髓球などのやや分化した細胞集団を起点に成熟好中球が迅速に供給されるメカニズムの2つがあり、2相性の造血亢進のメカニズムが存在することがわかった。

細胞周期解析では、敗血症時の好中球造血において、前駆細胞レベルの未分化な細胞集団のみならず、骨髓球などのやや分化した細胞集団でも細胞周期の活性化を認めた。これは、各々の細胞集団を起点に2相性の好中球の造血亢進が生じていることと矛盾しない結果であった。次に、敗血症時の好中球造血の亢進に、C/EBP \cdot がどの分化段階で関与しているかを調べた。造血過程全体において、mRNAレベルではC/EBP \cdot の発現の変化を認めなかったが、タンパクレベルではその発現は著明に上昇していた。これらの結果は、敗血症時には未分化一やや分化した細胞集団にC/EBP \cdot が作用し、細胞周期が活性化されることで好中球造血が亢進する可能性を示唆した。また

分化した細胞集団におけるC/EBP \cdot の発現上昇は、好中球機能の活性化に関与している可能性が考えられた。なお、mRNAの結果とタンパク質での結果の差から、急性期のC/EBP \cdot の発現は、転写よりもむしろ翻訳レベルで調節されていると考えられた。

以上の結果から、C/EBP \cdot は、敗血症時の好中球造血過程の全体を通して関与し、特に未分化な細胞集団では細胞周期の活性化を介して作用していると考えられた。この結果に基づき、C/EBP \cdot のノックアウトマウスを用い、C/EBP \cdot の機能解明に関するより詳細な検討を遂行中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① Mizuta M, Nakajima H, Mizuta N, Kitamura Y, Nakajima Y, Hashimoto S, Matsuyama H, Shime N, Amaya F, Koh H, Ishizaka A, Magae J, Tanuma SI, Hashimoto S. Fas ligand released by activated monocytes causes apoptosis of lung epithelial cells in human acute lung injury model in vitro. *Biol Pharm Bull* 31:386-90, 2008. (査読有)
- ② Sakaguchi M, Shime N, Fujita N, Fujiki S, Hashimoto S. Current problems in the diagnosis and treatment of hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia. *J Anesth.* 22(2):125-30, 2008. (査読有)
- ③ Hashimoto S, Okayama Y, Shime N, Kimura A, Funakoshi Y, Kawabata K, Ishizaka A, Amaya F. Neutrophil elastase activity in acute lung injury and respiratory distress syndrome. *Respirology* 13(4):581-4, 2008. (査読有)
- ④ Matsuyama H, Amaya F, Hashimoto S, Ueno H, Beppu S, Mizuta M, Shime N, Ishizaka A, Hashimoto S. Acute lung inflammation and ventilator-induced lung injury caused by ATP via the P2Y receptors: an experimental study. *Respir Res* 9:79, 2008. (査読有)
- ⑤ Kosaka T, Kokufu T, Shime N, Sugioka N, Kato R, Hamaoka K, Fujita N. Pharmacokinetics and tolerance of linezolid for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* mediastinitis in paediatric patients. *Int J Antimicrob Agents* 32(12):368-70, 2009. (査読有)
- ⑥ Umenai T, Shime N, Kato Y, Hashimoto S. Hyperventilation versus standard

- ventilation for infants in postoperative care for congenital heart defects with pulmonary hypertension. *J Anesth* 23(81):80-6, 2009. (査読有)
- ⑦ Kurihara Y, Shime N, Miyazaki T, Kato Y, Hashimoto S. Clinical and hemodynamic factors associated with the outcome of early extubation attempts after right heart bypass surgery. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 8(6):624-8, 2009. (査読有)
- ⑧ Saito T, Shime N, Itoh K, Fujita N, Saito Y, Shinozaki M, Shibuya K, Makimura K, Hashimoto S. Disseminated Aspergillosis Following Resolution of Pneumocystis Pneumonia with Sustained Elevation of Beta-Glucan in an Intensive Care Unit: a Case Report. *Infection* 37(6):547-50, 2009. (査読有)
- ⑨ Umenai T, Hirai H, Shime N, Nakaya T, Asahara T, Nomoto K, Kita M, Tanaka Y, Imanishi J. Eradication of the commensal intestinal microflora by oral antimicrobials interferes with the host response to lipopolysaccharide. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29(6):633-41, 2010. PMID: 20300949. (査読有)
- ⑩ Shime N, Kosaka T, Fujita N. The importance of a judicious and early empiric choice of antimicrobial for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29(12):1475-9, 2010. PubMed PMID: 20711623. (査読有)
- ⑪ Kamio N, Hirai H, Ashihara E, Tenen DG, Maekawa T, Imanishi J: Use of bicistronic vectors in combination with flow cytometry to screen for effective small interfering RNA target sequences. *Biochem Biophys Res Commun* 393: 498-503, 2010. (査読有)
- ⑫ Guibal FC, Alberich-Jorda M, Hirai H, Ebralidze A, Levantini E, Di Ruscio A, Zhang P, Santana-Lemos BA, Neuberg D, Wagers AJ, Rego EM, Tenen DG: Identification of a myeloid committed progenitor as the cancer initiating cell in acute promyelocytic leukemia. *Blood*.114(27): 5415-5425, 2009. (査読有)
- ⑬ Okamoto M, Hirai H, Taniguchi K, Shimura K, Inaba T, Shimazaki C, Taniwaki M, Imanishi J: Toll-like receptors (TLRs) are expressed by myeloid leukaemia cell lines, but fail to trigger differentiation in response to the respective TLR ligands. *Br J Haematol*, 147(4):585-587. 2009. (査読有)
- ⑭ 平位秀世:C/EBPファミリー転写因子による好中球産生の制御機構. *医学のあゆみ TOPICS*, 23 (12) : 1199-1200, 2009. (査読無)
- [学会発表] (計 10 件)
- ① Umenai T, Hirai H, Shime N, Nakaya T, Tanaka Y, Imanishi J. Sweep of the intestinal microflora induced by oral administration of antibiotics impairs host response to LPS through down-regulation of the surface Toll-like receptors expressions on the peritoneal macrophages. The 49 th. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2009. 9. 12 ; San Francisco.
- ② Shime N, Satake S, Hosokawa K, Hashimoto S. Performance of evidence-based preventive measures for ventilator-associated pneumonia in Japanese healthcare settings. The 10th. joint scientific congress of the Korean society of critical care medicine and Japanese society of intensive care medicine. 2010. 3. 6 ; Hiroshima.
- ③ Shime N. Ventilator-associated pneumonia. The 9th. joint scientific congress of the Korean society of critical care medicine and Japanese society of intensive care medicine, Seoul, 2009. 4. 25.
- ④ Satake S, Hirai H, Shime N, Nagao R, Tanaka R, Yao H, Hayashi Y, Ashihara E, Inaba T, Fujita N, Imanishi J, Maekawa T. Candidemia-Induced Emergency Granulopoiesis Consist of Successive Dual Waves Triggered by the Shift from C/EBPalpha Dependency to C/EBPbeta Dependency. 52st ASH ANNUAL MEETING AND EXPOSITION, ORLAND, 2010. 12. 6.
- ⑤ 佐竹早紀子, 平位秀世, 志馬伸朗, 長尾里奈, 田中瑠璃子, 八尾尚幸, 林嘉宏, 武内美紀, 芦原英司, 稲葉亨, 藤田直久, 今西二郎, 前川平. 敗血症による2相性“緊急”好中球造血のフローサイトメトリーによる解析. 第 72 回日本血液学会学術集会, 横浜, 2010. 9. 24.
- ⑥ 佐竹早紀子, 平位秀世, 志馬伸朗, 芦原英司, 稲葉亨, 藤田直久, 今西二郎, 前川平. 敗血症時の好中球造血における転写因子 C/EBP・の機能解析. 第 84 回日本感染症学会総会, 京都, 2010. 4. 6.
- ⑦ 藤木早紀子, 平位秀世, 志馬伸朗, 稲葉亨, 藤田直久, 今西二郎. フローサイトメータ

一を用いた敗血症における顆粒球造血過程の検討. 第83回日本感染症学会総会, 東京, 2009. 4. 24.

- ⑧ Hirai H, Kamio N, Matsusue A, Ogino S, Kimura N, Satake S, Tanaka R, Nagao R, Yao H, Hayashi Y, Takeuchi M, Ashihara E, Huang G, Tenen DG, Imanishi J, Maekawa T: 「骨髄系細胞の分化と機能制御」 「緊急」顆粒球造血時の C/EBP β の制御における CREB ファミリー転写因子. 第 72 回日本血液学会学術集会, 横浜, 2010. 9. 24
- ⑨ Hirai H, Kamio N, Matsusue A, Ogino S, Kimura N, Satake S, Ashihara E, Maekawa T, Tenen DG, Imanishi J: CREB Is Involved in the Regulation of C/EBP β ; During 'emergency' Granulopoiesis. The American Society of Hematology 51st Annual Meeting and Exposition, New Orleans, 2009. 12. 5
- ⑩ Hirai H: Involvement of CREB in the regulation of "emergency" granulopoiesis through upregulation of C/EBP Kyoto University Global COE "Center for Frontier Medicine" International Symposium/Retreat2009. Hyogo, 2009. 11. 7

[図書] (計 1 件)

- ① 志馬伸朗(編著). 人工呼吸器関連肺炎のすべて. 東京: 南江堂, 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

志馬 伸朗 (SHIME NOBUAKI)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号: 00260795

(2) 研究分担者

平位 秀世 (HIRAI HIDEYO)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号: 50315933