

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：24303  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2011～2014  
 課題番号：23592678  
 研究課題名(和文) 転写因子 C / E B P による好中球造血・機能制御の解析に基づく敗血症病態の解明  
  
 研究課題名(英文) Exploring pathophysiology of sepsis based on the mechanism of granulopoiesis regulated by the C/EBPbeta transcription factor  
  
 研究代表者  
 志馬 伸朗 (SHIME, NOBUAKI)  
  
 京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師  
  
 研究者番号：00260795  
  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：C/EBP は細胞成熟や機能維持に働く。感染時には好中球の需要増加に伴い骨髄造血が亢進するが、造血幹細胞レベルの分化・増殖の促進に対するC/EBP の関与を検討した。カンジダ感染症モデルで、好中球への分化能を保持する細胞集団を5つの集団に分けると、C/EBP タンパクとリン酸化C/EBP タンパク双方が全集団で亢進していた。C/EBP ノックアウトマウスを用いたモデルで、未分化なHSC、CMPでの細胞周期の活性化とGMPでの細胞数の増加にC/EBP が必要であった。C/EBP は緊急時好中球造血において造血幹細胞と顆粒球系前駆細胞の増幅に関与する、造血制御に必要な因子であると結論された。

研究成果の概要(英文)：CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP ) could play crucial roles on cellular differentiation and functional maintenance in various types of somatic cells. Granulocyte production increases in response to increased neutrophil demand following infectious stress. In this study, we investigated the role of C/EBP at hematopoietic stem cell levels in stress-induced granulopoiesis. C/EBP was upregulated at the protein level in all the five distinct subpopulations of granulopoiesis in a mouse candidemia model. Using a C/EBP knockout mouse model, the role of C/EBP in cell cycle acceleration and proliferation of hematopoietic stem/progenitors was also confirmed. These data suggest that C/EBP is a significant controlling factor involved in the efficient amplification of early granulocyte precursors during emergency granulopoiesis.

研究分野：救急医学

キーワード：好中球 分化/増殖 C/EBP 造血幹細胞 敗血症 カンジダ

## 1. 研究開始当初の背景

感染症とそれに伴う急性臓器不全すなわち重症敗血症と敗血症性ショックは、集中治療患者の最頻の死亡原因で、その病態解明と対策の確立は救急/集中治療医学における喫緊の課題である。重症感染症時に重要な役割を果たす生体防御機構に、好中球の存在がある。CCAAT/enhancer binding protein(C/EBP)転写因子ファミリーに属するC/EBPは肝臓や脂肪、脳、皮膚、骨髄など多くの組織に発現し、それぞれの組織で細胞成熟や機能維持に働いている。特にストレス/炎症反応との関連について多数の報告がある。1)マクロファージの貪食能の獲得に必須である、2)炎症性サイトカインの産生やCOX-2の活性化などの炎症反応に関与する、3)マクロファージからの抗炎症性サイトカイン(IL-10)の産生や癌細胞による骨髄由来抑制細胞の誘導などの抗炎症反応・免疫抑制に関与するなど、C/EBPの役割は非常に多彩であり、その作用についてさらに解明することは、感染に対する生体反応について病態理解を深め、C/EBPをターゲットとした治療介入の発展につながる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、好中球に対するC/EBPの関与を造血幹細胞(HSC)レベルの分化・増殖の促進に関して検討することである。関連する近年の知見として、病原体特有の構成成分をパターン認識する受容体であるToll-like Receptors(TLRs)のシグナルが骨髄系前駆細胞に直接作用して骨髄系細胞の分化・増殖を刺激するという報告がある。マクロファージではTLR4のシグナルから炎症性サイトカインが産生される過程にC/EBPが関与することが報告されており、TLRsのシグナルによる骨髄系前駆細胞の分化増殖にもC/EBPが関与している可能性がある。さらに、interferon(IFN)のうちIFN $\alpha$ とIFN $\gamma$ はHSCに直接作用し、G0期で休止中のHSCを細胞周期に移行させることがわかっている。単球ではIFNレセプターから始まるシグナルの一部にC/EBPが含まれるという報もあり、HSCでのIFNsの作用がC/EBPを介している可能性もある。さらに、好中球における抗炎症作用についてもC/EBPが関与している可能性がある。

以上より、HSCレベルの分化・増殖の促進に対するC/EBPの関与を評価することにより、感染時の好中球に対するC/EBPの統括的な関与の解明に繋がるものと考えた。

## 3. 研究の方法

### 1) フローサイトメトリーによる好中球造血の分化成熟過程の解析法の考案

- フローサイトメトリーによる解析とセルソーティング:

マウスの大腿骨、頸骨より骨髄細胞を採取し、CD34、Ly-6G、c-kit、lineage marker(CD4、CD8、CD19、B220、Ter119)などの蛍光標識モノクローナル抗体で染色した。解析およびセルソーティングはFACSCalibur、FACSCantollもしくはFACSAriaにて行った。

### 2)カンジダ血症モデルマウスの緊急時好中球造血の検討

- カンジダ血症モデルマウスの作成:

尾静脈より $4 \times 10^6$  CFU/20 g body weight/mouseの*Candida albicans*を投与し、カンジダ血症モデルマウスを作成。

- 遺伝子発現解析:

ソーティングされた細胞からRNAを抽出し、リアルタイムPCR法で顆粒タンパク質の遺伝子発現解析を行う。

- 細胞周期解析:

骨髄細胞採取の1時間前に1 mgのBrdUを腹腔内投与した。その後採取した骨髄細胞を蛍光抗体による細胞表面抗原の染色、細胞の固定、細胞膜浸透化、抗BrdU抗体による染色の順に細胞処理し、FACSCaliburもしくはFACSCantollで解析しBrdUの取り込み率を解析することにより細胞周期状態を測定。

- タンパク発現解析:

ソーティングされた細胞からタンパクを抽出し、ウエスタンブロットング法にてタンパク発現解析を行った。

### 3) 感染以外の造血ストレス時における細胞周期調節でのC/EBPの役割

- マウス造血幹細胞の細胞株であるEML細胞を用い、レトロウイルスを用いてC/EBPを導入し、細胞周期に及ぼす影響を検討した。さらに、生体内でのストレス存在下での機能的意義を検討するために、C/EBPノックアウトマウス又は野生型マウスの骨髄細胞を放射線照射後のWTマウスに骨髄移植した。生着後、5-FU投与による造血ストレスを与え、C/EBPの過剰発現状態となっているGFP陽性HSCの細胞周期を観察。

## 4. 研究成果

好中球造血について詳細な検討をするには、フローサイトメトリーにより好中球造血を簡潔に

解析できる解析法が必要であった。そのため好中球への分化能を保持する細胞集団を未分化度の指標である c-kit と好中球のマーカーである Ly-6G の発現レベルにより分けるといふ新しい解析法を考案した。Tリンパ球、Bリンパ球および赤芽球を Lineage marker(CD4、CD8、CD19、B220、Ter119)で識別し gating により除外し、さらに SSC<sup>high</sup>FSC<sup>int</sup> の好酸球と c-kit<sup>high</sup>CD34<sup>low</sup> の巨核球・赤芽球系前駆細胞も gating により除外し、残った集団を c-kit と Ly-6G で展開し、#1 から#5 の5つの分画に分けた。なお #1 は c-kit<sup>high</sup>Ly6G<sup>-</sup>、#2 は c-kit<sup>int</sup>Ly6G<sup>-</sup>、#5 は c-kit<sup>low</sup>Ly6G<sup>high</sup> とし、さらに#2 と#5 の間を二つに分け#3、#4 とした。分化成熟の過程は c-kit の high から low へ、Ly-6G の low から high に進むと想定されたため、#1 から#5 の順に進むと考えられた。

#1 から#5 が好中球の分化成熟過程を順に反映していることを確認するため、各集団の細胞をソーティングにより採取し、ギムザ染色にて形態観察を行った。#1 の細胞は N/C 比が高く、好塩基性の強い細胞質を持ち、未分化な細胞形態を示した。#2 から#5 へと進むにつれ、N/C 比の低下、細胞質の好塩基性の減弱、核のドーナツ型への変形を認めた。さらに各集団の細胞から RNA を抽出しリアルタイム PCR 法による顆粒タンパク遺伝子の定量を行った。前骨髄球で発現するカテプシン G などのアズール顆粒は、#1、#2 で強く発現し、骨髄球で発現する特殊顆粒のラクトフェリンは#4 で強く発現していた。後骨髄球、桿状核球以降で発現するセラチナーゼ顆粒の MMP9 は#4 から発現を認め、#5 でピークに達していた。これらの結果は、好中球の分化成熟過程は#1 から#5 の順に進むことを示していた。

この方法を用いて緊急時の好中球造血亢進について検討するため、尾静脈より *Candida albicans* を投与したカンジダ血症モデルマウスを作成し、感染後 4 日目まで好中球造血を観察した。好中球造血に関与する細胞における各集団の割合は、1 日目に#5 が減少し、#1 から#4 は増加していた。さらにそれぞれの集団のピークとなるタイミングは#1 が最も早く、その後#2、#3、#4、#5 と順に認められた。これから感染初期に成熟好中球(#5)が動員され減少するとともに未分化な細胞集団#1 から造血亢進が生じ、その後#2 から#5 まで徐々に分化増殖すると考えられた。

次に感染後1日目における各集団の細胞周期を BrdU の取り込み率にて調べた。#1 および#2 で感染後、BrdU の取り込み率が有意に上昇していた。このことから感染後の好中球造血の亢進はより未分化な細胞集団である#1、

#2 の細胞周期の活性化から生じると考えられた。

C/EBP が感染時の好中球造血においてどの分化段階で作用するのかを調べるため、各集団の C/EBP の発現を感染前後で比較した。リアルタイム PCR 法による mRNA の定量では、感染後 1 日目の発現量はすべての細胞集団で定常状態と有意差を認めなかった。C/EBP は転写調節だけでなく翻訳やリン酸化などの転写後調節を受けるため、ウエスタンブロッティング法によるタンパク量の解析を行った。その結果、C/EBP タンパクとリン酸化された C/EBP タンパクのどちらもが感染 1 日目にすべての細胞集団で亢進していた。

C/EBP ノックアウト(KO)マウスは感染時の好中球造血の亢進が阻害されることが知られている。C/EBP の作用をさらに詳しく調べるため、C/EBP KO マウスを用いたカンジダ血症モデルマウスを作成し、造血幹・前駆細胞および好中球造血を観察した。WT マウスでは感染後に顆粒球・マクロファージ前駆細胞(GMP)の細胞数の増加が認められたが、KO マウスではその変化が WT より減弱していた。さらに WT マウスでは感染後に HSC および骨髄球系共通前駆細胞(CMP)で BrdU の取り込み率の増加が認められたが、KO マウスでは HSC のみ BrdU の取り込み率の増加が認められたものの、その程度は WT マウスよりも減弱していた。これらの結果から、感染早期の HSC、CMP での細胞周期の活性化と GMP での細胞数の増加に C/EBP が必要となることが明らかとなった。

さらに、感染以外の造血ストレス時における細胞周期調節での C/EBP の役割を検討した。マウス造血幹細胞の細胞株である EML 細胞を用い、C/EBP をレトロウイルスを用いて導入すると、BrdU 陽性細胞の比率はコントロールベクター導入細胞に比べ有意に増加した。つぎに、生体内での細胞周期の状態を評価するために CD45.2+ 野生株と C/EBP ノックアウト造血幹細胞(CD45.2<sup>+</sup> CD150<sup>+</sup> KSL cells)を CD45.1 陽性マウスに移植し検討した。5-FU 投与後の造血ストレスにおいて、C/EBP 欠損造血幹細胞では、野生造血幹細胞に比べより多くの細胞が G0 期にあり、S/G2/M 期が少なくなった。すなわち、C/EBP は造血ストレス時において内因性に細胞周期への導入と造血幹細胞発現を促進していることが示唆された。

以上より、転写調節因子 C/EBP は平常時には必要とされないが、感染ストレス下では造血前駆細胞の増殖・分化を促進し、造血幹細胞を枯渇させる方向で作用することが明ら

かになった。以上より、C/EBP は緊急時の顆粒球造血の厳密な制御に必要な因子であると結論された。

#### 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 19 件)

1. Hirai H, et al. Non-steady-state hematopoiesis regulated by the C/EBPbeta transcription factor. *Cancer Science*, 2015. in press. (査読有)
2. Yoshioka S, Miura Y, Yao H, Satake S, Hayashi Y, Tamura A, Hishita T, Ichinohe T, Hirai H, et al: CCAAT/Enhancer-Binding Protein Expressed by Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Regulates Early B-Cell **Lymphopoiesis**. *Stem Cells* 32:730-740, 2014. (査読有)
3. Hirai H, et al. CCR1-mediated Accumulation of Myeloid Cells in the Liver Microenvironment Promoting Mouse Colon Cancer Metastasis *Clinical and Experimental Metastasis*, 2014;31:977-89. (査読有)
4. Umenai T, Shime N, et al. A pilot study of *Bifidobacterium breve* in neonates undergoing surgery for congenital heart disease. *Journal of Intensive Care* 2014, 2:36
5. Nakagawa S, Shime N. Respiratory rate criteria for pediatric systematic inflammatory response syndrome. *Pediatr Crit Care Med*. 2014;15:182. (査読有)
6. Hayama M, Shime N, et al. Invasive pulmonary aspergillosis in a patient presenting with idiopathic systemic capillary leak syndrome. *BMJ Case Rep*. May 23;2014. (査読有)
7. 志馬伸朗. 敗血症性ショックにおける感染症診断と抗菌治療. *化学療法の領域* 2014;30:631-640 (査読無)
8. 平位秀世: 好中球分化異常と疾患. **臨床床血液** 54, 27-38, 2013. (査読無)
9. Shime N, et al. Fujita N. De-escalation of antimicrobial therapy for bacteraemia due to difficult-to-treat Gram-negative bacilli. *Infection*. 2013;41:203-10. (査読有)
10. Sakaguchi M, Shime N, et al. Effects of adherence to ventilator-associated pneumonia treatment guidelines on clinical outcomes. *J Infect Chemother*. 2013; 19:599-606. (査読有)
11. Shime N, et al. Incidence and risk factors for mortality in paediatric severe sepsis: results from the national paediatric intensive care registry in Japan. *Intensive Care Med*. 2012;38:1191-7. (査読有)
12. Satake S, Hirai H, Hayashi Y, Shime N, et al. C/EBP is involved in the amplification of early granulocyte precursors during candidemia-induced "emergency" granulopoiesis. *J Immunol*. 2012;189:4546-55. (査読有)
13. Shime N, et al. Current practices for ventilator-associated pneumonia prevention in Japan: a survey study. *Chest*. 2012;141:281-3. (査読有)
14. Tokuhira N, Shime N, et al; Writing Committee of AH1N1 Investigators; Japanese Society of Intensive Care Medicine Pediatric Intensive Care Unit Network. Mechanically ventilated children with 2009 pandemic influenza A/H1N1: Results from the national pediatric intensive care registry in Japan. *Pediatr Crit Care Med*. 2012 13:e294-e298. (査読有)
15. Hayashi Y, Hirai H, et al. C/EBP promotes BCR-ABL-mediated myeloid expansion and leukemic stem cell exhaustion. *Leukemia* 2012;27:619-28. (査読有)
16. Hirai H, et al. Cyclic AMP responsive element binding proteins are involved in 'emergency' granulopoiesis through the upregulation of CCAAT/enhancer binding protein. *PLoS One* 2012;8:e54862. (査読有)
17. Tokuhira N, Shime N, et al. Mechanically ventilated children with 2009 pandemic influenza A/H1N1: Results from the national pediatric intensive care registry in Japan. *Pediatr Crit Care Med*. 2012;13:e294-298. (査読有)
18. Shime N, Satake S, Fujita N. De-escalation of antimicrobials in the treatment of bacteraemia due to antibiotic-sensitive pathogens in immunocompetent patients. *Infection*. 2011;39:319-25. (査読有)
19. Shime N. De-escalation strategies could be applied to a wide variety of infectious

settings. Infection 2011; 40:229-30. (査読有)

〔学会発表〕(計12件)

1. 山口陽輔, 佐々木美佳, 山北俊介, 松田愛, 志馬伸朗, 天谷文昌. 一次知覚神経における C/EBP の発現は炎症性痛覚過敏の成立に關与する. 第19回日本神経麻酔集中治療学会. 2015.4.11, 岐阜
2. 吉田浩輔, 藤野光洋, 狩野謙一, 藤井雅士, 吉田浩輔, 濱中訓生, 竹下淳, 堤貴彦, 田中博之, 別府賢, 志馬伸朗. 敗血症性ショック患者における感染症予測スコアの有用性について. 第42回日本集中治療医学会総会. 2015.2.9, 東京
3. 平位秀世, 佐藤淳至, 田村彰広, 横田明日美, 庄司月美, 三浦康生, 志馬伸朗, 前川平. C/EBP による造血幹細胞制御. 第19回造血器腫瘍研究会. 2015.1.23, 佐賀
4. Hirai H, et al. CCR1-Mediated Formation of Liver Microenvironment for Cancer Metastasis. The 56th ASH Annual Meeting in San Francisco, CA, 2014.12.6-9, San Francisco(USA).
5. 志馬伸朗. 血液培養の正しい取り方と解釈. 第27回日本外科感染症学会外科感染症入門講座. 2014.12.4, 東京
6. 志馬伸朗. 教育講演: 感染症科医への敗血症ガイドラインの紹介. 第57回日本感染症学会中日本地方会学術集会. 2014.10.23, 岡山
7. 平位秀世. 好中球分化異常と疾患. 第75回日本血液学会総会. 2013.10.11, 札幌
8. Shime N, Kosaka T, Nakanishi M, Fujita N. Nosocomial pediatric bacteremia: a single-institute survey. The 28th. International Congress of Chemotherapy and Infection. 2013.6.7, Yokohama
9. 田村彰広, 平位秀世, 佐竹早紀子, 志馬伸朗, 佐和貞治. 転写因子C/EBPβはカンジダ感染後の造血幹細胞・骨髄系前駆細胞の増殖を制御する. 第87回日本感染症学会. 2013.6.5, 横浜
10. Yoshioka S, Miura Y, Yao H, Hayashi Y, Satake S, Hishita T, Hirai H, et al, Defective mesenchymal stem cells contribute to impaired B cell lymphopoiesis in C/EBPβ knockout mice. The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology 2012.10.20, Kyoto
11. 佐竹早紀子, 平位秀世, 志馬伸朗ら. 感染時の好中球造血において転写因子

C/EBPβは造血幹細胞・前駆細胞を含む未分化細胞集団の増幅に關与する. 第86回日本感染症学会. 2012.4.26, 長崎

12. 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85回日本感染症学会総会. 2011.4.21, 東京

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

## 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・客員講師  
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・講師  
研究者番号: 50315933

### (3) 研究協力者

佐竹 早紀子 (SATAKE, sakiko)  
京都大学・特別研究生  
研究者番号: なし