

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592688

研究課題名(和文)敗血症性多臓器不全に対する間葉系幹細胞移植療法と thymosin beta 4 の応用

研究課題名(英文) Bone marrow stromal cells and thymosin beta 4 attenuate septic organ failure

研究代表者

加納 秀記 (Kano, Hideki)

藤田保健衛生大学・医学部・准教授

研究者番号：90340231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：敗血症患者では末梢血液中EPCsの有意な減少を示した。敗血症患者において生存者と死亡者を比較したところ生存者で有意に高値を呈した。血漿中VEGF、CXCL8濃度は敗血症患者では有意な増加を示した。血漿中VEGF、CXCL8濃度は生存者と死亡者間で有意な変動を認めなかった。CD34+細胞は敗血症患者で低下傾向を示したが血漿中VEGF、CXCL8は上昇していたことより、造血サイトカインに対する骨髄の反応性低下が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recent evidence suggests that vascular maintenance during sepsis is thought to be important mechanisms to repair endothelial damage. This repair is mediated by recruitment from bone marrow of endothelial progenitor cells (EPCs). Therefore we were interested in whether EPCs, measured by FACS, are mobilized during sepsis and if this mobilization is related to clinical outcome. We showed that the appearance of CD34+ cells in the blood of patients with sepsis reduced compared to healthy controls. Plasma levels of growth factor VEGF and chemokine CXCL8 are significantly higher in septic patients compared to healthy volunteers. These results suggest that sepsis would induce bone marrow hypo-responsiveness to cytokines.

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：骨髄前駆細胞 VEGF CXCL8 敗血症

1. 研究開始当初の背景

過剰な炎症のみならず対極的な抗炎症状態の両面が複雑にからみあっている敗血症病態は、単純な抗炎症療法もしくは免疫賦活療法のみでは対処できず、その治療は困難を極める。最近の報告によると敗血症は骨髄から MSCs を動員し、傷害を受けた炎症部位に集積させ傷害細胞の修復を行っている事が明らかになりつつある。MSCs は幹細胞に働いて hepatocyte growth factor, insulin-like growth factor, fibroblast growth factor 2 などの細胞保護因子の産生を促し、臓器保護作用を発揮すると推察されている。また最新の研究によると、MSCs 輸注移植がマウス (Gupta N et al. J Immunol 2007; 179: 1855-63) および人 (Lee JW et al. Proc Natl Acad Sci USA 2009; 106: 16357-62) におけるエンドトキシン誘発肺障害、ラットを用いた盲腸結紮腹膜炎 (Nemeth K et al. Nature Med 2009; 15: 42-9) に対して治療効果を示す事が明らかにされ、敗血症に対する MSCs の細胞 臓器保護効果は脚光をあびつつある。

thymosin β_4 は細胞内に存在する蛋白質であるがいったん細胞外に放出されると組織再生促進ペプチドとして働くため現在大きな注目を集めており (Philp D et al. Ann N Y Acad Sci 2010; 1194: 81-6)、脊髄損傷、熱傷、脳虚血疾患にその応用が期待されている。MSCs と同様な、抗アポトーシス作用、血管新生作用、細胞分化促進作用を有するのみならず、細胞構成成分であるアクチンの中和蛋白としても重要な働きを果たしている。敗血症のように過剰な細胞壊死を伴う病態では actin toxicity と称される血中アクチンの増加を認めると共に thymosin β_4 の消費性低下を認める (Goldstein AL et al. Trends Mol Med 2005; 11: 421-9)、ラットを用いたエンドトキシンショックモデルに thymosin β_4 を投

与することにより生存率の改善が報告されており敗血症に対する応用も検討されつつある。

2. 研究の目的

われわれは敗血症時における血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cells: EPCs) の動態を明らかにするために末梢血中における EPCs の測定を行った。さらに EPCs と極めて類似した創傷治癒因子である thymosin β_4 も敗血症治療薬としての可能性を有しており、EPCs との同時投与により相乗効果を生むと予想している。

本研究の目的は、生体が本来有している組織修復・再生能を細胞移植ならびに骨髄細胞分化促進ペプチドによって最大限に賦活化し敗血症治療に応用することである。具体的には、敗血症における EPCs 動員による臓器保護作用の有無を明らかにする。

3. 研究の方法

血中 EPCs 細胞数の測定

単核球分画 (PBMCs) は Ficoll Hypaque を用いた濃度勾配法にてヘパリン化全血より分離精製する。EPCs は表面抗原を特異抗体で染色、洗浄、ホルマリン固定後 4 カラー FACS (FACSCalibur, BD Biosciences) にて同定する。すなわち CD45^{dim/-} (Beckman Coulter, CA) CD133⁺ (Miltenyi Biotec, Germany) CD144⁺ (Bender Med Systems, Austria) VEGF receptor2⁺ (R & D Systems, Germany) を EPCs とする (Gill M et al, Circ Res; 2001)。EPCs は総 PBMCs に対する割合にて表す。

血液中 VEGF, CXCL12, CXCL8 は市販の ELISA キットを用いて測定した。

4. 研究成果

対象は重症敗血症患者で ICU 入室日に採血を行い採取した血液で CD34⁺細胞を測定した (図 1 ~ 4)。

図 1

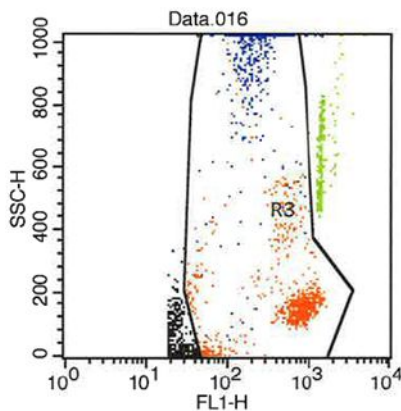


図 2

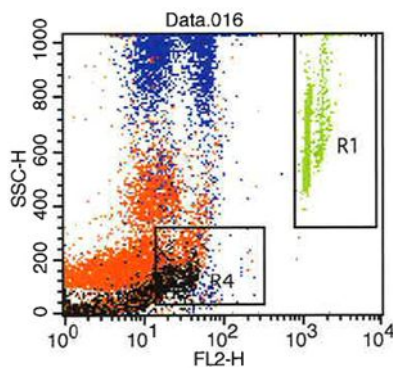
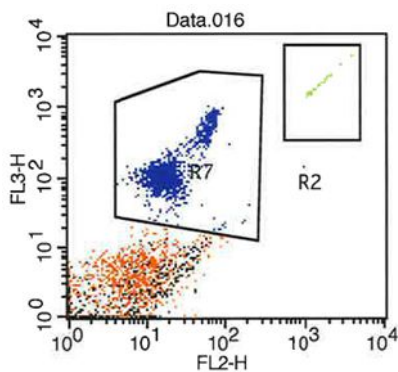
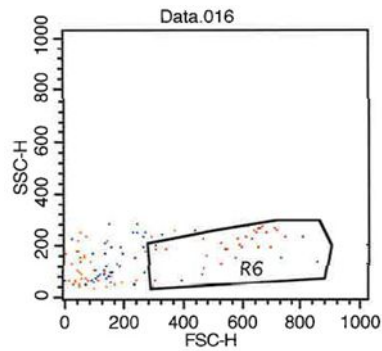


図 3



まず CD45+細胞を gating する (R3, 図 1)。次いで CD34+細胞を gating する (R4, 図 2)。死細胞を gating して除去する (R7, 図 3)。最後に CD34+細胞は図 4 の gating (R6) で確定する。

図 4



正常人においては末梢血液中に 5.45 ± 0.65 個/ μl であったのに比し敗血症患者では 2.28 ± 0.86 個/ μl と有意な減少を示した。敗血症患者において生存者と死亡者を比較したところ各々 4.12 ± 0.56 個/ μl 1.89 ± 0.22 個/ μl で、生存者で有意に高値を呈した。血漿中 VEGF 濃度は健康正常人においては 21 ± 0.34 pg/ml であったのに比し敗血症患者では 268 ± 54 pg/ml と有意な増加を示した。血液中 VEGF 濃度は生存者と死亡者間で有意な違いは認めなかった。血漿中 CXCL8 濃度は健康正常人においては 33 ± 0.41 pg/ml であったのに比し敗血症患者では 138 ± 44 pg/ml と有意な増加を示した。血漿中 CXCL8 濃度も生存者と死亡者間で有意な変動を認めなかった。CD34+細胞は敗血症患者で低下傾向を示したが血漿中 VEGF, CXCL8 は上昇していたことより、骨髓のサイトカインに対する反応性低下が示唆された。Rafat らは、敗血症時に EPCs 動員が多いほど予後が良いことを示し、EPCs の有する生体修復作用に言及しているが私どもの研究結果と一致している。

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 2 件)

1) Tomino A, Huq MA, Nakagawa T, Takeyama N, Downregulation of neutrophil derived cell-free DNA in sepsis, J Clin Lab Invest Updates 有 1, 2013, 3-4

2) Gando S, Saitoh D, Ogura H, Fujishima S, Takeyama N 14, A multicenter, prospective validation study of the Japanese Association for Acute Medicine disseminated intravascular coagulation scoring system in patients with severe sepsis, Crit Care、有、17、2013、R111

〔学会発表〕(計 16 件)

1) 武山直志、富野敦稔、波柴尉充、安藤雅規、5、敗血症性ショック患者における T 細胞機能障害、第 29 回日本ショック学会、平成 26 年 5 月、松山

2) Takeyama N、Tomino A、Hashiba M、3、Altered T cell repertoire diversity in septic shock patients、31st International symposium on Intensive Care and Emergency medicine 2014. 3、Brussels

3) 小倉裕司、丸藤 哲、斎藤大蔵、武山直志 15、日本における敗血症(セブシス)の疫学：海外との比較、第 26 回日本外科感染症学会総会、平成 25 年 11 月、神戸

4) Huq MA、Takeyama N、8、Neutrophil extracellular trap formation capacity is altered in neutrophil from septic patients、The 7th Asian conference on emergency medicine、2013. 10、Tokyo

5) Ogura H, Gando S, Saito D, Fujishima S, Takeyama N, 14, Epidemiology of severe sepsis in Japanese intensive care units: A prospective multicenter study, The 7th Asian conference on emergency medicine、2013. 10、Tokyo

6) Huq MA, Hirakawa A, Hattori T, Takeyama N, Kano H, 6, Sepsis alters the extracellular bacterial killing capacity of neutrophil, Seventh Mediterranean Emergency Medicine Congress、2013. 9、Marseille

7) 武山直志、敗血症治療と病態の update、第 28 回日本救命医療学会総会、平成 25 年 9 月、久留米

8) 武山直志、外科的感染症とその制御法、第 86 回日本感染症学会総会、平成 24 年 4 月、長崎

9) 武山直志、敗血症治療と病態の最前線、第 7 回北海道 DIC 学術講演会、平成 25 年 8 月、札幌

10) 丸藤 哲、斎藤大蔵、藤島清太郎、真弓俊彦、武山直志、14、重症敗血症の集中治療：日本救急医学会 sepsis registry 解析結果からの展望、第 40 回日本集中治療医学会学術集会、平成 25 年 2 月、松本

11) Fujishima S, Gando S, Saito D, Takeyama N、14、Quality of care and mortality of severe sepsis and septic shock in Japan、ATS 2012 International Conference、2012. 5

12) 武山直志、敗血症性ショックに対する PMX 施行開始時期と治療効果に関する他施設共同前向き研究、第 13 回エンドトキシン血症救命治療研究会平成、24 年 1 月、東京
13) 武山直志、加納秀記、中村智之、2、高度外傷、敗血症時の血漿中 circulating free-DNA の動的変化 第 40 回日本救急医学会総会、京都

14) 武山直志、敗血症、第 1 回東海感染症研究会、平成 23 年 10 月、岐阜

15) 武山直志、敗血症病態とその治療；急性血液浄化療法を中心に、第 4 回岐阜外傷カンファレンス 平成 23 年 8 月、岐阜

16) 武山直志、敗血症：侵襲反応の破綻をいかに回復させるか、第 19 回日本集中治療医学会東海北陸地方会、平成 23 年 6 月、岐阜

〔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：

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

加納 秀記 (KANO, Hideki)

藤田保健衛生大学医学部・地域救急医療講座・准教授

研究者番号：90340231

(2) 研究分担者

武山 直志 (TAKEYAMA, Naoshi)

藤田保健衛生大学医学部・救命救急医学講座・教授

研究者番号：00155053

(3) 連携研究者

()

研究者番号：