

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659802

研究課題名(和文)多臓器不全発生機序解明の新たな挑戦

研究課題名(英文)Challenging study to clarify mechanisms of multiple organ failure

研究代表者

田中 裕(Tanaka, Hiroshi)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90252676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：多臓器不全の発生機序をDAMPsという新しい視点から解明し、侵襲病態に対する新たなパラダイムを確立した。DAMPsの研究では敗血症時にATPが大量に放出され白血球の活性化に関与すること、多臓器不全ではATPは枯渇し、細胞内ミトコンドリア機能不全が示唆された。DIC病態における白血球活性化に関する研究では急性期DICスコアと白血球変形能、活性化指標であるCD11bに有意な相関を認め、白血球の活性化はDICの発症と重症化に関連していることを明らかにした。ATPの可視化に関する研究では、2種類の蛍光プローブを用いて好中球ATPを染色し、ミトコンドリア内および細胞膜表面の局在の可視化に成功した。

研究成果の概要(英文)：ATP is involved in both intra and extracellular signaling. Neutrophils (PMNs) have a pivotal role in inflammation response. In sepsis patients, plasma ATP levels and CD11b were significantly higher than healthy controls, and the CD11b correlates with plasma ATP. These data suggest that ATP release from damaged cells or activated inflammatory cells stimulates PMNs via ATP receptors and triggers inflammation in sepsis. Sepsis-induced DIC is associated with a high mortality rate. The function and deformability of PMN change in patients with sepsis induced DIC was evaluated. We clarified that PMN deformability and activation correlated with the severity of sepsis-induced DIC. Fluorescence imaging of ATP in human PMNs with chemosensors (PMAP-1, MitoAP-1) was established. This method would contribute to understanding the dynamics of ATP in PMNs and elucidating their diverse physiological functions in inflammation.

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：多臓器不全 敗血症 DAMP s ATP 白血球機能 蛍光イメージング

## 1. 研究背景

(1) 過大侵襲時には白血球が活性化され過剰の活性酸素や蛋白分解酵素が放出され多臓器不全へと進展する。この時、損傷細胞や組織から様々な内在性 DAMPs

( damage-associated molecular pattern ) が産生され、初期免疫応答や白血球の活性化に関与する。しかし、DAMPs 産生の機序は明らかでない。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究目的は、多臓器不全の発生機序を DAMPs という新しい視点から解明し、侵襲病態に対する新たなパラダイムを確立することである。

## 3. 研究方法

(1) 侵襲時の DAMPs の定量化に関する研究。

敗血症、多臓器不全等の侵襲時の DAMPs としての血漿中の ATP 濃度の測定系を確立する。また重症度(APACHE, SOFA)と血漿 ATP 濃度との相関関係を評価する。さらに FACS を用いて、好中球機能(CD11b 発現)を測定し ATP 濃度との関係を明らかにする。

(2) DIC 病態における白血球活性化とレオロジーに関する研究。

敗血症から DIC 病態に陥った多臓器不全症例 ( 35 例 ) と対照として非 DIC 敗血症症例 ( 14 例 ) の白血球機能について、CD11b の発現と白血球変形能を評価する。

(3) DAMPs としての ATP の可視化に関する研究。

好中球 ( PMN ) の細胞膜ならびにミトコンド

リア内に発現する ATP を 2 種類の蛍光プローブ(PMAP-1 と MitoAP-1)を用いて可視化する試みを行った。また、FMLP による刺激を加えた変化を観察した。

## 4. 研究成果

(1) 侵襲時の DAMPs の定量化に関する研究。

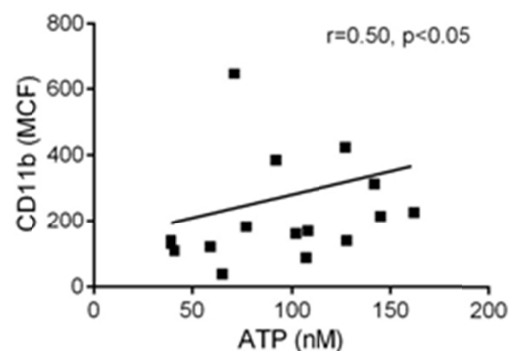
### SIRS 患者の血漿 ATP 濃度

38 例の SIRS 患者(男性 31 例、女性 7 例) ( 敗血症 20 例、熱傷 3 例、心肺蘇生後 15 例 ) を対象に、血漿中 ATP を HPLC で測定した。その結果、SIRS 患者では、明らかに健常者に比べ血漿中 ATP が高値を示した。

### 好中球機能(CD11b)と ATP の関係

敗血症患者において、好中球活性化の指標である CD11b 発現を、フローサイトメトリーで測定した(n=13)。敗血症患者では、来院時に明らかに CD11b 発現は健常者に比べ高値を示し、時間経過とともに改善していることが明らかとなった。また、敗血症生存患者の CD11b 発現と ATP の相関関係を検討したところ、有意な正の関係を認めることが明らかとなった( 図 1 )。以上より、血漿中で上昇した ATP が白血球活性化に寄与していることが示唆された。

図 1. Plasma ATP と CD11b in Sepsis



(2) DIC 病態における白血球活性化とレオロジーに関する研究。

敗血症性 DIC では白血球変形能 (NOM) が低下しており、DIC の重症度と有意な相関を認めた (図 2)。また白血球活性化の指標である CD11b は高値を示した (図 3)。

図 2 DIC 重症度と白血球変形能 (NOM)

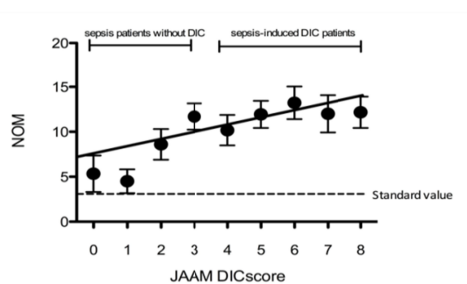
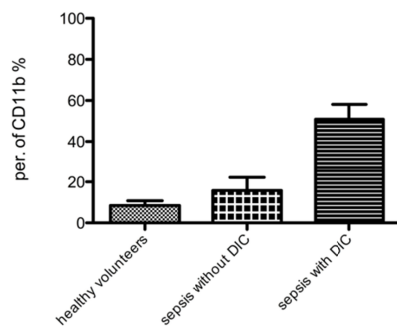


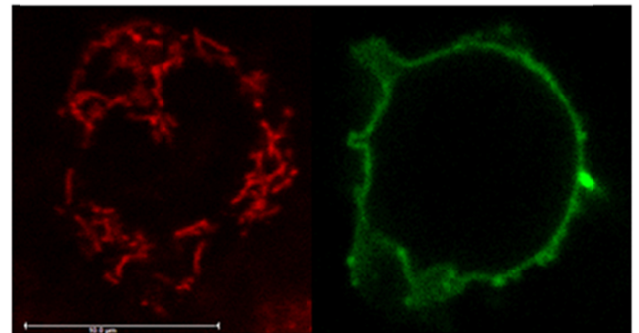
図 3 各群における CD11b 値



(3) DAMPs としての ATP の可視化に関する研究。

ミトコンドリア ATP プローブ (3-2Zn(II)) を用いることにより、好中球の細胞内ミトコンドリア ATP は赤色に可視化された。一方、細胞膜表面 ATP プローブ (2-2Zn(II)) で好中球の細胞膜表面の ATP は緑色に可視化された。これらの変化は FMLP 刺激で増強した。

好中球のATP蛍光イメージングの一例



ミトコンドリアATPプローブ(3-2Zn(II))はミトコンドリアを赤色に染色する。細胞膜表面ATPプローブ(2-2Zn(II))は細胞膜表面を緑色に染色する。

図 4 PMN ミトコンドリア内、細胞膜表面の ATP 蛍光イメージング

## 5. 主な研究論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

角由佳、臓器機能障害のメカニズムとしてのミトコンドリア機能不全。救急・集中治療。(査読無) 2012;24:1068-1075 .  
Iwabuchi K, Nakayama H, Sasuda H, Kina K, Ogawa H, Takamori K. Membrane microdomains in immunity-Glycosphingolipid-enriched domain mediated innate immune responses-. Biofactors. (査読有)、2012;38:275-283.

Yamakawa K, Ogura H, Fujimi S, Morikawa M, Ogawa Y, Mohri T, Nakamori Y, Inoue Y, Kuwagata Y, Tanaka H, Hamasaki T, Shimazu T. Recombinant human soluble thrombomodulin in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation: a multicenter propensity score analysis. Intensive Care Med. (査読有) 2013. 39:644-652.

Oizumi A, Nakayama H, Okino N, Iwahara

C, Kina K, Matsumoto R, Ogawa H, Takamori K, Ito M, Suga Y, Iwabuchi K. Pseudomonas-derived ceramidase induces production of inflammatory mediators from human keratinocytes via sphingosine-1-phosphate. PLoS One (査読有)、2014;25:e89402 .  
Morikawa M, Inoue Y, Sumi Y, Kuroda Y, Tanaka H. Leukocyte deformability is a novel biomarker to reflect sepsis-induced disseminated intravascular coagulation. Acute Medicine & Surgery. (査読有) 2014. (in print)  
Sumi Y, Woehrle T, Chen Y, Bao Y, Li X, Yao Y, Inoue Y, Tanaka H, Junger WG. Plasma ATP is required for neutrophil activation in a mouse sepsis model. Shock (査読有) 2014 Mar 25 (in print).

[学会発表] (計9件)

井上 貴昭, 福本 祐一, 石川 浩平, 杉中 宏司, 末吉 孝一郎, 西山 和孝, 角 由佳, 竹内 悠二, 林 伸洋, 大出 靖将, 岡本 健, 田中 裕。外傷患者に対する生体侵襲評価のための新たな biomarker の開発。第 回日本外傷学会、2013 年 5 月、久留米。  
Sumi Y, Inoue Y, Junger WG, Okamoto K, Tanaka H. Plasma ATP levels and outcome of sepsis. The 36th Annual Conference on Shock. June 2013, San Diego, USA.  
森川美樹、井上 貴昭, 角 由佳, 福本 祐一, 平野 洋平, 西山 和孝, 末吉 孝一郎, 松田 繁, 岡本 健, 田中 裕。白血球変形能の測定と敗血症 DIC の診断。第 16

回日本臨床救急医学会、2013 年 7 月、東京。  
角由佳、井上貴昭、Junger WG, 田中裕。ATP/アデノシンバランスからみた敗血症。第 41 回日本救急医学会、2013 年 10 月、東京。  
石川浩平、井上 貴昭, 角 由佳, 田中 裕。心肺停止蘇生後の全脳虚血再灌流障害における酸化能と抗酸化能、および ATP と神経学的予後との相関。第 41 回日本救急医学会、2013 年 10 月、東京。  
Inoue Y, Sumi Y, Okamoto K, Sasaki S, Tanaka H. Clinical risk factors of Acinetobacter Baumanni in ICU patients. The 7th Asian Conference on Emergency Medicine, October 2013, Tokyo.  
Sumi Y, Sueyoshi K, Inoue Y, Tanaka H, Linglin Lee. Plasma ATP in SIRS patients. The 7th Asian Conference on Emergency Medicine, October 2013, Tokyo.  
Sueyoshi K, Sumi Y, Inoue Y, Kuroda K, Ishii K, Tanaka H. Fluorescence Imaging of ATP in Human Neutrophils with Organelle-Localizable Fluorescent Chemosensors. The 43rd Critical Care Congress. Feb. 2014. San-Francisco, USA.  
井上貴昭、角由佳、岡本健、佐々木信一、田中裕。救急領域における Acinetobacter Baumanni 感染のリスクファクターについて。第 41 回日本集中治療医学会。2014 年 2 月、岡山。

[産業財産権]

研究者番号：70250933

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 裕 (TANAKA, Hiroshi)

順天堂大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：90252676

### (2) 研究分担者

井上 貴昭 (INOUE, Yoshiaki)

順天堂大学医学部・前任准教授

研究者番号：60379196

角 由佳 (SUMI, Yuka)

順天堂大学医学部・准教授

研究者番号：40403084

杉中 宏司 (SUGINAKA, Hiroshi)

順天堂大学医学部・助手

研究者番号：30510424

森川 美樹 (MORIKAWA, Miki)

順天堂大学医学部・助手

研究者番号：40621892

石川 浩平 (ISHIKAWA, Kohei)

順天堂大学医学部・助手

研究者番号：50621900

岩淵 和久 (IWABUCHI, Kazuhisa)

順天堂大学医療看護学部・教授

研究者番号：10184897

荒木 慶彦 (ARAKI, Yoshihiko)

順天堂大学大学院・准教授