

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592301

研究課題名（和文） 敗血症病態におけるサイトカインのバランス解析と遺伝子治療の確立

研究課題名（英文） Establishment of cytokines-balance analysis and gene therapy in septic condition

研究代表者

澤村 淳（サワムラ アツシ）

北海道大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：00241448

研究成果の概要（和文）：

1. TNF- α 欠損におけるサイトカイン産生TNF- α KO では Wild type マウスに比し 0ng/ml, 0.1ng/ml, 1ng/ml で明らかに減少を示した。2. TNF- α 及び IL-6 の中和の検討(1) TNF- α 濃度はコントロールに比べ、mAb IL-6 では約半減値を示した。mAb TNF- α 添加と rIL6+rTNF- α を添加では有意な減少が認められた。(2) IL-6 濃度はコントロールに比して、mAb TNF- α 添加では約 2 割を示した。mAb IL-6 添加では更に半減を示した。rIL6+rTNF- α を添加では有意な減少が認められた。3. Western Blotting による STAT3 活性は Wild Type に比較し、TNF- α KO で有意に陽性となった。rIL6 添加した STAT3 活性は Wild Type も TNF- α KO でも陰性となった。SOCS3 活性は Wild Type も TNF- α KO でも陰性となった。rIL6 添加した SOCS3 活性は Wild Type も TNF- α KO でも陰性となった。

研究成果の概要（英文）：

1. Cytokine production in TNF- α deficiencyIn TNF- α KO, an appreciable decline was observed at 0ng/ml, 0.1ng/ml, and 1ng/ml compared to wild type mice.2. Investigation into the neutralization of TNF- α and IL-6(1) TNF- α concentration exhibited a decline to approximately half the value at mAb IL-6 compared to the control. A significant decline was observed with the addition of mAb TNF- α and rIL6+rTNF- α . (2) IL-6 concentration exhibited approximately 20% with the addition of mAb TNF- α compared to the control. A further decline by half was exhibited with the addition of mAb IL-6. A significant decline was observed with the addition of rIL6+rTNF- α .3. STAT3 activation due to Western Blotting was significantly positive regarding TNF- α KO compared to the Wild Type. STAT3 activation with the addition of rIL6 was negative regarding both Wild Type and TNF- α KO. SOCS3 activation was negative regarding both Wild Type and TNF- α KO. SOCS3 activation with the addition of rIL6 was negative regarding both Wild Type and TNF- α KO.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	0	0	0
2013年度	0	0	0
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：敗血症病態、TNF- α 、IL-6、TNF- α KO、Western Blotting

1. 研究開始当初の背景

敗血症(Sepsis)は国際的に年々増加傾向にあり、その治療に決定的なものはない。

2. 研究の目的

Sepsis において有効な感染防御反応を誘導するには、感染初期に産生された炎症性サイトカインと抗炎症性サイトカインのバランスの制御機構の解明が非常に重要である。IL-6 KO マウスを用いて Sepsis における STAT3 および SOCS3 発現を検討することにより TNF- α /IL-6 バランスを検討し、Sepsis を制御する機構を解明することにより、治療へ発展させ、Sepsis を抑止することを目的とする。

3. 研究の方法

研究には C57BL/6 マウス (Wild Type)、TNF- α KO マウス (いずれも 8-12 週齢) を用いる。TNF- α KO マウスより採取した腹腔マクロファージおよび骨髄樹状細胞に rTNF- α を 0, 0.1, 1, 10, 100ng/ml 投与しさらに 2 時間後 LPS 1 μ g/ml 投与、24 時間後に ELISA 法で IL-6 の濃度を検討する。Wild Type より採取した腹腔マクロファージおよび骨髄樹状細胞を投与なし、コントロール IgG, mAb TNF- α 10 μ g と mAb IL-6 を 10 μ g ずつ投与した 3 群に LPS 1 μ g/ml 投与し、TNF- α は 12 時間後、IL-6 は 24 時間後に濃度を検討する。さらに敗血症病態における STAT3 と SOCS3 の活性化の検討を行う。

4. 研究成果

まず、骨髄樹状細胞に関する基礎実験を行い、以下の治験を得た。

- ・ 精製した DC は purity 90.72% とまずまずであった。
- ・ 回収直後の DC (immature DC) は、副刺激分子・MHC クラス II 分子ともほとんど発現を認めていない。
- ・ LPS 1.0 μ g/ml 刺激により、CD40・CD86・I-Ab (MHC クラス II) とともに 12 時間~24 時間にかけて 発現の peak を認めた。

そこで敗血症病態における TNF- α /IL-6 バランスの検討として、以下の項目を検討した。

1. TNF- α 欠損における IL-6 産生に与える影響の検討

(1) TNF- α KO マウスから採取した骨髄樹状細胞に LPS 1 μ g/ml 投与し 0, 6, 10, 24, 48 時間毎に TNF- α 、IL-6 の濃度を検討した。

① TNF- α

TNF- α は 12hr をピークに約 7200 pg/ml と推移し、48hr では約 2500pg/ml を認めた。

② IL-6

IL-6 は 12hrs で 100000 pg/ml と右肩上がりに増加したが、48hr で 120000 pg/ml と推移し増加率が減少したが、peek out を認めなかった。

(2) TNF- α KO マウスおよび Wild Type より採取した骨髄樹状細胞に LPS 1 μ g/ml 投与し 0, 6, 10, 24, 48 時間毎に TNF- α 濃度を検討した。

TNF- α KO (Knock out) マウスでは LPS 1 μ g/ml 投与しても 6hr で 136 pg/ml と検出されているが、それ以外ではほとんど反応がなかった。Wild type (WT) マウスでは 0hr ではほぼ 0pg/ml であったが、12hr で 5558 pg/ml をピークに 48hrs では 2993 pg/ml と推移した。

(3) TNF- α KO マウスより採取した骨髄樹状細胞に rTNF- α を 0, 0.1, 1, 10, 100ng/ml 投与しさらに 2 時間後 LPS 1 μ g/ml 投与、24 時間後に ELISA 法で TNF- α の濃度を検討した。

TNF- α に関しては、Wild type マウスでは濃度非依存性に 13731 pg/ml (0ng/ml), 20055 pg/ml (100ng/ml) 増加傾向を示したが、TNF- α KO (Knock out) マウスではほぼ濃度依存性に推移し、25 (0 ng/ml), 133 (0.1 ng/ml), 2169 (1 ng/ml), 7283 (10ng/ml), 21489 (100 ng/ml) を示し、Wild type マウスに比べて TNF- α KO (Knock out) マウスでは 0ng/ml, 0.1 ng/ml, 1 ng/ml で明らかに減少を示した。

2. TNF- α および IL-6 の中和の TNF- α 、IL-6 産生に与える影響の検討

Wild Type より採取した腹腔マクロファージおよび骨髄樹状細胞を投与なし、コントロール IgG, mAb TNF- α 10 μ g と mAb IL-6 を 10 μ g ずつ投与した 3 群に LPS 1 μ g/ml 投与し、TNF- α は 12 時間後、IL-6 は 24 時間後に濃度を検討した。

(1) TNF- α

TNF- α 濃度は投与なしが 6158 pg/ml (12hrs), 2302 pg/ml (24hrs)、コントロール IgG 添加が 4085 pg/ml (12hrs), 3731 pg/ml (24hrs)

であったのに対して、mAb IL-6 を添加したものは 499 pg/ml (12hrs), 1478 pg/ml (24hrs)を示した。また、mAb TNF- α 添加したものは 314 pg/ml (12hrs), 296 pg/ml (24hrs)と更に低値を示した。最後に rIL6+rTNF- α を添加したものは 243 pg/ml (12hrs), 242 pg/ml (24hrs)とコントロールと比較し TNF- α 発現の有意な減少が認められた。

(2)IL-6

IL-6 濃度は投与なしが 89693 pg/ml (12hrs), 60200 pg/ml (24hrs)、コントロール IgG 添加が 91760 pg/ml (12hrs), 113440 pg/ml (24hrs)であったのに対して、mAb TNF- α を添加したものは 14570 pg/ml (12hrs), 17575 pg/ml (24hrs)を示した。また、mAb IL-6 を添加したものは 7135 pg/ml (12hrs), 7710 pg/ml (24hrs)と更に低値を示した。最後に rIL6+rTNF- α を添加したものは 6110 pg/ml (12hrs), 7005 pg/ml (24hrs)とコントロールと比較し IL-6 発現の有意な減少が認められた。

3. Western Blotting により敗血症病態における STAT3 と SOCS3 の活性化の検討を行った。

Wild Type, TNF- α KO マウスより採取した骨髄樹状細胞に rTNF- α を 1 μ g 投与したものにそれぞれ Western Blotting により STAT3 を検討した。

結果は STAT3 活性は Wild Type に比較し、有意に TNF- α KO マウスより採取した骨髄樹状細胞で陽性となった。

また、Wild Type, TNF- α KO マウスより採取した骨髄樹状細胞に rIL6 を 1 μ g 投与したものにそれぞれ Western Blotting により STAT3 を検討した。

結果は STAT3 活性は Wild Type も TNF- α KO マウスより採取した骨髄樹状細胞でも陰性となった。

Wild Type, TNF- α KO マウスより採取した骨髄樹状細胞に rTNF- α を 1 μ g 投与したものにそれぞれ Western Blotting により SOCS3 を検討した。

結果は SOCS3 活性は Wild Type も TNF- α KO マウスより採取した骨髄樹状細胞でも陰性となった。

また、Wild Type, TNF- α KO マウスより採取した骨髄樹状細胞に rIL6 を 1 μ g 投与したものにそれぞれ Western Blotting により SOCS3 を検討した。

結果は SOCS3 活性は Wild Type も TNF- α KO マウスより採取した骨髄樹状細胞でも陰性となった。

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 3 2 件)

1. 敗血症における凝固異常・血管内皮傷害 (特集 救急医療領域における感染症) -- (敗血症)

Coagulation disturbance and endothelial cell injury in sepsis

丸藤 哲, 澤村 淳, 早川 峰司、他

救急医学 31(10), 1326-1334, 2007-09

2. 症例から学ぶ小児救急疾一外傷；鈍外傷による気管裂傷。

澤村 淳. 小児外科 2009;41: 551-554.

3. 救急集中治療領域における血小板・凝固線溶系モニタリングの実際。

丸藤 哲, 澤村 淳, 早川 峰司、久保田 信彦、平安山 直美、菅野 正寛、和田 剛志、方波 見 謙一

日本救急医学会雑誌 2009;20: 1-15.

4. III代謝・体液系モニタリング 凝固線溶系。

丸藤 哲, 澤村 淳, 早川 峰司、久保田 信彦、平安山 直美、菅野 正寛、和田 剛志、方波 見 謙一。

救急医学 2009 ;33: 311-315.

5. 敗血症治療における生理的抗凝固物質の役割. 血液フロンティア

丸藤 哲, 澤村 淳, 早川 峰司

特集・トロンボモデュリンとプロテインCの新展開. 2009;19: 751-759.

6. 心膜腔穿刺法、心膜切開法. 山口徹編. 今日の治療指針.

澤村 淳.

東京: 医学書院 2010. pp103-105.

7. 外傷急性期の血液凝固線溶系一現在の世界的論点を整理する

丸藤 哲, 澤村 淳, 早川峰司、菅野 正寛、

久保田 信彦、上垣慎二、平安山直美.

日本救急医学会雑誌 2010;21: 765-778.

8. 急性期 DIC 診断基準の特徴と今後の展望.

丸藤 哲, 澤村 淳, 早川峰司.

日本血栓止血学会誌 2010;21: 588-594.

9. 救急・集中治療領域における真菌分離頻度と薬剤感受性からみた真菌感染症対策.

澤村 淳, 菅野 正寛、久保田 信彦、上垣慎二、早川 峰司、丸藤 哲.

救急医学 2010;34:1719-1722.

10. 鈍的外傷患者における FDP

(fibrin/fibrinogen degradation products)

高値と大量出血の関連性.

早川峰司、和田剛志、菅野正寛、下嶋秀和、

上垣慎二、澤村 淳、丸藤 哲、
日本救急医学会雑誌 2010;21:165-719.

11. 敗血症が発症に関与したと考えられた生体肝移植術後 posterior reversible encephalopathy syndrome (PRES) の3症例
Posterior reversible encephalopathy syndrome presenting after a liver transplantation : a report of three Cases
澤村 淳、久保田 信彦、上垣 慎二、早川 峰司、鈴木 友巳、嶋村 剛、丸藤 哲
日本救急医学会雑誌 22(7), 337-343, 2011-07-15

12. 特集・ショックの病態と治療Ⅲ
症例から学ぶショック治療の実際
ショックに合併した DIC 管理の実際－DIC の診断と治療・治療効果判定
澤村 淳、菅野 正寛、久保田 信彦、上垣 慎二、早川 峰司、丸藤 哲
救急医学 2011;35: 482-490.

13. 特集 血栓・塞栓
I 総論 4. 血栓・塞栓の治療
澤村 淳、菅野 正寛、久保田 信彦、上垣 慎二、早川 峰司、丸藤 哲
救急医学 2011;35: 1768-1772.

14. 播種性血管内凝固症候群 (DIC).
丸藤 哲、澤村 淳、早川 峰司、上垣 慎二、久保田 信彦、菅野 正寛、平安山 直美、向井 信貴、三浪陽介
救急・集中治療 2011;23:53-64.

15. I 侵襲に対する生体反応
感染性・非感染性生体
丸藤 哲、澤村 淳、早川 峰司、菅野 正寛、上垣 慎二、久保田 信彦、向井 信貴、山本 浩
侵襲と生体反応救急医 2011;35: 747-752

16. 特集・変貌する DIC の診断と治療
炎症と凝固線溶反応－TAFI と補体活性化－
丸藤 哲、澤村 淳、早川 峰司、菅野 正寛、上垣 慎二、久保田 信彦
Thrombosis Medicine 2011;1: 21-26.

17. 特集:外傷(頭部・胸腹部・四肢・骨盤)と感染 総説 外傷と局所・全身反応
丸藤 哲、澤村 淳、早川 峰司、菅野 正寛、上垣 慎二、久保田 信彦、向井 信貴、山本浩
日本外科感染症学会雑誌 2011;8:297-305.

18. 特集:凝固炎症反応連関から見た敗血症の病態と治療 TAFI を介した凝固炎症反応と OPTIMIST.
丸藤 哲、澤村 淳、早川 峰司、久保田 信彦、上垣 慎二、菅野 正寛、向井 信貴
本間 多恵子
Thrombosis Medicine 2011;1:151-156

19. 輸血関連急性肺傷害 (TRALI) の診断と

治療指針.
澤村 淳
救急・集中治療ガイドライン 2012-13. 東京: 総合医学社; 2012. pp194-195.

20. Expression of 4 protease-activated receptors is associated with increased levels of TNF-alpha, tissue factor, and fibrin in the frontal cortex of endotoxemic rat.
Jesmin S, Gando S, Zaedi S, Sawamura A.
Thromb Res 2009;124: 498-501.

21. Effects of antithrombin in patients with disseminated intravascular coagulation diagnosed by newly developed diagnostic criteria for critical illness.
Sawamura A, Gando S, Hayakawa H, Hoshino H, Kubota N, Sugano M.
Clin Appl Thromb Hemost 2009;15: 561-566.

22. Disseminated intravascular coagulation with a fibrinolytic phenotype at an early phase of trauma predicts mortality.
Sawamura A, Hayakawa M, Gando S, Kubota N, Sugano M, Wada T, Katabami K
Thromb Res 2009;124: 608-613.

23. Application of the Japanese Association for Acute Medicine disseminated intravascular coagulation diagnostic criteria for patients at an early phase of trauma.
Sawamura A, Hayakawa H, Gando S, Hoshino H, Kubota N, Henzan N, Sugano M.
Thromb Res 2009;124: 706-710.

24. Protease-activated receptor2 blocking peptide counteracts endotoxin-induced inflammation and coagulation and ameliorates renal fibrin deposition in a rat model of acute renal failure.
Jesmin S, Gando S, Zaedi S, Prodhon SH, Sawamura A, Miyauchi T, Hiroe M, Yamaguchi N.
SHOCK 2009;32: 626-632.

25. Sivelestat (selective neutrophil elastase inhibitor) improves the mortality rate of sepsis associated with both acute respiratory distress syndrome and disseminated intravascular coagulation patients. Hayakawa M, Katabami K, Wada T, Sugano M, Hoshino H, Sawamura A, Gando S SHOCK 2010;33: 14-18.

26. Imbalance between macrophage migration inhibitory factor and cortisol induces multiple organ dysfunction in patients with blunt trauma. Inflammation Hayakawa M, Katabami K, Wada T, Sugano M, Hoshino H, Sawamura A, Gando S. 2010;34: 193- 197.

27. Efficacy of Ciprofloxacin as an

anti-inflammatory agent in patients with sepsis. Sawamura A, Hayakawa M, Sugano M, Henzan N, Kubota N, Uegaki S, Gando S. J Jpn Surg Infec 2011;8:679-685.

28. Disseminated intravascular coagulation at an early phase of trauma is associated with consumption coagulopathy and excessive fibrinolysis both and neutrophil elastase Hayakawa M, Sawamura A, Gando S, Kubota N, Uegaki S, Shimojima H, Sugano M, Ieko M. Surgery 2011;23: 221-230.

29 . Dramatic changes of the gut flora immediately after severe and sudden insults. Hayakawa M, Asahara T, Henzan N, Murakami H, Yamamoto H, Mukai N, Minami Y, Sugano M, Kubota N, Uegaki S, Kamoshida H, Sawamura A, Nomoto K, Gando S. Dig Dis Sci 2011;56: 2361-2365.

30 . Time-dependent expression of endothelin-1 in lungs and the effects of TNF- α blocking peptide on acute lung injury in an endotoxemic rat model. Jesmin S, Yamaguchi N, Zaedi S, Nusrat Sultana S, Iwashima Y, Sawamura A, Gando S. Biomed Res 2011;32: 9-17.

31 . Trauma, shock, and disseminated intravascular coagulation: lessons from the classical literature. Gando S, Sawamura A, Hayakawa M. Ann Surg 2011;254: 10-19.

32. Low TAFI activity and insufficient activation of fibrinolysis by both plasmin and neutrophil elastase promote organ dysfunction in disseminated intravascular coagulation associated with sepsis. Hayakawa M, Sawamura A, Gando S, Jesmin S, Naito S, Ieko M. Thromb. Res 2012 (in press)

[学会発表] (計 15 件)

1. 生体肝移植術後に出現した posterior reversible encephalopathy syndrome (PRES) の二症例
澤村 淳、方波見謙一、三浪陽介、和田剛志、菅野正寛、下嶋秀和、上垣 慎二、久保田 信彦、早川 峰司、丸藤 哲
第 37 回日本救急医学会総会・学術集会
2009 年 10 月 盛岡
2. 外傷急性期患者における急性 期 DIC 診断基準の評価
澤村淳、丸藤哲、早川峰司
第 33 回日本血栓止血学会学術集会 2010 年 4 月 鹿児島
3. Disseminated intravascular coagulation

at an early phase of trauma.

In 15th International Meeting Danubian Sawamura A, Gando S, Hayakawa M, Hoshino H, Kubota N, Henzan N, Sugano M , Wada T, Katabami K.

League Against Thrombosis and Hemorrhagic Disorders:

2009 May 14th -16th: Beograd, Republic of Serbia

4. Application of the Japanese Association for Acute Medicine disseminated intravascular coagulation diagnostic criteria for patients at an early phase of trauma.

In 22th European Society of Intensive Care Sawamura A, Hayakawa H, Gando S,

Hoshino H, Kubota N, Henzan N, Sugano M. Medicine Annual Congress:

2009 Oct 12nd: Vienna, Republic of Austria

5. Fibrinogenolysis during the early stage of trauma predicts the occurrence of massive bleeding in patients with blunt trauma.

Hayakawa H, Wada T, Sugano M, Kubota N, Sawamura A, Gando S.

In 22th European Society of Intensive Care Medicine Annual Congress:

2009 Oct 12nd: Vienna, Republic of Austria

6. Disseminated intravascular coagulation with a fibrinolytic phenotype modified through fibrinogenolysis at an early phase of trauma predicts mortality.

In:22th Congress International Society on Thrombosis and Haemostasis:

Gando S, Sawamura A, Hayakawa M, Kubota N, Sugano M , Wada T, Katabami K.

2009 Jul 15th: Boston, U.S.A.

7 . DIC at an early phase of trauma is associated with consumption coagulopathy and excessive fibrinolysis both by plasmin and neutrophil elastase, and continues to DIC at late phase of trauma.

In:21st International Thrombosis Congress:

Gando S, Hayakawa H, Sawamura A, Kubota N, Uegaki S, Sugano M.

2010 Jul 6th -9th: Milan, Italy

8. The effects of recombinant human soluble thrombomodulin in the experimental endotoxemic mouse induced by lipopolysaccharide.

In 23rd European Society of Intensive Care Medicine Annual Congress:

Sawamura A, Hayakawa H, Gando S, Kubota N, Uegaki S, Sugano M.

2010 Oct 11st: Barcelona, Spain

9. Dramatic changes in the gut flora in critical illness immediately after severe insult.

In 23rd European Society of Intensive Care Medicine Annual Congress:

Hayakawa H, Asahara T, Henzan N, Murakami H, Yamamoto H, Mukai N, Minami Y, Sugano M, Kubota N, Uegaki S, Kamoshida H, Sawamura A, Nomoto K, Gando S.

2010 Oct 13rd: Barcelona, Spain

10. Disseminated intravascular coagulation at an early phase of trauma continuously proceeds to DIC at a phase of trauma.

In 6th Congress of Asia Pacific society on Thrombosis and Hemostasis:

Murakami H, Gando S, Hayakawa M, Sawamura A, Kubota N, Uegaki S, Sugano M, Mukai N.

2010 Oct 13th -16th: Bali, Republic of Indonesia

11. Disseminated intravascular coagulation at an early phase of trauma is associated with consumption coagulopathy and excessive fibrinolysis both by plasmin and neutrophil elastase.

In Chest 2010

Sawamura A, Gando S, Hayakawa M, Kubota N, Uegaki S, Sugano M.

2010 Nov 2nd: Vancouver, Canada

12. coagulation at an early phase of trauma continuously proceeds to DIC at a late phase of trauma.

In International Critical Care Congress 2011:

Gando S, Hayakawa M, Sawamura A, Kubota N, Uegaki S, Sugano M.

2011 Feb 16th-21st: New Delhi, India

13. Thrombin-activated fibrinolysis inhibitor and organ dysfunction in DIC associated with sepsis.

In Sepsis 2011: 2011 Oct

Hayakawa M, Sawamura A, Sugano M, Uegaki S, Kubota N, Gando S, Jesmin S.

27th: Beijing, People's Republic of China

14. Jesmin S. Low TAFI activity promotes organ dysfunction and poor progress in DIC associated with sepsis.

In Chest 2011:

Gando S, Sawamura A, Hayakawa M, Sugano M, Uegaki S, Kubota N, Jesmin S.

2011 Oct 25th: Honolulu, U.S.A.

15. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human soluble thrombomodulin in DIC patients with severe renal impairment.

In 24th European Society of Intensive Care Medicine Annual Congress:

Hayakawa M, Homma T, Yamamoto H, Mukai N, Sugano M, Uegaki S, Kubota N, Sawamura A, Gando S.

2011 Oct 13rd-17th: Berlin, Federal Republic of Germany

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤村 淳 (サワムラ アツシ)

北海道大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：00241448

(2) 研究分担者

丸藤 哲 (ガンドウ サトシ)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30125306

(3) 連携研究者

()

研究者番号：