

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09012

研究課題名(和文)敗血症性DICにおけるCD69-MyI9/12システムの関与

研究課題名(英文) Involvement of the CD69-MyI9/12 system in septic DIC

研究代表者

宮内 清司 (Miyaychi, seiji)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50895844

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)：細菌性敗血症におけるMyI9-CD69 systemの関与について研究を行った。敗血症モデルには盲腸結紮穿孔モデル(以下CLPモデル)を使用した。

MyI9-CD69 systemの関与についてはCLPモデルマウスの肺でMyI9 netという構造体が形成されるかどうかで検証した。しかし通常の臨床でも遭遇が少ないレベルの重症度のマウスでもMyI9netの形成は確認できなかった。また、同時期に進めていた実臨床における各病態での血中MyI9濃度の計測において細菌性敗血症患者の血中MyI9濃度が低値であることがわかり、細菌性敗血症の病態にMyI9-CD69 systemの関与は乏しいという結論に至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究に先立ち新型コロナウイルス感染症患者におけるMyI9-CD69 systemの関与について研究が行われ、その後血中MyI9濃度と重症度との相関について報告が行われている。

本研究では細菌性敗血症についてMyI9-CD69 systemの関与は確認できず、細菌性敗血症の病態解明や新規治療の開拓には繋がらなかった。しかし、今後も社会的な問題になるであろうCOVID-19の病態と一般的な細菌性敗血症の病態の差異を検討し、特異的な治療を検討していく上での意義はあったものとする。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the involvement of the MyI9-CD69 system in bacterial sepsis. A cecal ligation and puncture (CLP) model was used as a model of sepsis. The involvement of the MyI9-CD69 system was examined by fluorescent immunostaining of the lungs of the CLP model mice to see the MyI9 net, which is a characteristic feature of MyI9 involvement. However, we were unable to obtain the formation of MyI9 net even after changing the severity of the disease. We examined mice with a level of severity of disease that is rarely encountered in general clinical practice, with a mortality rate of 50% death in 24 hours, but we could not confirm the formation of MyI9net.

In addition, during the same period, we measured MyI9 levels in blood in various clinical conditions, and found that MyI9 levels in blood of septic patients were clearly lower.

So we conclude that MyI9 is not involved in the pathogenesis of bacterial sepsis.

研究分野：救急集中治療医学

キーワード：肺血症 DIC MyI9 Covid-19

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

敗血症は細菌などの感染により惹起された生体反応である炎症反応が制御困難となり全身の臓器障害・不全を呈する病態である。ガイドラインによる治療法の確立・普及により敗血症の予後の改善がみられてはいるが、依然として高い死亡率が問題となっており全世界における死亡原因の 19.7%を敗血症に関連した死亡が占めると推測されている。このため過去に薬物治療を含めた新規治療法の効果を検証する臨床試験は数多く行われてきたが、敗血症の病態を制御する直接的な治療薬は発見されておらず、抗菌薬などによる感染制御と人工補助療法を含めた全身管理が治療の中心となっている。今後、高齢化などにより敗血症による死亡が引き続き大きな問題となることが予想されており、敗血症の病態解明を含めた新規治療の発見が必要とされている。

敗血症による臓器不全のうち、凝固障害は死亡率と有意な関連が報告されており、重要な臓器障害である。過剰な生体免疫反応による凝固・線溶系の破綻によって引き起こされる凝固障害は播種性血管内凝固 (Disseminated Intravascular Coagulation: DIC) と呼ばれる。これは全身・各臓器の末梢血管で凝固能の異常な亢進・血栓形成が起こる病態である。この DIC が持続することによって肝臓や腎臓を含めた様々な臓器障害が引き起こされ、最終的な死亡率の上昇につながる。臨床上重要な病態であり、敗血症同様さまざまな新規治療薬が検証されているが、現時点で国際的に投与が推奨されるような有効性の確認された治療法・治療薬は存在しない。そのため新たな視点での敗血症における凝固・線溶系のメカニズムの解明や治療法の開発が望まれている。

リンパ球の活性化マーカーである CD69 のリガンド分子である myosin light chain (MyI) 9/12 は炎症に伴って血小板から放出されるたんぱく質で、血管内腔に網目状の構造物を構築する。そして、CD69 分子を発現した免疫細胞がその構造物を介して血管外に遊走し、局所で炎症を引き起こす (MyI9-CD69 システム)。当初喘息などのアレルギー疾患での関与が判明し、研究が進められており治療薬の開発などの検討が進められている。敗血症患者の脾臓 T 細胞でコントロール群に比べて CD69 発現が増強していることが報告されており、敗血症の病態でも MyI9/12-CD69 システムが重要な役割を担っている可能性がある。また本学では SARS-CoV-2 感染症 (COVID-19) の血管障害や血管炎、血栓形成に着目して血漿 MyI9/12 を用いた早期バイオマーカーとしての有用性の研究を行っており、本研究が相補的な効果をもたらすことを期待された。

2. 研究の目的

敗血症患者の血液検体及び敗血症モデルマウスを用いて MyI9 の機能解析を行い、MyI9 が敗血症における DIC の発症にどのように関与しているのかを調べる。

3. 研究の方法

(1) 敗血症モデルマウスにおける病理学検討

盲腸結紮穿孔 (cecal ligation and puncture: CLP) 手術により敗血症モデルマウスを作成した。これはマウス腹部に正中切開を行い盲腸に到達、盲腸内の糞便を先端に集めたのち先端より 50-70%の位置で結紮し、18-25G の注射針で穿通する。その後、再度腹腔内に完納し腹膜・皮膚を縫合作成するモデルである。これは細菌性腹膜炎を模した敗血症モデルであり、また対象群としては盲腸への到達までを行い完納する単開腹モデル (sham モデル) を使用した。CLP 導入後 24-48 時間の時点で安楽殺を行い解剖し肺組織を摘出、クリオモルドにて包埋し凍結病理切片を得た。その後 MyI9、フォンビルブランド因子 (von Willebrand Factor: vWF) cell MUSUK、DAPI について蛍光免疫染色を行い、MyI9/12 の関与がある場合に検出される MyI9 net の検出を評価した。

(2) 敗血症患者における MyI9/12 濃度測定

当集中治療室に入室した敗血症患者 50 名とコントロール患者 50 名の血液を入室時・入室 3 日目・6 日目に採取し、血漿 MyI9/12 濃度及び DIC の指標として血小板数・prothrombin time (PT)・fibrin/fibrinogen degradation products (FDP)・fibrinogen 濃度、炎症マーカーとして interleukin (IL)-6・C-reactive protein・procalcitonin を測定する。血漿中の MyI9/12 は Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) 法を用いて測定する。DIC の指標や炎症マーカーについては ELISA やラテックス免疫比濁法など項目に応じた検査法を用いる。以上の測定結果から、MyI9/12 濃度と各 DIC 診断マーカーとの相関関係を調べ、敗血症性 DIC を評価するための診断マーカーとしての MyI9/12 の有用性を評価する。

4. 研究成果

(1) 敗血症モデルマウスにおける病理学検討

既報では DIC の組織学的評価に肺、肝、腎の組織が用いられていたためこれらの組織を用いて蛍光免疫染色での MyI9 の評価を行うこととし、CLP による敗血症モデルおよび sham モデルで肺、肝、腎を採取し染色をおこなった。MyI9-CD69 システムが関与している場合には末梢血管内に MyI9-net と呼ばれる構造物が検出されるが、上記臓器ではごく一部の血管で検出されるにとどまり有意な結果ではなかった。また sham モデルでの結果との差異もみられなかった。この際、検討した臓器のうち MyI9 が肺組織に最も検出されていたためより重症の肺検体を作成しての再度検討を行う計画とした。

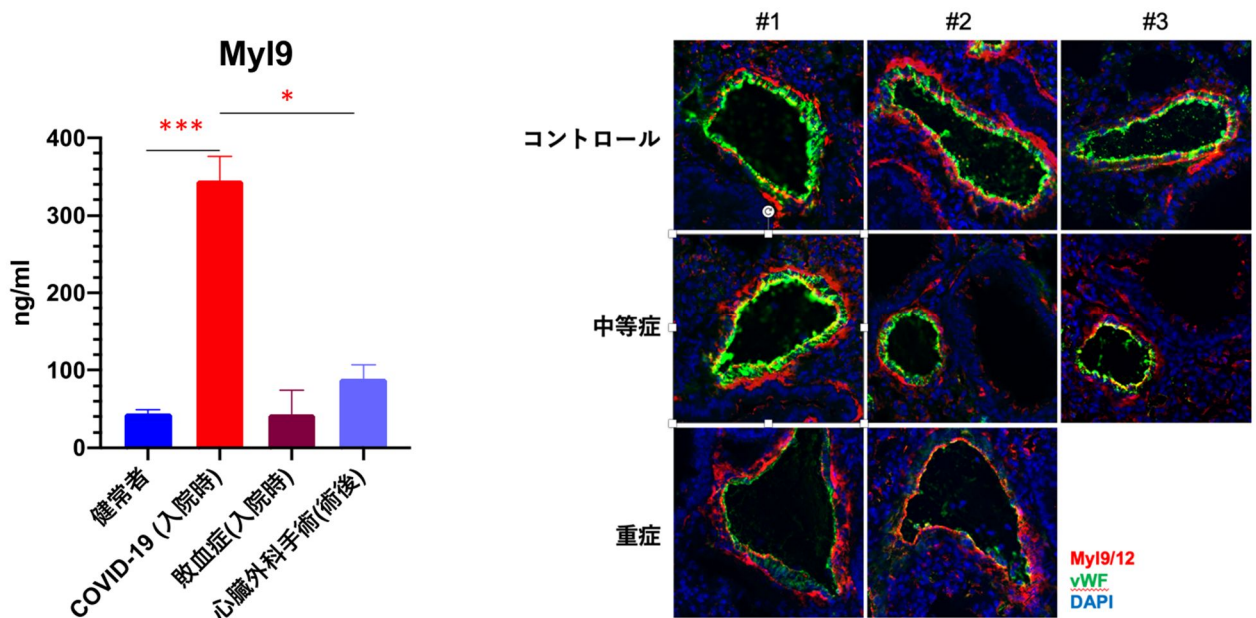
マウスの種類や CLP 導入から検体採取までの時間、CLP で導入する敗血症の重症度（盲腸結紮部位・穿通する針の太さで調節を行う）など、調整し可能な限り重症な肺モデルを作成することを前段階の目標として進めた。

最終的には C57BL/6 マウス、24 時間後、結紮部位 70%、穿通 18G 注射針という組み合わせで、CLP による敗血症モデルにおいて組織学的評価上、最も重症な肺モデルが作成可能という判断を行った。この重症度を含む重症・中等症の敗血症モデルマウス、及び sham マウスで前述の通り蛍光免疫染色をおこなったがやはり同様に MyI9-CD69 システムが敗血症性 DIC に関与していると判断するに足る MyI9 net の検出は得られなかった。この際使用した結紮部位 70%、穿通 18G 注射針の CLP をおこなった重症敗血症モデルマウスは 24 時間で 50% が死亡する重症度を呈しており、これは一般的な臨床で遭遇すること自体稀な重症度であることもあり、細菌性敗血症の病態に MyI9-CD69 システムの関与が乏しい可能性を示唆する結果と考えた。

(2) 敗血症患者における MyI9/12 濃度測定

実臨床における患者の血液で血中 MyI9 濃度の測定を行っていたが、低値であることが判明し、MyI9 が細菌性敗血症において関与が少ないことが示唆された

上記(1)(2)をもって、細菌性敗血症及び引き起こされるDICにおいてMyI9-CD69システムの関与は少ないとの結論を得た。



疾患ごとの血中 MyI9 濃度

蛍光免疫染色における肺病理像

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	中田 孝明 (Nakada Takaaki) (20375794)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	
研究分担者	大網 毅彦 (Oami Takehiko) (70527887)	千葉大学・医学部附属病院・講師 (12501)	

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