

令和 6 年 5 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09008

研究課題名(和文) CyTOFを用いた集中治療後症候群の病態解明と予防法開発に向けた基盤研究

研究課題名(英文) Fundamental Research to Elucidate the Pathophysiology of Post-Intensive Care Syndrome using CyTOF and to Develop Preventive Methods

研究代表者

前川 邦彦 (Maekawa, Kunihiro)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：50439189

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)：マウスに敗血症を誘導したあと2か月生存したマウスをPICSモデルとし、second hitとしてリポポリサッカライドを投与した。

研究前の予想に反して、PICS-second hitマウスは全例生存した。敗血症は盲腸結紮穿孔(CLP)、糞便腹腔内投与(FSI)モデルの2種類を用いたが、2つのモデル間で病理学的評価において臓器障害の程度の差が確認された。新規免疫学解析ツールの一つLUMINEXを用いたサイトカインの網羅的解析では、PICS後second hitにおいて炎症性/抗炎症性サイトカインの血中レベルが総じて低下していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

救命に重きが置かれてきた集中治療室での治療中あるいは退室後に生じる運動機能障害、認知機能障害、精神障害で長期予後に影響を与える病態と定義される集中治療後症候群(Post Intensive Care Syndrome: PICS)は近年集中治療領域で注目を集める重要な概念であるが、その病態生理は明らかになっていなかった。本研究ではPICSに生じている臓器障害を病理学的に評価したのみならず、新規免疫学解析ツールであるLUMINEXを用いてPICS病態におけるサイトカインの網羅的解析を行った。

本研究はPICS病態の解明とその予防法・治療法開発に向けた重要なエビデンス創出に寄与したと考えている。

研究成果の概要(英文)：After inducing sepsis in mice and allowing a 2-month survival period, these mice were considered as the PICS model. Subsequently, lipopolysaccharide (LPS) was administered as a second hit. Contrary to our initial expectations, all PICS-second hit mice survived. Sepsis was induced using two models: cecal ligation and puncture (CLP) and feces intraperitoneal injection (FSI), revealing differences in the severity of organ dysfunction between the two models upon pathological evaluation. Utilizing the novel immunological analysis tool LUMINEX for comprehensive cytokine analysis, The levels of inflammatory/anti-inflammatory cytokines in the bloodstream were generally decreased in PICS after the second hit.

研究分野：救急/集中治療医学、特に敗血症や外傷、心停止/蘇生をはじめとする生体侵襲に対する生体反応の病態解明

キーワード：集中治療後症候群 臓器障害 サイトカイン LUMINEX

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

今から50年以上前に誕生した集中治療室(Intensive Care Unit: ICU)は生死の境をさまよう重症患者を救命し短期死亡率を減らすことに重きが置かれてきた。実際に重症疾患病態の解明や治療法の進歩により集中治療室での重症患者の救命率は著しく向上してきたが、その一方で重症患者の救命が達成されるようになってきたが故に、ICU生存者は良好な長期的予後を有するのか、またその予後はICUでの治療から得られる最良の結果なのか、などの疑問が生じてきた。このような背景のもと、「ICU在室中あるいは退室後に生じる運動機能障害、認知機能障害、精神障害で長期予後に影響を与える病態」と定義される集中治療後症候群(Post Intensive Care Syndrome: PICS)の概念が提唱された。ICU入室の契機となる侵襲に伴い、炎症性サイトカインの過剰産生に起因する全身性炎症反応症候群(Systemic Inflammatory Response Syndrome: SIRS)と代償性抗炎症反応症候群(Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome: CARS)のパラダイムの概念が広く浸透しているが(図1)、PICSは亜急性期以降に生じる免疫機能不全あるいは免疫応答に伴う炎症反応の長期化、タンパク異化亢進と栄養障害など複数の病態が関与する症候として、より病態に直結した“Persistent Inflammation, Immunosuppression, Catabolism Syndrome”と呼称されるようになった。しかしその研究は発展途上であり、病態の解明および治療法の開発へは前程万里の状態である。

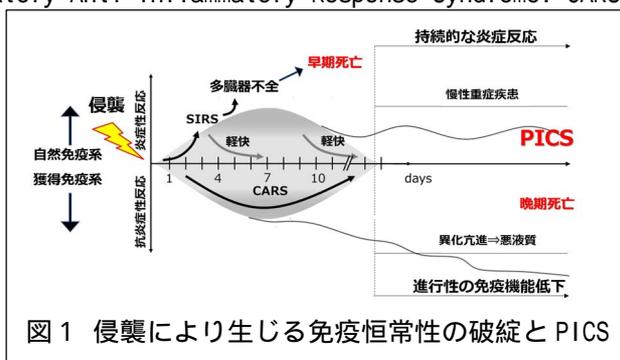


図1 侵襲により生じる免疫恒常性の破綻とPICS

2. 研究の目的

LUMINEXをはじめとする新規免疫学解析ツールを用いてPICS病態の免疫学的な網羅的解析、体内動態解明にアプローチすることにより、ICUでの重症疾患加療中におけるPICS予防のための新たな治療標的開発への方向性を提示することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

盲腸結紮穿孔(cecal ligation puncture: CLP)腹膜炎敗血症マウスモデルおよび糞便懸濁液腹腔内投与(Fecal Suspension Intraperitoneal Injection: FSI)敗血症モデルを使用する。敗血症誘導後2か月生存したマウスをPICSモデルとし、second hitとしてリポポリサッカライド(LPS)10mg/kgを腹腔内投与した。

生存率: CLPによる敗血症後PICS(CLP-PICS)、FSIによる敗血症後PICS(FSI-PICS)、敗血症無しの対照群(Control)の3群それぞれ13匹のマウスにLPS10mg/kgを腹腔内投与し生存率を14日目まで観察した。

組織学的評価: LPS投与翌日に肺、腎、肝、脾を摘出し、北海道大学腫瘍病理学教室(田中伸哉教授)に病理学的評価を依頼した。

免疫学的評価: 多項目同時測定プロファイリング技術を用いることにより、わずか25μLの検体量で最大80項目のサイトカインやホルモンなど複数の液性因子の測定が可能なLUMINEX測定を大阪医科薬科大学救急医学教室(山川一馬准教授)に依頼した。

4. 研究成果

生存率(図2): second hit後、CLP-PICS群とFSI-PICS群では全例生存したが、対照群の生存率はPICS群より有意に低かった(p=0.011)。

組織学的評価(図3): 脾臓ではFSI-PICS群とCLP-PICS群において軽度のマクロファージ浸潤が観察された。肺では、すべての群で肺うっ血がみられ、その強度はFSI-PICS+LPS、対照+LPS、CLP-PICS+LPSの順であった。腎臓では、FSI-PICS+LPS群のマウス2匹に糸球体変性が観察されたが、他の群ではこの所見はみられなかった。肝臓では、FSI-PICS+LPS群のマウス2匹に急性胆管炎が観察された。脾臓では、マクロファージ浸潤はFSI-PICS+LPS群と対照+LPS群で中等度であり、CLP-PICS+LPS群では中等度であった。さらに、CLP-PICS群では10例中5例に腫瘍形成がみられた(図4)。腫瘍の組織学的所見では脱落上皮の直近に好中球中心の炎症細胞浸潤が観察されこれは膿瘍と考えられた。周囲では、マクロファージの集団が観察され、顆粒腫を形成し

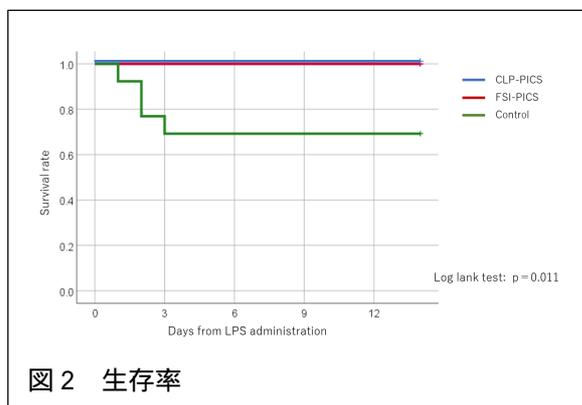


図2 生存率

ていた。

免疫学的評価(表 1) : CLP-PICS 群と FSI-PICS 群は、G-CSF、IL-7、CCL-3、および CCL-4 などの炎症性サイトカインおよびケモカインのレベルが高く、IL-13 および TGF- β 2 などの抗炎症性サイトカインのレベルが低いという特性を持っていた。LPS の腹腔内投与後のサイトカインおよびケモカインレベルは、炎症性または抗炎症性の効果に関係なく、CLP-PICS+LPS 群および FSI-PICS+LPS 群で全てのサイトカインおよびケモカインが抑制されたことを示していた。この傾向は特に CLP-PICS+LPS 群で顕著であった。対照+LPS 群では、LPS の投与によって高い炎症反応が誘発された。

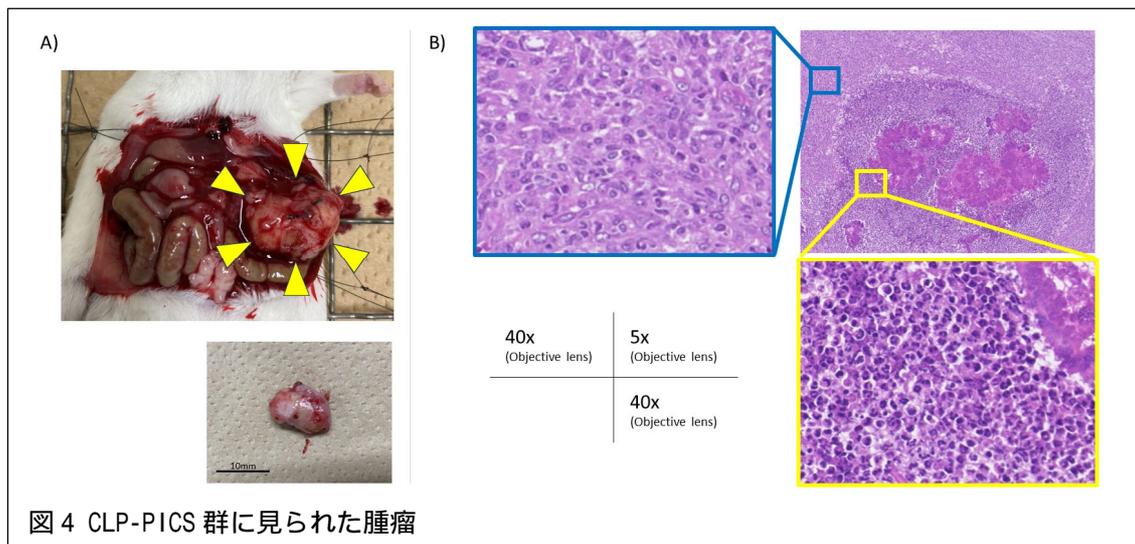
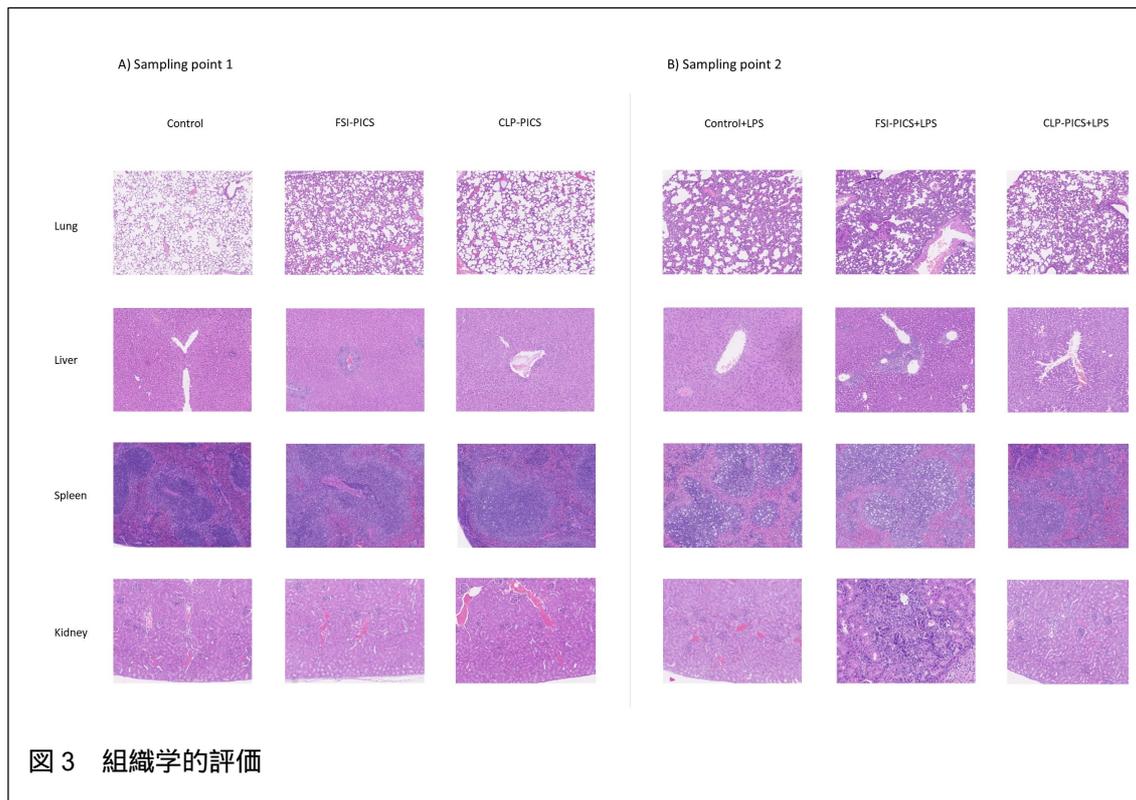


表 1 免疫学的評価

	Control+LPS	CLP-PICS+LPS	FSI-PICS+LPS
G-CSF	10000.00 ± 0.00	10000.00 ± 945.34	10000.00 ± 552.19
GM-CSF	63.24 ± 4.12	23.08 ± 4.66*	34.62 ± 4.66*
IFN γ	46.54 ± 19.22	1.32 ± 1.49**	10.24 ± 3.04*
IL-1 α	83.40 ± 19.79	26.24 ± 7.02*	37.20 ± 4.00*
IL-1 β	4.85 ± 0.88	0.00 ± 1.24*	0.00 ± 0.03*
IL-2	5.79 ± 1.55	0.08 ± 0.22**	8.83 ± 2.42
IL-4	0.76 ± 0.05	0.46 ± 0.65*	0.57 ± 0.12
IL-5	3.32 ± 0.27	1.23 ± 2.28**	3.53 ± 0.79
IL-6	1665.44 ± 467.40	19.72 ± 7.36**	45.34 ± 17.20*
IL-7	3.73 ± 0.28	4.88 ± 0.81	5.58 ± 2.99
IL-9	33.13 ± 13.15	31.70 ± 72.53	7.92 ± 17.19
IL-10	170.94 ± 18.10	7.74 ± 19.51*	22.68 ± 5.76*
IL-12	14.21 ± 2.75	1.00 ± 6.80*	1.00 ± 0.20*
IL-13	58.27 ± 5.99	19.48 ± 2.28*	26.60 ± 3.49*
IL-15	24.33 ± 6.80	13.15 ± 9.93	56.01 ± 37.26
IL-17	36.75 ± 13.52	1.28 ± 36.24*	1.53 ± 0.91*
CXCL-1	2634.54 ± 306.24	37.20 ± 24.77*	115.61 ± 17.28*
CXCL-2	110.18 ± 10.89	1.00 ± 0.00*	1.00 ± 3.02*
CXCL-10	1584.25 ± 102.46	471.18 ± 35.45*	525.96 ± 46.49*
CCL-2	2558.74 ± 311.02	84.00 ± 58.98*	120.84 ± 32.90*
CCL-3	73.10 ± 6.56	44.40 ± 19.33**	79.87 ± 6.32
CCL-4	303.22 ± 88.76	71.52 ± 12.74*	84.63 ± 8.52*
CCL-5	387.99 ± 59.79	23.89 ± 3.46**	51.38 ± 6.26*
CCL-5	387.99 ± 59.79	23.89 ± 3.46**	51.38 ± 6.26*
TNF α	23.55 ± 2.01	8.24 ± 0.85*	8.24 ± 1.06*
TGF- β 1	5.00 ± 0.60	6.50 ± 0.23	6.00 ± 0.27
TGF- β 2	17.50 ± 1.03	15.75 ± 1.33	14.00 ± 0.57
TGF- β 3	6.00 ± 0.17	6.00 ± 0.22	6.00 ± 0.09

Data presented as median ± standard error.

All units are picogram per milliliter (pg/ml).

* Significantly different from the Control+LPS group (p value < 0.05)

Significantly different from the FSI-PICS+LPS group (p value < 0.05)

CCL: C-C motif chemokine, CLP: cecal ligation and puncture, CXCL: C-X-C motif chemokine ligand, FSI: fecal suspension intraperitoneal injection, G-CSF: granulocyte-colony stimulating factor, GM-CSF: granulocyte macrophage colony-stimulating factor, IFN: interferon, IL: interleukin, LPS: lipopolysaccharide, PICS: persistent inflammation immuno-suppression and catabolism syndrome, TGF: transforming growth factor, TNF: tumor necrosis factor.

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〕

〔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	和田 剛志 (Wada Takeshi) (30455646)	北海道大学・医学研究院・助教 (10101)	
研究 分 担 者	山川 一馬 (Yamakawa Kazuma) (50597507)	大阪医科薬科大学・医学部・准教授 (34401)	

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